



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

**Polisacáridos de la goma brea.  
Caracterización estructural, reológica y  
modificaciones químicas**

Tesis presentada para optar por el Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área Química Orgánica

FRANK SZNAIDER

Director de Tesis: DR. DIEGO A. NAVARRO

Consejero de Estudios: DR. CARLOS A. STORTZ

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Orgánica, FCEyN-UBA, CIHIDECAR-CONICET

Fecha de Defensa de Tesis: 1/7/2021

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2021



## Polisacáridos de la goma brea. Caracterización estructural, reológica y modificaciones químicas.

---

La planta *Cercidium praecox* (conocida como Palo Verde o Brea) es una especie nativa de nuestro país que produce un exudado denominado goma brea, el cual es considerado desde el punto de vista industrial como un posible reemplazo de la goma arábiga. En este trabajo de Tesis se determinó por primera vez de forma completa la estructura fina de los polisacáridos que la componen y se determinaron sus principales propiedades reológicas.

Los polisacáridos de la goma brea, previamente disueltos en agua y purificados por precipitación con isopropanol, fueron analizados por métodos químicos y por espectroscopía de RMN. Se determinó que los mismos son arabinoglucuronoxilanos de un peso molecular promedio de 122 kDa, compuestos por una cadena central de unidades de 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ . Estas xilosas de cadena se encuentran altamente sustituidas, principalmente en la posición 2, con unidades de  $\beta$ -D-xilopiranososa,  $\alpha$ -L-arabinopiranososa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -L-arabinofuranosa, ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico, ya sea como unidades terminales o formando pequeñas cadenas laterales. Además algunas de las unidades de xilosa sustituidas en C-2 se encuentran acetiladas en posición 3.

Con el objetivo de generar productos con características funcionales diferentes, se modificaron los polisacáridos de la goma brea convirtiendo los ácidos carboxílicos de los ácidos urónicos en grupos amida. Se optimizaron las condiciones de la reacción utilizando herramientas de quimiometría y empleando n-propilamina en presencia de una carbodiimida soluble en agua y N-hidroxisuccinimida.

Por último, se realizó una caracterización reológica de la goma brea, de algunos de productos derivados de la misma y de la goma arábiga. Se encontró que la viscosidad de sus soluciones era menor que las reportadas para otras gomas de uso industrial pero ligeramente mayor que la observada para la goma arábiga.

---

**Palabras clave:** goma brea, arabinoglucuronoxilanos, caracterización estructural, RMN, modificación química, amidación, caracterización reológica.



## **Brea gum polysaccharides. Structural and rheological characterization and chemical modifications.**

---

*Cercidium praecox* plant (known as Palo Verde or Brea) is a native species of Argentina that produces an exudate called brea gum which is considered, from an industrial point of view, as a possible replacement for gum arabic. In this work, the fine structure of brea gum polysaccharides was fully determined for the first time and its main rheological properties were studied.

Brea gum polysaccharide, previously dissolved in water and purified by precipitation with isopropanol, was analyzed by chemical methods and by NMR spectroscopy. It was determined that this polysaccharide is an arabinoglucuronoxylan composed of a central chain of  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ , with an average molecular weight of 122 kDa. These xylan units are highly substituted mainly in position C-2 with  $\beta$ -D-xylopyranose,  $\alpha$ -L-arabinopyranose,  $\alpha$ -/ $\beta$ -L-arabinofuranse,  $\alpha$ -D-glucuronic acid and 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid residues, either as terminal units or forming small side chains. In addition, some of the xylose units substituted in position C-2 are acetylated in position O-3.

With the aim of generating products with different functional characteristics, brea gum polysaccharides were modified by converting the carboxylic acid groups of the uronic acids into amide groups. The reaction conditions were optimized, with a chemometric approach, using n-propylamine in the presence of a water soluble carbodiimide and N-hydroxysuccinimide.

On the other hand, a rheological characterization of the brea gum, some of the products obtained from it, and the gum arabic was carried out. It was found that the viscosity values of brea gum solutions were lower than those reported for other industrial gums but slightly higher than those obtained from gum arabic.

---

**Key words:** brea gum, arabinoglucuronoxylans, structural characterization, NMR, chemical modification, amidation, rheological characterization.



A mis padres, Patricia y Ricardo

A mis hermanos, Max y Ben





A mi director de Tesis, Diego A. Navarro, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis. Por tanto años de guía, compromiso, incansable dedicación y por su amistad.

A Carlos A. Stortz por compartir sus conocimientos, su experiencia y sus consejos.



Este trabajo de Tesis está dedicado al Dr. Alberto S. Cerezo, quien hace más de 50 años vislumbró cómo dilucidar las principales características estructurales de la goma brea sin las sofisticadas herramientas disponibles en la actualidad.



A todos/as mis compañeros/as del L3: Les quiero agradecer por el excelente ambiente de trabajo, por el apoyo y la ayuda siempre que la necesité. A Andre, a Ceci y a Yas por estar siempre para responder una duda, darme una mano o un consejo. A Vani por la paciencia y por haberme ayudado y respondido mil dudas cuando comenzaba en el labo; a Mati, Tom, Andy y Romi por su amistad, por estar siempre en las buenas y en los momentos difíciles y por toda su ayuda en el día a día.

A Pablito por todos los momentos y mates compartidos.

A la Dra. Ana María Rojas por todo su apoyo, su guía y su disponibilidad con los experimentos de reología.

A la Dra. Cristina Matulewicz por su desinteresada ayuda con cualquier cosa que necesité.

Al Dr. Cristian Rodriguez por su ayuda con los experimentos de RMN.

Al personal de apoyo del CONICET que trabaja en los institutos del Departamento de Química Orgánica. A Gernot por todos los espectros de RMN. A Martín Luong por toda su ayuda y disponibilidad cada vez que acudí a él.

A las secretarias Nancy y Mica y al personal no docente que trabaja en el Departamento de Química Orgánica, por estar siempre dispuestos a dar una mano.

A todas las personas del DQO con quienes compartí cursos de posgrado o charlas de pasillo, por el trato cordial y el apoyo brindado.

A mi familia por estar siempre. A mis viejes por ayudarme a desarrollarme profesionalmente, por todo su cariño y apoyo. Y a mis abuelos Lala, Salo y Clarita por todo su cariño siempre.

A mis amigos de la vida por estar siempre en todos los momentos. Gracias por acompañarme, por aconsejarme o simplemente por escuchar.

Agradezco, además, a todas las instituciones que me permitieron realizar este trabajo:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), por la beca otorgada para realizar el doctorado.

Al Departamento de Química Orgánica y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por el lugar de trabajo.

Y a todas aquellas personas que colaboraron de alguna manera para que pueda realizar este trabajo de Tesis.

# Índice

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Exudados de plantas	3
1.2 Resinas y látex	3
1.3 Gomas	5
1.3.1 Generalidades	5
1.3.2 Mecanismo de formación y excreción de las gomas exudadas de plantas	6
1.3.3 Gomas comerciales: origen, producción y usos	7
1.3.3.1 Goma Arábiga	9
1.3.3.2 Goma Karaya	13
1.3.3.3 Goma Tragacanto	15
1.3.3.4 Goma Ghatti	17
1.4 Goma Brea	19
1.4.1 <i>Cercidium praecox</i>	19
1.4.2 Agroforestería como estrategia de producción de la goma brea	22
1.4.3 Obtención y comercialización de la goma brea	23
1.4.4 Usos y seguridad de la goma brea	24
1.4.5 Características estructurales de la goma brea	26
1.5 Xilanos extraídos de fuentes naturales	27
1.5.1 Generalidades	27
1.5.2 Homoxilanos	29
1.5.3 Heteroxilanos	29
1.5.3.1 Glucuronoxilanos	29
1.5.3.2 Arabinoxilanos	31

1.5.3.3 Arabinoglucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos	32
1.5.3.4 Xilanos presentes en gomas exudadas	34
CAPÍTULO 2	
COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA GOMA BREA	
2.1 Estudio de los polisacáridos de la goma brea por métodos químicos	39
2.1.1 Obtención de la goma brea	39
2.1.2 Caracterización química de las fracciones GBC y GB	39
2.1.3 Determinación del peso molecular de las fracciones GBC y GB	43
2.1.4 Determinación de azúcares componentes de las fracciones GBC y GB	44
2.1.5 Determinación de la configuración absoluta de las unidades de xilosa y arabinosa presentes en los polisacáridos de la goma brea	50
2.1.6 Análisis por metilación de la fracción GB y el producto GBR	51
2.1.6.1 Resolución de metilpentosas peracetiladas	51
2.1.6.2 Análisis de resultados por metilación	59
2.1.7 Caracterización química de los productos hidrolizados GBH y GBRH	63
2.1.8 Determinación de azúcares componentes de los productos GBH y GBRH	65
2.1.9 Análisis por metilación de los productos GBH y GBRH	66
2.1.10 Análisis por etilación del producto reducido GBR	70
2.1.11 Análisis por metilación del producto GBS obtenido por la degradación de Smith	72
2.1.12 Conclusiones parciales	74
2.2 Análisis estructural por Resonancia Magnética Nuclear	75
2.2.1 Consideraciones generales	75
2.2.2 Espectros de RMN de $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ de la fracción GB	77
2.2.3 Análisis por experimentos bidimensionales de correlación $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ de la fracción GB y sus derivados	80



2.2.4 Elucidación estructural de los polisacáridos de GB	89
2.2.4.1 Asignación de señales de RMN de xilopiranososa de cadena	89
2.2.4.2 Asignación de señales de RMN de residuos arabinofurósicos	95
2.2.4.3 Asignación de señales de RMN de unidades de xilopiranososa y arabinopiranososa terminales	106
2.2.4.4 Asignación de señales de RMN de ácido $\alpha$ -D-glucurónico y de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales enlazadas en posición C-2	109
2.2.4.5 Asignación de señales de RMN de ácido $\alpha$ -D-glucurónico y de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico con un sustituyente en posición C-2	113
2.2.4.6 Asignación de señales de RMN de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales enlazadas en posición C-3	119
2.2.4.7 Generación de oligosacáridos	123
2.2.4.7.1 Tratamiento enzimático de los polisacáridos de goma brea	123
2.2.4.7.2 Estudio de ácidos aldobiurónicos obtenidos por hidrólisis ácida	124
2.2.4.8 Asignación de señales de RMN de residuos de glucosa en espectros de goma brea reducida	130
2.2.4.9 Asignación de señales de RMN de unidades de xilosa de cadena lateral disustituida con xilosas terminales	134
2.2.4.10 Asignación de señales de RMN de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2	137
2.2.4.11 Asignación de señales de RMN de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2 con disacáridos de arabinopiranososa-(1 $\rightarrow$ 2)-ácido (4-O-Me)-glucurónico	146
2.2.4.12 Asignación de señales de RMN de xilosa de cadena sustituidas en posición C-3 con ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico	152
2.2.4.13 Señales de RMN correspondientes a los grupos acetilo	158
2.2.4.14 Asignación de señales de RMN de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2 y acetiladas en posición O-3	162
2.2.4.15 Asignación de señales de RMN de ácido $\alpha$ -D-glucurónico y de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazados en posición 2 influenciados por grupos acetilo	170

2.2.4.16	Asignación de señales de RMN de las unidades de xilosa y arabinosa piranósicas terminales influenciadas por grupos acetilo	175
2.2.4.17	Asignación de señales de RMN de ácido 4- <i>O</i> -metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminal enlazado en posición C-3 a unidades $\rightarrow$ 3,4)-2- <i>O</i> -Ac- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$	182
2.2.4.18	Asignación de señales de RMN correspondientes a grupos acetilo	187
2.3	Conclusiones	189
2.3.1	Resumen de señales de RMN	189
2.3.2	Conclusiones estructurales	198
CAPÍTULO 3		
AMIDACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA GOMA BREA		
3.1.	Introducción	201
3.1.1	Modificaciones químicas de polisacáridos	201
3.1.2.	Amidación de ácidos carboxílicos	202
3.1.3	Amidación de ácidos carboxílicos presentes en polisacáridos empleando carbodiimidas solubles en agua	204
3.1.3.1	Mecanismo de la reacción de amidación mediada por EDC	206
3.1.3.2	Toxicidad de la EDC y sus derivados	213
3.1.4	Diseño de experimentos utilizando herramientas de quimiometría para la optimización de la reacción de amidación	214
3.1.4.1	Selección de Factores	215
3.1.4.2	Análisis de los resultados	217
3.1.4.3	Optimización de una reacción con la metodología de la superficie de respuesta	220
3.2	Resultados obtenidos	222
3.2.1	Estudios preliminares	222
3.2.1.1.	Selección de protocolo experimental	222
3.2.1.2	Obtención de distintos productos de amidación	240
3.2.2	Selección de factores: Diseño factorial 2 <sup>4-1</sup>	242

3.2.3 Método de la superficie de respuesta	253
3.3. Conclusiones	260
CAPÍTULO 4	
CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LA GOMA BREA Y DE PRODUCTOS DERIVADOS	
4.1. Introducción	265
4.1.1 Comportamiento de flujo	265
4.1.2 Propiedades viscoelásticas	267
4.2 Resultados obtenidos	269
4.2.1 Caracterización química y espectroscópica de la goma arábica	269
4.2.2 Estudios de comportamiento de flujo	272
4.2.3 Ensayos oscilatorios dinámicos	281
4.2.3.1 Espectros mecánicos	281
4.2.3.2 Ensayos dinámicos con temperatura	287
4.2.4 Curvas de flujo de productos derivados de GB	291
4.3. Conclusiones	293
CAPÍTULO 5	
MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Consideraciones generales.	297
5.2 Obtención de las fracciones GBC y GB	297
5.2.1 Obtención de material	297
5.3 Métodos generales	298
5.3.1 Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales	298
5.3.2 Determinación de ácidos urónicos	299
5.3.3 Determinación cuantitativa de proteínas totales	300
5.3.4 Determinación cuantitativa de grupos acetilos	301

5.3.5 Hidrólisis de azúcares furanósicos	301
5.3.6 Desacetilación de los polisacáridos	302
5.3.7 Degradación de Smith	302
5.3.8 Determinación del peso molecular por GPC	302
5.4 Determinación de los azúcares componentes	303
5.4.1 Hidrólisis ácida total	303
5.4.2 Preparación de los alditoles peracetilados	303
5.4.3 Preparación de los aldononitrilos peracetilados	304
5.4.4 Preparación de 1-amino-1-desoxialditoles	304
5.5 Reducción de los ácidos urónicos	305
5.6 Estudios de alquilación	306
5.6.1 Metilación	306
5.6.2 Etilación	306
5.7 Cromatografía gas-líquido	307
5.7.1 Análisis de alditoles y aldononitrilos acetilados	307
5.7.2 Análisis de los 1-amino-1-desoxialditoles	307
5.8 Métodos espectroscópicos	308
5.8.1 Espectrometría de masas	308
5.8.2 Análisis por RMN	308
5.8.2.1 Experimentos de RMN monodimensionales	309
5.8.2.2 Experimentos bidimensionales	309
5.8.2.3 Experimentos de RMN cuantitativo (qRMN)	310
5.9 Métodos depolimerizantes	311
5.9.1 Hidrólisis para la obtención de ácidos aldobiurónicos	311
5.9.2 Tratamiento enzimático	311

5.10 Obtención de productos modificados por reducción, hidrólisis y desacetilación a partir de la goma brea	312
5.11 Amidación de los ácidos carboxílicos	312
5.11.1 Protocolo de amidación	312
5.11.2 Diseño estadístico de experimentos	313
5.11.3 Estudio computacional de la energía libre de reacción	314
5.12 Estudios reológicos	314
5.12.1 Curvas de flujo	314
5.12.2 Ensayos dinámicos oscilatorios	315
5.12.2.1 Espectros mecánicos	315
5.12.2.2 Barridos de temperatura	315
RESUMEN FINAL	317
BIBLIOGRAFÍA	323
APÉNDICE DE ESPECTROS	339



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL





## 1.1. Exudados de plantas

Los llamados exudados son fluidos que rezuman de las heridas de plantas y que endurecen luego de estar expuestos al aire<sup>1</sup>. El término incluye a todos los tipos de exudados naturales, los cuales presentan composiciones distintas y propiedades particulares. Las heridas por donde exudan estas sustancias tienen distintos orígenes: pueden ser provocadas de forma intencional, por remoción de la corteza o de la madera para causar la exudación; pueden ser causadas por ataques de distintos organismos como insectos, animales o patógenos; o producirse por condiciones ambientales dañinas como sequías o tormentas<sup>1</sup>. En todos los casos, estos exudados son producidos por las plantas y liberados en las heridas como un mecanismo de defensa<sup>1</sup>.

Los tipos de exudados más importantes por sus usos y valor comercial son las gomas, las resinas y los látex<sup>2</sup>.

## 1.2 Resinas y látex

Una resina de origen vegetal es un material con una consistencia desde semisólida amorfa a sólida, la cual usualmente está compuesta por una mezcla compleja de terpenos que resultan insolubles en agua pero son solubles en ciertos solventes orgánicos<sup>1,2</sup> (ver **Figura 1.1**, imagen a)). Aunque las resinas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, sólo algunas familias (*Leguminosae*, *Burseraceae* y *Pinaceae*) se destacan por producir la mayor parte de las resinas con valor comercial<sup>2</sup>. Dadas sus características, este tipo de materiales se utilizan para la fabricación de barnices y adhesivos y además son una importante fuente de materiales de partida en síntesis orgánica<sup>1</sup>.



**Figura 1.1.** Resina solidificada sobre la corteza del árbol *Prunus dulcis* a); Látex natural del árbol *Hevea brasiliensis* b).

Por otro lado, látex es un término que se utiliza para denominar un líquido, usualmente lechoso y de color blanco, que consiste en pequeñas gotas con materia orgánica suspendida o dispersada en un medio acuoso<sup>2</sup> (ver **Figura 1.1** b) ). El ejemplo más conocido de este tipo de materiales es la goma látex llamada “caucho”, proveniente del árbol *Hevea brasiliensis*, donde el 50 % del peso del látex son sólidos. Mediante distintas técnicas se puede coagular esta materia orgánica para formar un material sólido que se utiliza para producir una enorme variedad de productos como guantes, calzados y neumáticos, entre muchos otros<sup>3</sup>. Los principales componentes de los látex son cis y trans polisopropilenos, aunque la estructura del exudado depende de la planta que lo produce<sup>2,4</sup>.

## 1.3 Gomas

### 1.3.1 Generalidades

Las gomas, a diferencia de las resinas y los látex, están compuestas principalmente por polisacáridos complejos de alto peso molecular con distinta naturaleza hidrofílica que producen soluciones viscosas o geles cuando se ponen en contacto con agua, aún a bajas concentraciones<sup>1,5</sup>. Usualmente estos polisacáridos están asociados con proteínas y/o minerales<sup>5</sup>.

Los árboles y arbustos pueden exudar estos materiales complejos usualmente de sus tallos y ramas, y en algunos pocos casos de sus raíces como un mecanismo de defensa ante lesiones de distinto origen<sup>2</sup>. Estas gomas se exudan en forma de nódulos alargados o trozos amorfos que luego tradicionalmente se secan bajo la luz del sol formando exudados duros y de consistencia similar al vidrio, que previenen que el área dañada se infecte y que la planta pierda agua por dichas heridas<sup>1,5</sup>. Presentan distintos colores desde blanco o ámbar pálido (como el caso de la goma arábica) hasta un gris claro o marrón oscuro (como la goma karaya)<sup>1,5</sup>.

Las gomas exudadas de árboles y arbustos son utilizadas por la humanidad desde hace miles de años en numerosas aplicaciones, debido a sus propiedades únicas y su fácil disponibilidad<sup>1,5,6</sup>. Las principales características que las hacen interesantes para múltiples aplicaciones son sus capacidades como agentes viscosantes, estabilizantes, gelificantes, por su acción emulsionante y sus propiedades adhesivas, entre otras<sup>5</sup>.

Además de las gomas que se extraen como exudados de las incisiones de la corteza de distintas plantas, existen otras gomas que se obtienen de otras fuentes, como de las semillas de diversas plantas (goma guar) o que son producidas por bacterias (goma xántica o xantano), como se observa en la **Tabla 1.1**. Todas estas gomas presentan grandes diferencias en sus propiedades físicas y químicas entre sí

**Tabla 1.1.** Ejemplos de fuentes de gomas según su origen.

<b>Tipo de fuente</b>	<b>Goma</b>	<b>Fuente</b>
Exudado de árboles/arbustos	Goma arábica	<i>Acacia senegal</i>
	Goma karaya	<i>Sterculia urens</i>
	Goma ghatti	<i>Anogeissus latifolia</i>
	Goma tragacanto	<i>Astragalus gummifer</i>
Semillas de planta	Goma guar	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
	Goma garrofin	<i>Ceratonia siliqua</i>
Microbiano	Goma xántica	<i>Xanthomonas campestris</i>
	Goma gellan o gelano	<i>Sphingomonas elodea</i>

### 1.3.2 Mecanismo de formación y excreción de las gomas exudadas de plantas

El mecanismo de formación y liberación de sustancias gomosas fue estudiado en plantas de distintas especies. La producción de estas sustancias naturales, las cuales se consideran subproductos o productos finales de ciertos cambios metabólicos<sup>1</sup>, ocurre en conductos localizados en los tallos de muchas especies de plantas, lo que se denomina usualmente gomosis<sup>7</sup>.

No sólo existen diferencias según la especie en cuestión, sino que además no existe un consenso en la literatura sobre los mecanismos por los que este fenómeno ocurre<sup>1,7</sup>. Por ejemplo, algunos autores atribuyen la formación de gomas a la descomposición de las paredes celulares, mientras que otros postulan que es el resultado de la actividad sintética de células excretorias<sup>7</sup>. En cuanto al origen, se ha propuesto que la formación de estas sustancias ocurre en respuesta a lesiones o al ataque de patógenos, mientras que otros autores han postulado que es un fenómeno natural que se intensifica en dichas situaciones<sup>7</sup>.

En plantas del género *Citrus* fue establecido que los árboles generan conductos productores de goma en respuesta a enfermedades de origen viral o fúngico. En los árboles de este género, estos conductos se desarrollan en el cámbium (tejido vegetal específico de plantas leñosas situado entre la corteza y el leño), donde células epiteliales son las que producen la goma, la cual en primera instancia es secretada en el espacio entre la membrana

celular y la pared celular y luego es liberada fuera de la célula<sup>7</sup>. Este mecanismo de liberación de gomas ha sido descrito también para otros géneros de plantas además de *Citrus*<sup>1</sup>. Sin embargo, no es el único mecanismo de gomosis propuesto. En algunas plantas se encuentran vasos que poseen sustancias gomosas ocluidas, lo cuales se pueden generar en respuesta a una herida o una infección<sup>7</sup>. Este tipo de oclusiones vasculares se pueden desarrollar en plantas de *Manihot esculenta* (mandioca o yuca), *Dianthus caryophyllus L.*, *Uhnus cavipestris*, entre otras<sup>7</sup>.

### 1.3.3 Gomas comerciales: origen, producción y usos

Las cuatro gomas exudadas provenientes de fuentes vegetales que más se utilizan en el mundo son la goma arábica, la goma karaya, la goma tragacanto y la goma ghatti. Estos exudados son utilizados desde hace 5000 años y son considerados seguros para el consumo humano por diversos estudios toxicológicos<sup>5</sup>. Actualmente estas gomas se comercializan en grado alimenticio y su categoría de “Generalmente Reconocidas como Seguras” (GRAS por sus siglas en inglés) fue establecido por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos<sup>5</sup>. En la **Tabla 1.2** se resumen sus principales características y usos.

La apariencia física y las propiedades de estas gomas de origen natural son fundamentales para determinar su finalidad comercial. Cabe destacar que puede existir en algunos casos una considerable variabilidad entre gomas provenientes de una misma especie que fueron colectadas de plantas que se encuentran en entornos con climas distintos, o bien que fueron cosechadas en estaciones del año distintas<sup>1</sup>. Las propiedades físicas también dependen de la antigüedad del exudado así como el tratamiento que se le realiza a cada uno luego de la recolección<sup>8</sup>.

En el estado sólido, una vez que estas gomas se secan luego de ser excretadas, el color de las mismas varía desde blanco traslúcido hasta marrón oscuro, pasando por distintas tonalidades de amarillo, ámbar y naranja. El color de estas gomas tiene su origen generalmente en la presencia de impurezas y usualmente suele aparecer luego de que el exudado envejece y se depositan otras sustancias<sup>1</sup>.

**Tabla 1.2.** Principales características de las gomas exudadas comerciales más importantes.

<b>Exudado</b>	<b>Color</b>	<b>Propiedades y Usos</b>
Goma arábica	Ámbar claro	Estabilizante, emulsionante, encapsulante de <i>flavores</i>
Goma karaya	Gris claro	Viscosante y emulsionante. Estabilizante en productos lácteos congelados. Inhibidor de la sinéresis en quesos
Goma tragacanto	Amarillo claro	Viscosante, emulsionante. Estabilización de aceites en soluciones acuosas. Resistencia a condiciones ácidas
Goma ghatti	Rojo	Emulsionante, posee propiedades adhesivas. Uso medicinal y como emulsificante de compuestos liposolubles.

Prácticamente toda la producción comercial de gomas exudadas es cosechada realizando incisiones en los troncos de los árboles<sup>6</sup>. La cantidad de exudado que produce la planta es mayor en las estaciones cálidas y secas y puede aumentarse realizando una mayor cantidad de cortes e incisiones, aunque en algunos casos es necesario derribar los árboles para obtener el recurso. En general, la recolección es realizada manualmente por mujeres. El exudado se recoge parcial o totalmente seco, se separa según el tamaño de los fragmentos<sup>2</sup>, se clasifica y se envía los centros de procesamiento<sup>1</sup>.

El procesamiento de los exudados consiste generalmente en un proceso mecánico donde los trozos grandes de goma previamente secada se fragmentan en pequeños gránulos de forma mecánica logrando una distribución de tamaños más uniforme que facilita la posterior disolución en agua. La solubilidad de las gomas se mejora obteniendo un polvo a partir de estos pequeños gránulos obtenidos. Posteriormente, se remueven las impurezas por filtración o centrifugación y luego se obtiene el producto final como un polvo mediante la técnica de secado por spray<sup>6</sup>.

Las aplicaciones que tienen estos exudados son muy dependientes de las características propias de cada goma. En líneas generales, estas gomas se utilizan en la industria alimentaria para encapsular *flavores*, como agentes emulsionantes y viscosantes, para estabilizar espumas o bebidas, y como agentes humidificantes en pastelería. Además de estas aplicaciones, las

gomas exudadas de plantas son utilizadas además por la industria farmacéutica, textil, cosmética y electrónica por mencionar algunas<sup>5</sup>.

### 1.3.3.1 Goma Arábica

La goma más utilizada en el mundo es la arábica, que es exudada principalmente por el árbol *Acacia senegal*, aunque existen otras fuentes minoritarias también del género *Acacia* como la *Acacia seyal*<sup>5</sup>. Esta especie se encuentra distribuida en varias regiones de África, aunque cerca del 90% de la producción a nivel mundial proviene de Sudán<sup>1</sup>. Estos árboles presentan la particularidad de poseer un sistema radicular extendido y de poder crecer en condiciones de escasa disponibilidad de agua, por lo que se suelen utilizar para prevenir procesos de erosión del suelo y al mismo tiempo obtener la goma que producen<sup>5</sup>. Esta goma fue la primera en ser utilizada a escala industrial y se tiene constancia de su uso desde hace más de 5000 años<sup>5</sup>. En el antiguo Egipto se conocía como “kami” y se utilizaba como adhesivo textil en el proceso de momificación<sup>5,6</sup>.

La goma arábica, al igual que otros exudados, presenta un rango de coloración según su pureza, variando desde un color ámbar claro hasta un marrón anaranjado (ver **Figura 1.2**). La goma arábica de mejor calidad presenta una forma de “lágrimas” y color ámbar<sup>2</sup>.

La producción de goma arábica se ve afectada por condiciones climáticas y políticas y por problemas inherentes a su cultivo<sup>1,5</sup>. Al igual que el resto de las gommas, la goma arábica se cosecha manualmente y se busca obtener como producto final una goma con la mínima cantidad de impurezas, lo que representa un trabajo dificultoso<sup>5</sup>. La goma se obtiene comercialmente realizando grandes incisiones a los árboles de *Acacia senegal* en la estación seca (de noviembre a mayo). El rendimiento promedio de goma arábica es 250 g por árbol por año, aunque depende de la cantidad de lluvias durante la estación húmeda y la temperatura durante el período de cosecha<sup>1,5</sup>.



**Figura 1.2.** Goma arábica

La goma arábica está compuesta principalmente por hidratos de carbono y presenta un porcentaje minoritario de proteínas, cercano al 2%. En la **Tabla 1.3** se muestra la composición de la goma arábica<sup>9</sup>, la cual dependiendo de la fuente puede presentar pequeñas diferencias<sup>1,5,6,10,11</sup>. La goma arábica que se obtiene de otras especies del género *Acacia*, como *Acacia seyal*, contiene los mismos azúcares pero en proporciones levemente diferentes<sup>9</sup>.

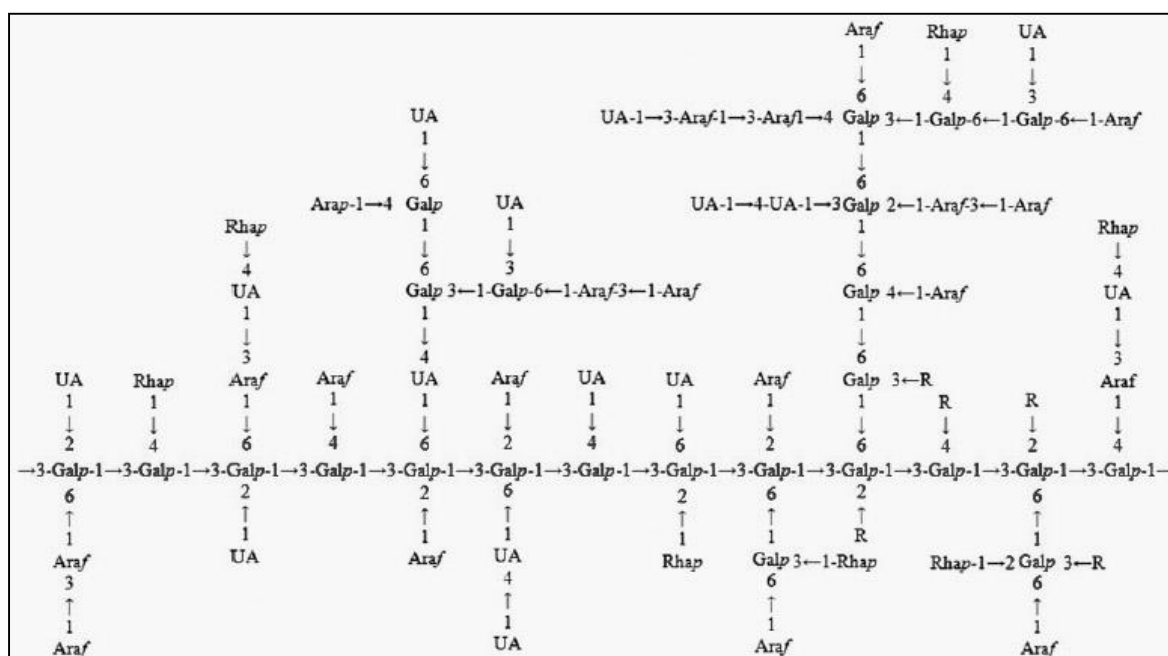
**Tabla 1.3.** Composición de la goma arábica.

<b>Composición</b>	<b>% (m/m)</b>
Carbohidratos	82
Ácidos urónicos	16
Proteínas	2
<b>Azúcares componentes</b>	<b>% molar</b>
Galactosa	44
Arabinosa	27
Ramnosa	13
Ácido (4-O-Me)-glucurónico	16

La goma arábica puede fraccionarse empleando cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de interacción hidrofóbica en tres fracciones: un arabinogalactano (AG), un complejo arabinogalactano—proteína (AGP) y una glicoproteína<sup>12</sup>. El arabinogalactano es el componente mayoritario de la goma arábica constituyendo un 88 % del total, seguida del complejo AGP que representa un 10 %<sup>12</sup>. A este complejo AGP se le atribuyen las propiedades emulsionantes de la goma arábica.



Los estudios estructurales realizados sobre los polisacáridos mayoritarios de la goma arábica (fracción AG), obtenida del árbol *Acacia Senegal*, muestran que los mismos están compuestos de una cadena central de unidades de  $\rightarrow 3$ - $\beta$ -D-galactopiranosas-(1 $\rightarrow$ ) altamente sustituida en posición C-6 por cadenas laterales cortas<sup>5,12,13</sup>. Estas ramificaciones están conformadas por unidades de arabinosa, galactosa, ramnosa y ácido glucurónico formando una gran variedad de estructuras distintas<sup>12,13</sup>. Nie *et al.*<sup>14</sup> en un trabajo publicado en 2013 propusieron algunas correcciones a la estructura determinada por Street y Anderson<sup>13</sup> en 1983. La estructura propuesta actualmente para los arabinogalactanos mayoritarios de la goma arábica es sumamente compleja y se puede apreciar en la **Figura 1.3**.



**Figura 1.3.** Estructura propuesta para los polisacáridos de la goma arábica (adaptado de Nie *et al.*<sup>14</sup>). Los residuos Galp, Araf, Rhap se corresponden con  $\beta$ -D-galactopiranosas, L-arabinofuranosas y  $\alpha$ -L-ramnopiranosas respectivamente.

La goma arábica se utiliza en numerosas aplicaciones por su alta solubilidad en agua, de hasta 50 % m/m, y por su gran capacidad emulsionante y estabilizante<sup>5</sup>. Sin embargo, la característica más distintiva de la goma arábica es la de formar soluciones de muy baja viscosidad en comparación con el resto de las gomas de uso industrial aún a altas concentraciones<sup>5,6,11</sup>. Debido a períodos de escasez y precios altos, se han buscado alternativas más económicas y/o accesibles que puedan reemplazar a esta goma en algunas

de sus aplicaciones<sup>2</sup>. No obstante, sus ventajas técnicas en comparación con el resto de las gomas disponibles la han vuelto muy difícil de sustituir<sup>2</sup>.

Cabe destacar que es común encontrar en bibliografía<sup>5,6</sup> información errónea sobre el comportamiento de flujo de esta goma. En particular, se afirma que la misma presenta un comportamiento newtoniano aún a concentraciones altas (mayores al 30 %). Sin embargo, Sanchez *et al.*<sup>11</sup> en un trabajo publicado en 2002 realizaron una caracterización completa de las propiedades de flujo de la goma arábica donde mostraron que la misma posee claramente un comportamiento pseudoplástico en todo su rango de solubilidad. Si bien estos resultados han sido replicados en numerosas publicaciones<sup>15-17</sup>, la confusión persiste aún en la actualidad<sup>5</sup>.

Por sus propiedades emulsificantes y estabilizantes, la goma arábica se utiliza en la industria alimentaria mayormente para la encapsulación de *flavores*, aceites, componentes bioactivos, etc<sup>5</sup>. Estos productos microencapsulados poseen un mayor tiempo de vida y pueden ser utilizados en mezclas secas<sup>5</sup>. Además, la goma arábica se emplea para la manufactura de jugos de fruta en polvo, los cuales al ser muy ricos en azúcares son difíciles de secar por la técnica de spray<sup>5</sup>. La adición de esta goma a los jugos de fruta genera un aumento en la temperatura de transición vítrea lo que resulta en una reducción de la pegajosidad en el polvo final. En productos de confitería la goma arábica se utiliza para retardar el proceso de cristalización del azúcar y para emulsionar los componentes lipídicos<sup>2,5</sup>. Adicionalmente, la goma arábica se emplea como fuente de fibra soluble en el desarrollo de productos bajos en calorías<sup>6</sup>.

En la industria farmacéutica, la goma arábica se utiliza como agente portador (“carrier”) de distintos principios activos ya que se considera una sustancia fisiológicamente inofensiva<sup>18</sup>. Adicionalmente, distintos estudios en los últimos años han mostrado que esta goma presenta distintas propiedades interesantes sobre la salud humana: propiedades antioxidantes; resultados positivos en terapia para casos de enfermedades degenerativas severas como fallas renales, cardiovasculares y gastrointestinales<sup>18</sup>.

### 1.3.3.2 Goma Karaya

La goma karaya es un exudado que se obtiene mayormente de los árboles de la especie *Sterculia urens*, perteneciente a la familia Malvaceae, que se encuentra en zonas altas y áridas de la parte centro y norte de la India<sup>5,19</sup>. Inicialmente fue introducida en el mercado como sustituto de la goma tragacanto y actualmente se ha convertido en la segunda goma más usada en el mundo<sup>5</sup>. Como otras gomas, su producción se aumenta realizando incisiones en el tronco del árbol, aunque en el caso de esta goma la mayor parte se exuda en un plazo de 24 horas<sup>5</sup>. En promedio, estos árboles pueden ser inducidos a producir este exudado aproximadamente cinco veces a lo largo de su vida, con un rendimiento de 1 a 5 kg de goma karaya por árbol por temporada<sup>1</sup>.

Comercialmente la goma karaya se clasifica en 3 grados de pureza, los cuales difieren en su apariencia y en la proporción de restos insolubles<sup>5</sup>. El color de la goma karaya va desde color gris claro (mayor pureza) hasta un marrón pálido en los exudados de menor pureza<sup>5</sup> (ver **Figura 1.4**).



**Figura 1.4.** Goma karaya de alta pureza.

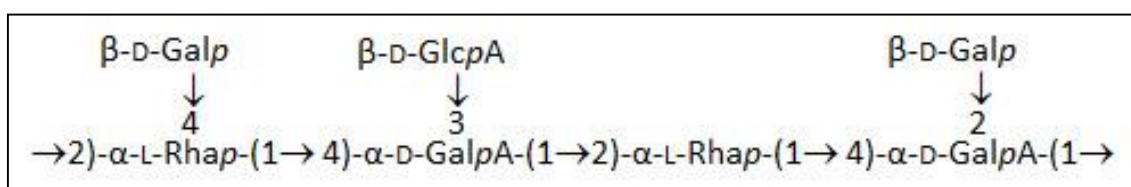
La goma karaya está compuesta mayoritariamente por polisacáridos complejos altamente acetilados, con un peso molecular del orden de 160 kDa, que se obtienen como sales de calcio o magnesio<sup>5</sup>. Los polisacáridos están conformados por proporciones

prácticamente iguales de  $\alpha$ -L-ramnosa y  $\beta$ -D-galactosa y por ácidos urónicos, principalmente ácido  $\alpha$ -D-galacturónico. Estructuralmente son ramnogalacturonanos con una cadena central de  $\rightarrow 4$ -ácido  $\alpha$ -D-galacturónico-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramnosa-(1 $\rightarrow$  donde las unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico se encuentran sustituidas en posición 2 o 3 con  $\beta$ -D-galactosa o con ácido  $\beta$ -D-glucurónico respectivamente. Además, aproximadamente la mitad de las unidades de  $\alpha$ -L-ramnosa se encuentran sustituidas en posición 4 por residuos de  $\beta$ -D-galactosa<sup>5,6,19,20</sup> (ver **Figura 1.5**).

En la **Tabla 1.4** se muestra la composición centesimal de la goma karaya. Los grupos acetilos se encuentran en posiciones aún no determinadas.

**Tabla 1.4.** Composición de la goma karaya.

Composición	% (m/m)
Carbohidratos	54
Ácidos Urónicos	37
Proteínas	1
Grupos acetilo (-COCH <sub>3</sub> )	8



**Figura 1.5.** Estructura de los polisacáridos que componen la goma karaya (adaptado de Lujan-medina *et al.*<sup>20</sup>).

Debido a su alto grado de acetilación, la goma karaya presenta la particularidad de ser muy poco soluble en agua. Únicamente a muy bajas concentraciones (0,2 g/kg) esta goma forma soluciones verdaderas<sup>5</sup>. No obstante, en contacto con el agua este material puede absorberla e hincharse para formar soluciones coloidales de muy alta viscosidad<sup>5,19</sup>. Para aumentar la solubilidad de la goma karaya se puede llevar a cabo la desacetilación de los polisacáridos<sup>5</sup>.

La goma karaya se usa ampliamente como estabilizante, usualmente en concentraciones muy bajas (0,2 a 0,4 %) en una gran variedad de productos alimenticios como helados, postres

congelados, cremas, etc. En productos lácteos congelados se la utiliza para mejorar la textura y las propiedades sensoriales, ya que controla la cristalización del agua<sup>5</sup>. Debido a su resistencia a medios ácidos, también se utiliza este exudado como estabilizante en helados de fruta<sup>5</sup>. Además, se la emplea en la preparación de quesos como inhibidor de la sinéresis.

En la industria farmacéutica la goma karaya se emplea como adhesivo dental para dientes postizos y en la manufactura de fijadores para bolsas de colostomía<sup>2</sup>. En la industria del papel, se la utiliza como un aglutinante, mientras que en la industria textil se utiliza esta goma como un agente viscosante para colorantes utilizados en la tinción de telas de algodón<sup>5</sup>.

### 1.3.3.3 Goma Tragacanto

Se denomina goma tragacanto (o goma katira como se la conoce en Irán) a los exudados de los arbustos del género *Astragalu*, que comprende más de 2000 especies de plantas<sup>21</sup>, y que pertenecen a la familia Fabaceae. Estos pequeños arbustos perennes pueden tener una altura entre 10 cm y 1 m y se distribuyen en regiones semidesérticas y montañosas del sudoeste de Asia<sup>22</sup>. A pesar de su amplia distribución, la mayor parte de la goma tragacanto que se comercializa proviene de Irán y de unas pocas especies de arbustos del género *Astragalus* como *Astragalus gummifer*, *Astragalus microcephalus*, *Astragalus kuricus* y *Astragalus gossypinus*<sup>5</sup>. Este exudado se cosecha de las ramas y las raíces de estos arbustos luego de realizar incisiones en los mismos para aumentar su producción<sup>2,5</sup>.

La goma tragacanto presenta un color de blanco a amarillo oscuro (ver **Figura 1.6**) y se comercializa según su capacidad viscosante y el tamaño de partícula<sup>5</sup>.

La composición de la goma que se obtiene de diferentes especies de este género es muy variada. Además, se han encontrado diferencias importantes en el exudado producido por la misma especie debido a variaciones estacionales o geográficas<sup>6</sup>. Por lo tanto, la goma tragacanto comercial es un producto que presenta una gran variabilidad en su composición.



**Figura 1.6.** Goma tragacanto.

La mayor parte del exudado está compuesto por hidratos de carbono y un porcentaje minoritario por proteínas y minerales<sup>21</sup>. Esta goma está compuesta por dos fracciones: tragacantina, que representa del 20 al 40 % del exudado y es soluble en agua y el ácido tragacántico o bassorina la cual corresponde al restante 80 a 60 % de la goma. Esta última fracción es insoluble en agua, aunque tiene la capacidad de absorberla y espesar la solución<sup>6,21</sup>. Cuanto mayor es la proporción de tragacantina, el exudado se considera de mayor calidad<sup>21</sup>. Estas fracciones no están químicamente unidas y por lo tanto pueden ser fácilmente separadas por sedimentación o centrifugación de la goma previamente hidratada<sup>23</sup>. A su vez, cada una de estas fracciones presenta subfracciones que pueden ser separadas<sup>24</sup>, aunque se ha observado una significativa pérdida en las propiedades funcionales de estas fracciones una vez que fueron sometidas a este proceso<sup>25</sup>.

En base al análisis de los exudados provenientes de las especies comercialmente más importantes, la goma tragacanto está compuesta de ácido galacturónico, xilosa, fucosa, arabinosa, galactosa y glucosa en cantidades variables según la especie. La fracción mayoritaria bassorina proveniente de la especie *Astragalus gummifer* presenta una estructura con una cadena central compuesta de  $\rightarrow 4$ -ácido  $\alpha$ -D-glucurónico-(1 $\rightarrow$  donde algunos de estos residuos presentan unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosas como sustituyentes en la posición O-3<sup>26</sup>. En cambio, la fracción soluble tragacantina está compuesta por un arabinogalactano altamente sustituido con unidades terminales o cadenas laterales cortas de arabinosa tanto

piranósica como furanósica<sup>27</sup>. Sin embargo, existe una gran variabilidad en esta goma, ya que dependiendo de la especie la proporción de cada fracción y su estructura química pueden diferir<sup>21,24,28</sup>.

La característica más significativa de la goma tragacanto es su capacidad viscosante, la cual además refleja su calidad<sup>5</sup>. Dependiendo del grado de calidad de la goma, la viscosidad de una solución al 1 % a una velocidad de cizalla de  $0,33 \text{ s}^{-1}$  puede alcanzar un valor de  $3,5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ <sup>26</sup>.

Su uso como aditivo en alimentos no se encuentra tan extendido en la actualidad ya que se ha reemplazado en muchas de sus aplicaciones por alternativas más económicas como la goma guar o xántica<sup>2</sup>. Sin embargo, debido a sus propiedades viscosantes, estabilizantes, emulsionantes y a su gran resistencia a condiciones ácidas presenta ciertas ventajas respecto a otras gomas<sup>2</sup>. En particular, se la utiliza para prevenir la floculación y coalescencia en emulsiones de aceites en soluciones acuosas<sup>2,5,6</sup> y en aplicaciones no alimenticias como cremas y lociones dermatológicas<sup>2</sup>.

#### **1.3.3.4 Goma Ghatti**

La goma ghatti es un exudado que se obtiene de árboles de la especie *Anogeissus latifoli*, perteneciente a la familia Combretaceae, que se encuentran en la India y Sri Lanka<sup>5</sup>. Su nombre se deriva de la palabra Ghat cuyo significado es “pasaje en la montaña”, debido a que antiguamente se la comercializaba por rutas que atravesaban cadenas montañosas<sup>29</sup>. Los árboles que producen esta goma poseen la particularidad de ser parte del bosque más grande de la India. Estos árboles con una adecuada provisión de agua y nutrientes pueden alcanzar los 35 m de altura<sup>5</sup>.

La goma ghatti posee la particularidad de que exuda naturalmente<sup>29</sup>, aunque se suelen realizar incisiones cuidadosamente en la corteza de los árboles para aumentar su producción y no provocar heridas permanentes<sup>5</sup>. La goma ghatti es exudada lentamente en el transcurso de varios días y su rendimiento por cada exudación puede ser entre 5-50 g dependiendo de la edad del árbol y su tamaño, entre otras variables<sup>5</sup>. Posee una apariencia vidriosa y su color

puede variar de blanco traslúcido a rojo oscuro dependiendo de la antigüedad del exudado y de que se hayan depositado materiales externos que la oscurezcan<sup>5,29</sup> (ver **Figura 1.7**).

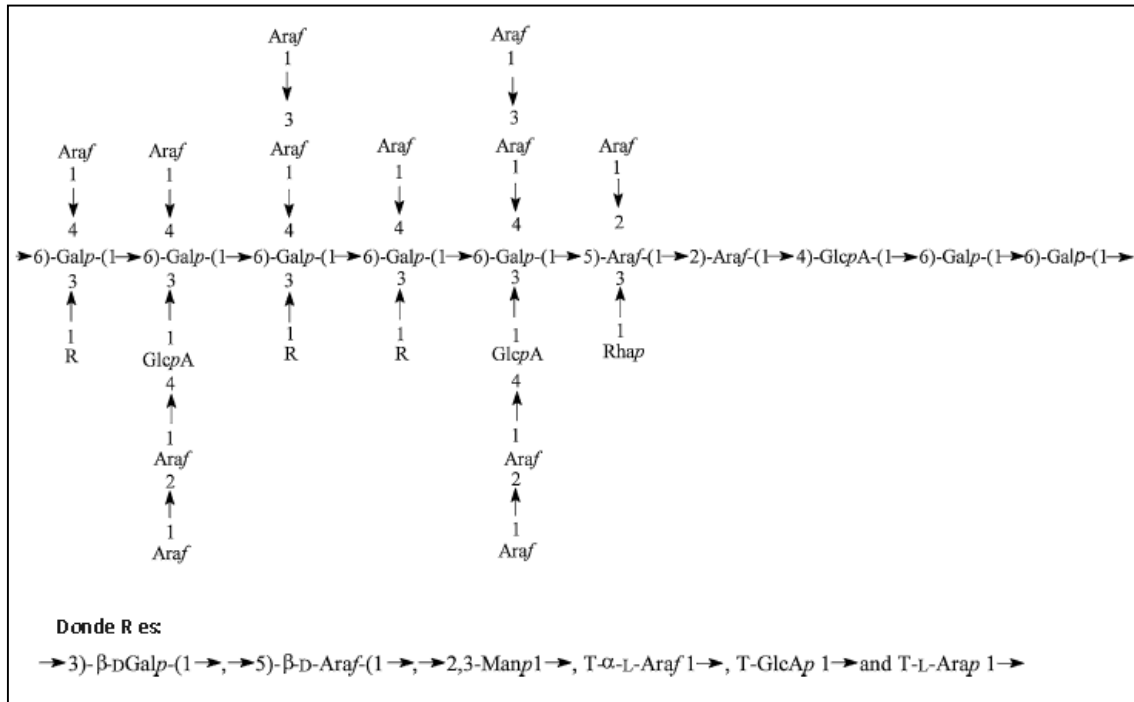


**Figura 1.7.** Goma ghatti.

La goma ghatti está compuesta principalmente por hidratos de carbono aunque presenta aproximadamente un 5% de proteínas<sup>30</sup>. Los polisacáridos que la constituyen están conformados por L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y ácido D-glucurónico en proporciones 10:6:2:1:2<sup>5</sup>, aunque esta relación puede variar ligeramente en distintas muestras.

Kang *et al.*<sup>30</sup> informaron que la goma ghatti puede ser fraccionada por precipitación selectiva empleando cantidades crecientes de etanol. De esta forma los autores obtuvieron cuatro fracciones: F50, F65, F80 (precipitados con 50 %, 65 % y 80 % de etanol respectivamente) y FS (sobrenadante de la fracción F80)<sup>30</sup>. Estudios preliminares mostraron que las fracciones precipitadas poseen una estructura similar, por lo que en dicho trabajo se utilizó la F80 como representativa de la estructura de los polisacáridos de esta goma<sup>30</sup>. El análisis estructural de esta fracción concluyó que los polisacáridos de este exudado están compuestos por una cadena principal de  $\rightarrow 6$ - $\beta$ -D-galactopiranos-(1 $\rightarrow$  aunque algunas de estas unidades son reemplazadas por el trisacárido  $\rightarrow 5$ -L-arabinofuranosa-(1 $\rightarrow 2$ )-L-arabinofuranosa-(1 $\rightarrow 4$ )-ácido glucurónico-(1 $\rightarrow$ . Fundamentalmente las unidades de D-galactopiranos de la cadena central se encuentran altamente sustituidas en las posiciones 3 y 4 con residuos terminales de L-arabinofuranosa y en menor proporción con unidades terminales de ácido glucurónico, arabinopiranos y galactosa<sup>31,32</sup> (ver **Figura 1.8**).





**Figura 1.8.** Estructura propuesta para la fracción F80 de la goma ghatti (adaptado de Kang. *et al.*<sup>32</sup>). Los residuos Galp y Araf se corresponden con  $\beta$ -D-galactopiranososa y L-arabinofuranosa respectivamente.

Esta goma se utiliza en India desde la antigüedad debido a sus propiedades medicinales, entre otras, lo que la vuelve muy útil en distintos productos<sup>5</sup>. Posee propiedades emulsificantes similares a la goma arábica por lo que se la utiliza en la industria farmacéutica en la preparación de polvos a partir de vitaminas liposolubles. Además se utiliza tanto comercial como domésticamente por sus propiedades adhesivas<sup>5</sup>.

## 1.4 Goma Brea

### 1.4.1 *Cercidium praecox*

El árbol *Cercidium Praecox* (Ruiz & Pav) Harms, conocido popularmente como “brea” o “palo verde”, es una leguminosa que pertenece a la familia Fabaceae que crece en zonas áridas y semiáridas de nuestro país como árbol o arbusto, alcanzando de 2 a 8 m de altura<sup>33,34</sup>. Este árbol produce un exudado que se conoce como “goma brea”, el cual puede ser aprovechado comercialmente por pequeños productores y comunidades que viven en el

bosque o en sus cercanías, con gran potencial para impulsar el desarrollo de economías locales<sup>33</sup>.

En nuestro país, esta especie se encuentra distribuida formando bosques nativos que se conocen como “breales”<sup>35</sup>, desde la provincia de Río Negro hasta Salta y Formosa, siendo particularmente abundante en el chaco árido y semiárido<sup>33</sup>. Además, posee una amplia distribución en América, desde el sur de Estados Unidos, pasando por México, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia y Paraguay hasta la Argentina<sup>33</sup>.

En la Argentina se pueden distinguir dos subespecies: *Cercidium praecox* subespecie *praecox*, que se distribuye en zonas semiáridas y subhúmedas del centro y norte del país y *Cercidium praecox* subespecie *glaucum*, que se encuentra en el oeste y norte de Argentina, en ambientes más secos<sup>33,36</sup> (ver **Figura 1.9**). Sin embargo, Burkart y Carter<sup>36</sup> en el trabajo original de 1976 donde realizan esta diferenciación, aclaran que la única diferencia entre estas dos subespecies se encuentra en la forma y tamaño de los ovarios. En otras publicaciones posteriores<sup>33</sup> se especifica que la subespecie *praecox* crece como un árbol pequeño y se



**Figura 1.9.** Zonas de distribución de *Cercidium praecox* en la Argentina.<sup>32</sup>

encuentra en zonas de mayores precipitaciones mientras que la subespecie *glaucum* se encuentra en zonas más secas y se desarrolla como un arbusto de 2 a 3 m. Se desconoce si esta diferencia en el desarrollo es atribuible a cada una de las subespecies o si se debe a las condiciones climáticas en las que se desarrollan estas plantas, por lo que resulta sumamente difícil distinguir ambas subespecies.

Esta especie de árboles nativos posee un sistema radicular fuerte y profundo que le permite crecer en pendientes rocosas, razón por la cual es una especie que coloniza ambientes degradados de nuestro país. Además, aporta una cantidad importante de materia orgánica y nitrógeno al suelo por tratarse de una leguminosa<sup>33</sup>. Estas características la vuelven una especie interesante para poder restaurar ambientes degradados y proteger cuencas<sup>33</sup>.

Estos árboles poseen una corteza lisa y delgada de un color verde característico y presentan una floración

abundante que antecede a la foliación. Sus flores son pequeñas, amarillas, dispuestas en racimo y poseen capacidad mielífera (ver **Figura 1.10**). Por otro lado, su madera se descompone rápidamente por lo que no puede ser utilizada como una fuente de leña o carbón<sup>37</sup>. Sin embargo, el aprovechamiento del exudado que emana de su tronco como un “producto forestal no maderero” no sólo puede ser beneficioso para pequeños productores o comunidades rurales sino que además representa una estrategia para favorecer la conservación de esta especie<sup>35,37</sup>.



**Figura 1.10.** Árbol de *Cercidium praecox* y sus distintas partes.

Losano *et al.*<sup>38</sup> estudiaron el mecanismo de secreción de sustancias gomosas en el xilema secundario de *Cercidium praecox* de muestras provenientes de la provincia de Córdoba, Argentina. Determinaron que la formación de estas sustancias comienza en las células del parénquima que rodea a los vasos, y causa la oclusión total o parcial del lumen de éstos, coincidiendo con la ocurrencia de un traumatismo.

### 1.4.2 Agroforestería como estrategia de producción de la goma brea

Se denomina agroforestería a sistemas y tecnologías de uso de la tierra en los que se combinan deliberadamente plantas leñosas perennes (como árboles, arbustos, palmas o bambús) con cultivos agrícolas o animales en la misma parcela de tierra con algún tipo de disposición espacial y cronológica<sup>1,39</sup>. Si bien es una práctica ancestral, desde 1970 este tipo de prácticas se han beneficiado por una cantidad creciente de investigación y experimentación<sup>1</sup>.

Por otro lado, se calcula que el 25 % de las tierras del mundo se han degradado enormemente o están sujetas a altos índices de degradación<sup>40</sup>. Los tipos de degradación incluyen la disminución de la fertilidad del suelo, el desequilibrio de nutrientes, la erosión, la compactación, la acidificación y la salinización. A largo plazo, estos fenómenos pueden ser responsables de la pérdida de biodiversidad y producir cambios negativos en el microclima que faciliten la desertificación. La degradación puede también influir negativamente en el cambio climático, al aumentar las emisiones de gases de efecto invernadero. Con el tiempo, la degradación de la tierra puede aumentar la vulnerabilidad de las comunidades rurales ante las amenazas biológicas y ambientales y ante los efectos del cambio climático<sup>40</sup>.

Si están bien diseñados y manejados, los sistemas agroforestales pueden ayudar a restaurar los ecosistemas y contribuir a la conservación de la biodiversidad y a la adaptación al cambio climático y mitigación de sus efectos. Los suelos de sistemas agroforestales cultivados bajo árboles tienen mayores niveles de carbono orgánico, nitrógeno mineralizable, fósforo, potasio y calcio, comparados con los suelos que están fuera de la influencia de estos árboles. Además, este tipo de sistemas pueden incrementar la eficiencia en la utilización de agua al minimizar las zonas no productivas, aumentando el aprovechamiento del agua de lluvia<sup>1</sup>.

En Sudán, el bosque más importante está constituido por un “cinturón” de *Acacia senegal* de donde se obtiene la goma arábiga<sup>1</sup>. Esta zona comprende unos 520000 km<sup>2</sup> que se extienden en la zona central de Sudán y donde vive el 20% de la población de ese país. La producción de goma arábiga se realiza con un enfoque agroforestal en combinación con ganadería, por lo que en esta zona se encuentra el 66% del ganado de pie del país<sup>1</sup>. Ese

cinturón actúa como una barrera natural y protege el 40 % del territorio de Sudán del avance del desierto<sup>1</sup>.

Von Müller *et al.*<sup>35</sup> realizaron en 2007 un estudio sobre la viabilidad socioeconómica de la producción de goma brea en el Chaco Árido con un manejo agroforestal. En ese trabajo determinaron que la producción de goma brea es económicamente viable principalmente en áreas de bosque chaqueño en buen estado, mientras que zonas con breales y estados de degradación avanzados tienen rendimientos apreciables a pesar de los altos costos operativos<sup>35</sup>. Asimismo, concluyeron que la producción de goma brea incrementa de manera sustancial los ingresos de los pequeños productores del Chaco Árido permitiendo de esta manera obtener un producto más que contribuya a los ingresos familiares, diversificando las actividades tradicionales y dándole de esta manera mayor sustentabilidad al sistema productivo.

#### **1.4.3 Obtención y comercialización de la goma brea**

La planta *Cercidium praecox* produce un exudado que brota de su tronco y sus ramas como un mecanismo adaptativo para protegerse de la pérdida de agua ante heridas de diverso origen<sup>38</sup>. Este exudado es una goma de color ámbar que se denominó “goma brea” por su capacidad adhesiva. Históricamente, esta goma ha sido recolectada manualmente por comunidades de pueblos originarios en extensas zonas del país, en especial en la región del noroeste, y se ha utilizado tradicionalmente como golosina desde tiempos pre-colombinos<sup>34</sup>.

La goma se produce realizando incisiones en el tronco, de donde comienza a exudarse al cabo de 15 o 30 días y al entrar en contacto con el aire la goma solidifica, facilitando la cicatrización de la corteza<sup>33</sup>. El exudado debe ser retirado periódicamente para facilitar una nueva exudación y para evitar un contacto prolongado con el aire y el polvo, de forma de obtener un producto de mejor calidad<sup>33</sup>. La producción de la goma se realiza en el período de septiembre a marzo, y por cada árbol adulto se puede obtener entre 100 y 300 g de goma por año<sup>33</sup>.

Luego de ser cosechada, la goma brea es sometida a un proceso de purificación, aunque actualmente no existe un método estandarizado para tal fin. En el boletín titulado “Goma

Brea: Características y aprovechamiento sustentable” realizado por la entonces Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación en el año 2015 se consignó un proceso de purificación del exudado<sup>33</sup>. En primer lugar, la goma brea se disuelve en agua y se filtra para eliminar los restos insolubles. Luego a la solución filtrada se añade etanol hasta alcanzar una concentración del alcohol del 60 % y una concentración de la goma de 12 %. En estas condiciones la goma brea es insoluble por lo que la mayor parte de la misma precipita y se separa por filtración en papel. Finalmente la goma precipitada se seca en hornos o por acción del sol y se muele<sup>33</sup>.

Por otra parte, Alesso *et al.*<sup>41</sup> informaron un procedimiento diferente donde la goma brea es sometida a un proceso de molienda y posterior disolución de la goma en agua. A la solución resultante se le agrega carbón activado para decolorarla y luego se realiza una filtración para eliminar todo el material insoluble presente como el carbón agregado, restos de corteza, polvo, etc. Finalmente la solución que se obtiene se seca por spray, obteniéndose un polvo de color blanco o ligeramente amarillo<sup>41</sup>.

#### **1.4.4 Usos y seguridad de la goma brea**

Como se mencionó anteriormente, la goma brea fue utilizada como alimento desde hace cientos de años. von Müller *et al.*<sup>42</sup> en un trabajo de 2009 realizaron una evaluación toxicológica a nivel subcrónico sobre ratones BALB, donde reportaron que no se encontró ningún efecto adverso luego de alimentar por 120 días a estos ratones con goma brea en niveles de hasta 5% del total de su dieta.

En virtud de estos resultados y “su consumo tradicional y ancestral”<sup>43</sup>, en 2012 la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos en conjunto con la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca resolvieron la incorporación de la goma brea como aditivo alimentario al Código Alimentario Argentino (CAA)<sup>43</sup>. Este exudado se incluyó en el Artículo 1398 de dicho código (apartado 72.1), donde se especifica que el mismo puede ser utilizado como agente espesante, estabilizante y emulsionante.

A diferencia de la mayoría de las gomas comerciales (a excepción de la goma arábica), la goma brea presenta una gran solubilidad en agua (mayor al 30 %)<sup>34</sup> y en estudios

preliminares se determinó que forma soluciones de baja viscosidad<sup>34</sup>. Por otro lado, Bertuzzi *et al.*<sup>34</sup> y Castel *et al.*<sup>44</sup> en trabajos publicados en 2012 y 2017 respectivamente estudiaron la capacidad de la goma brea de formar y estabilizar emulsiones de aceites en distintas concentraciones y realizaron una comparación con la goma arábica. Bertuzzi *et al.*<sup>34</sup> informaron que la goma brea posee capacidad emulsionante siendo la concentración óptima de 5% m/m. Por otro lado, Castel *et al.*<sup>44</sup> reportaron que la goma brea genera emulsiones más estables que la goma arábica pero con una viscosidad mayor, por lo que podría utilizarse como un reemplazo de esta última en aplicaciones industriales.

Además, Cecchini *et al.*<sup>45</sup> en un artículo publicado en 2017 informaron que la goma brea presenta la capacidad de formar películas comestibles en mezclas con otros materiales como cera de abejas y proteínas de la leche, empleando glicerol como agente plastificante.

Todas estas características vuelven a la goma brea interesante desde el punto de vista industrial para su utilización en distintos tipos de productos, especialmente en la industria alimentaria. A través de los años se han correlacionado las características reológicas de la goma brea con los de la goma arábica. Sin embargo, en ninguna de estas publicaciones se realizó una caracterización reológica exhaustiva de la goma brea ni se realizó una comparación profunda con las propiedades de la goma arábica para poder determinar si sus propiedades reológicas son efectivamente correlacionables.

En dos trabajos publicados en 2002<sup>46</sup> y 2007<sup>35</sup> se estimó que el costo de una tonelada de goma brea sin refinar se encuentra entre 1000 y 2500 USD. Por otro lado, el precio de una tonelada de goma arábica puede fluctuar entre 2700 y 8000 USD<sup>46</sup>. Además de presentar un costo menor, la producción de la goma arábica es inestable, ya que depende de condiciones climáticas y políticas de los países que la producen<sup>1,5</sup>. Teniendo en cuenta todos estos aspectos mencionados y la evaluación socioeconómica de la producción de la goma brea realizada von Müller *et al.*<sup>35</sup> donde determinaron su viabilidad, se ha establecido la conveniencia del reemplazo de la goma arábica con goma brea. No obstante, hasta que se inició este trabajo de Tesis se desconocía en profundidad el comportamiento reológico de la goma brea y la factibilidad de utilizarla como un reemplazo local de la goma arábica.

#### 1.4.5 Características estructurales de la goma brea

Si bien el código alimentario argentino incorporó a la goma brea como aditivo alimentario<sup>43</sup>, sus características estructurales habían sido determinadas sólo parcialmente hasta este trabajo de Tesis.

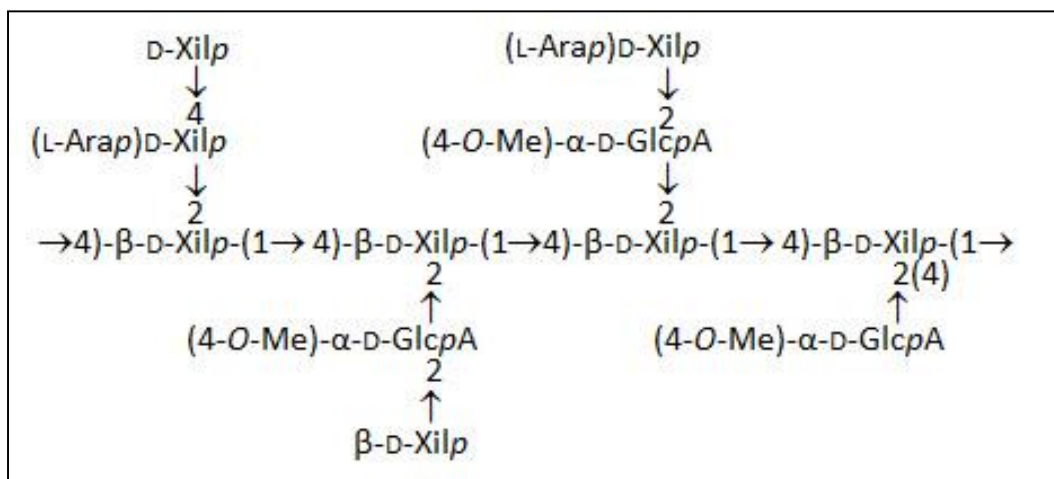
Cerezo *et al.*<sup>47</sup> fueron los primeros en estudiar este exudado, que fue extraído de árboles de *Cercidium australe* (denominación anterior a 1976, actualmente *Cercidium praecox*) ubicados en el norte de Argentina y corresponde a la misma especie estudiada en este trabajo de Tesis. Posteriormente, De Pinto *et al.*<sup>48</sup> determinaron algunas características estructurales adicionales en un trabajo publicado en 1994 realizado sobre el exudado de árboles de *Cercidium praecox* ubicados en el noroeste de Venezuela.

Se ha determinado que la goma brea está compuesta principalmente por polisacáridos<sup>47-49</sup>, los cuales están conformados principalmente por D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico y ácido 4-O-metil-D-glucurónico<sup>47,48</sup>.

En su trabajo publicado en 1969, Cerezo *et al.*<sup>47</sup> realizaron una determinación estructural parcial de los polisacáridos de este exudado donde sugirieron que los mismos presentan una estructura compleja formada por un esqueleto de unidades de  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-xilopiranosas-(1 $\rightarrow$ ) las cuales se encuentran sustituidas con D-xilosa, L-arabinosa y ácidos glucurónicos. La estructura original propuesta por los autores se presenta en la **Figura 1.11**, aunque en el trabajo citado no se especifica la cantidad de cada una de las unidades.

Posteriormente De Pinto *et al.*<sup>48</sup> reportaron algunos detalles estructurales desconocidos hasta el momento, como la presencia de grupos acetilo (sin informar su cantidad ni posición en los polisacáridos) y la existencia de arabinosa tanto en forma piranósica como furanósica. Sin embargo, como se observará en el siguiente capítulo, algunas de estas determinaciones resultaron poco claras.





**Figura 1.11.** Estructura original de los polisacáridos de la goma brea propuesta por Cerezo *et al.* en 1969.

Ambas publicaciones coincidieron en que los polisacáridos que constituyen este exudado son arabinoglucuronoxilanos complejos que presentan características estructurales similares a xilanos aislados de distintas fuentes naturales. No obstante, hasta ese momento la estructura fina de estos polisacáridos no había sido develada. Estas características estructurales preliminares indicaron que la goma brea es muy diferente estructuralmente a la goma arábica, a pesar de que en principio presentan características físico-químicas similares.

## 1.5 Xilanos extraídos de fuentes naturales

### 1.5.1 Generalidades

Los xilanos son polisacáridos que se encuentran comúnmente en plantas anuales, en árboles de maderas duras, en cereales y en una menor proporción en árboles de madera blanda<sup>50,51</sup>. Estos biopolímeros son los principales constituyentes de la hemicelulosa<sup>52</sup> y constituyen entre el 25 y 35 % en peso seco de la biomasa proveniente de los tejidos leñosos de las dicotiledóneas y de los tejidos lignificados de las monocotiledóneas, y hasta el 50 % de algunos tejidos de cereales<sup>53</sup>. Mientras que la mayor parte de los xilanos en las dicotiledóneas están presentes en las paredes celulares secundarias, en las monocotiledóneas estos polisacáridos representan el componente principal de las paredes celulares primarias<sup>50</sup>.

El término hemicelulosa fue originalmente propuesto por Schulze para designar a los polisacáridos que a diferencia de la celulosa fueran extraíbles con soluciones alcalinas, por lo que se consideró erróneamente que los mismos eran precursores de la celulosa<sup>52</sup>. En la actualidad este término se emplea para referirse a los polisacáridos, distintos del almidón y de las pectinas, que se encuentran asociados a la celulosa en las paredes celulares de las plantas terrestres<sup>52</sup> e incluye no solamente a xilanos sino también a otros biopolímeros como mananos y  $\beta$ -glucanos<sup>50,52</sup>.

Estructuralmente los xilanos poseen una estructura central de  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-xilopiranos-(1 $\rightarrow$ , la cual puede presentar distintas ramificaciones compuestas de unidades terminales o cadenas cortas<sup>50,52</sup>. Estas ramificaciones se pueden encontrar en distintas proporciones, ya sea con pocos sustituyentes terminales en la posición O-2 hasta prácticamente una sustitución total de las posiciones O-2 y O-3 de los residuos de xilosa que conforman la cadena central<sup>50</sup>. Comúnmente se encuentran como sustituyentes residuos terminales de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y su derivado 4-O-metilado, L-arabinosa y cadenas cortas compuestas de D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa y ácido (4-O-metil)- $\alpha$ -D-glucurónico<sup>50,52</sup>.

En base a los reportes existentes sobre la estructura primaria de los xilanos aislados de distintos tejidos vegetales, este tipo de polisacáridos se pueden dividir en homoxilanos y heteroxilanos. Esta última denominación incluye glucuronoxilanos (GX), arabinoxilanos (AX), arabinoglucuronoxilanos (AGX), glucuronoarabinoxilanos (GAX) y otros más complejos<sup>52</sup>. De todas formas, la ocurrencia de homoxilanos verdaderos es muy escasa<sup>50</sup>.

Cabe destacar que si bien las porciones lineales no sustituidas de estos biopolímeros pueden asociarse con cadenas de celulosa, la capacidad de los xilanos para unirse entre sí o con otros polisacáridos está disminuida en gran medida debido a que la cadena central está conformada por unidades de pentosas (xilosas), que no poseen un grupo funcional de alcohol primario externo al anillo piranósico. Esto, en conjunto con la presencia de sustituyentes, permite que estos polisacáridos puedan ser extraídos con relativa facilidad con agua o en medio básico débil<sup>50</sup>. En su forma nativa, estos biopolímeros pueden presentar como sustituyentes grupos O-acetilo en un grado considerable, los cuales son lábiles en medio básico, por lo que deben adoptarse procedimientos de extracción adecuados para no perderlos si se pretende aislar un xilano naturalmente acetilado<sup>50</sup>.

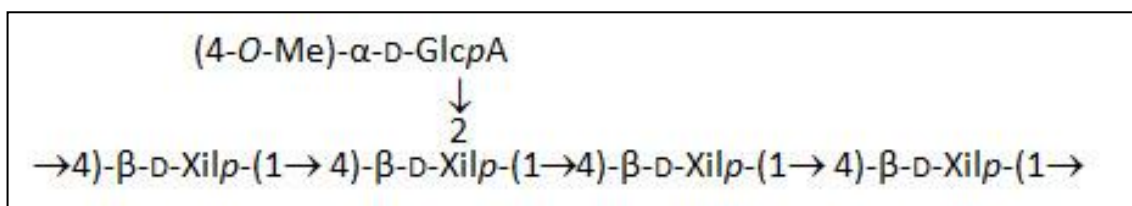
## 1.5.2 Homoxilanos

Como se mencionó anteriormente la presencia de homoxilanos puros en la naturaleza es muy rara. Estos polisacáridos sólo se han podido encontrar tanto en algas rojas como algas verdes, aunque en estos casos la estructura de la cadena principal está compuesta de unidades de  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  o bien mezclas de  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  y  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ <sup>54</sup>. En estas algas se asume que cumplen una función estructural en la arquitectura de la pared celular<sup>52,54</sup>.

## 1.5.3 Heteroxilanos

### 1.5.3.1 Glucuronoxilanos

Los glucuronoxilanos son los componentes principales de la hemicelulosa de árboles de madera dura<sup>52</sup>. La mayor parte de estos polisacáridos poseen una unidad terminal de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico, generalmente 4-O-metilado, enlazado siempre en la posición O-2 de las unidades de  $\beta$ -D-Xil de la cadena central, tal como se puede apreciar en la **Figura 1.12**<sup>52</sup>. La proporción en la que se encuentra el ácido urónico respecto de la xilosa puede variar desde 1:4 a 1:16 dependiendo de la fuente donde se obtiene el GX<sup>52</sup>.

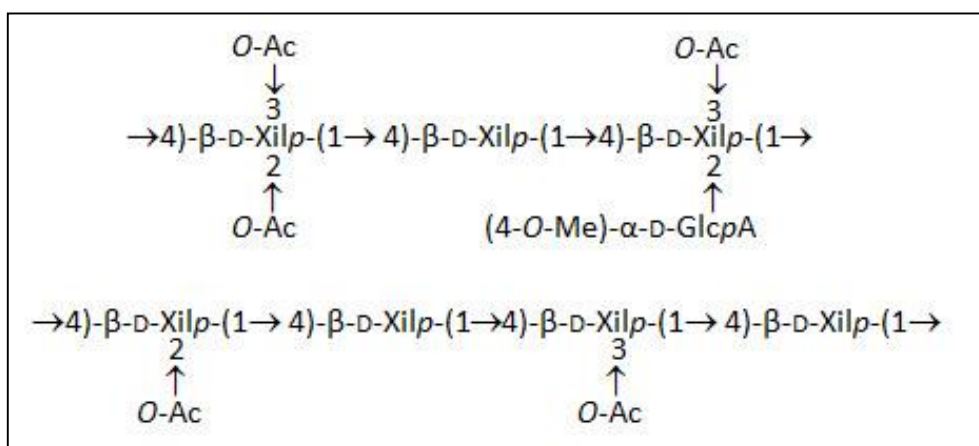


**Figura 1.12.** Estructura tipo de un glucuronoxilano (adaptado de Ebringerová *et al.*<sup>52</sup>)

Además de las estructuras tradicionales, en bibliografía se han reportado ejemplos inusuales de GX. Shatalov *et al.*<sup>55</sup> aislaron de la madera de *Eucalyptus globulus* un glucuronoxilano donde algunas de las unidades de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico presentaban un residuo de  $\alpha$ -D-galactosa en la posición 2.

Comúnmente estos glucuronoxilanos pueden presentar también grupos *O*-acetilo como sustituyentes de las unidades de xilosa de la cadena principal en una proporción entre 3 y 13 %. Sin embargo, en numerosas ocasiones estos grupos no son detectados debido a que los mismos se hidrolizan durante el proceso extractivo alcalino típicamente utilizado<sup>52</sup>. No obstante, mediante métodos de extracción alternativos se han podido aislar estos polisacáridos preservando este tipo de grupos.

Dahlman *et al.*<sup>56</sup>, en un trabajo publicado en el año 2000, realizaron el estudio sobre glucuronoxilanos acetilados extraídos de la madera del árbol *Populus tremula* (álamo) con agua en un horno de microondas a 180 °C. Los autores reportaron que los polisacáridos extraídos estaban constituidos por un esqueleto central de  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-xilopiranos-(1 $\rightarrow$  donde algunas unidades se encontraban sustituidas en posición C-2 por residuos terminales de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico y en C-3 con grupos *O*-acetilo. Además, los autores detectaron unidades de xilosa monosustituidas con grupos *O*-acetilo en las posiciones C-2 o C-3 y disustituidas en ambas posiciones con estos sustituyentes (ver **Figura 1.13**).



**Figura 1.13.** Esquema de la estructura de glucuronoxilanos extraídos de la madera de *Populus tremula* propuesta por Dahlman *et al.*<sup>56</sup>

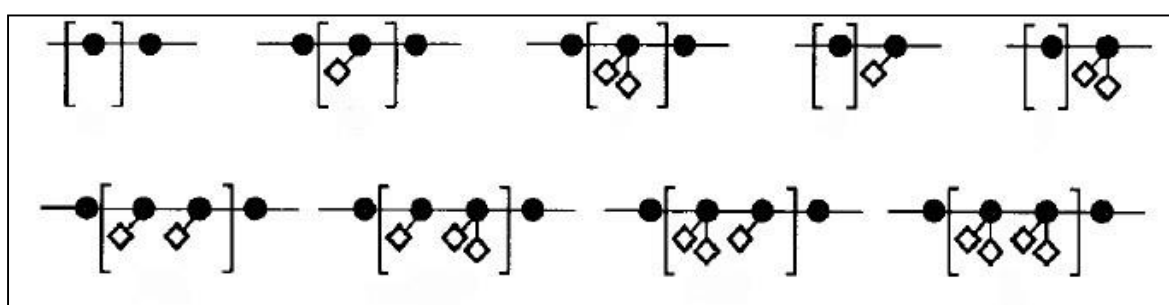
En 2013 Uhliaríková *et al.*<sup>57</sup> publicaron un estudio sobre GX extraídos con DMSO de la pulpa de *Betula pendula* (abedul). En este trabajo reportaron una estructura similar a la determinada por Dahlman *et al.*<sup>56</sup> donde los grupos *O*-acetilo se encontraban enlazados en las posiciones C-2 o C-3, ó en C-2 y C-3 de las unidades de xilosa de la cadena principal.

### 1.5.3.2 Arabinoxilanos

Los arabinoxilanos han sido identificados en los principales cereales que se comercializan, como en trigo, centeno, cebada, avena, arroz, maíz y sorgo así como en otras plantas<sup>52</sup>. Estos polisacáridos representan el componente principal de las hemicelulosas del endosperma y de las capas externas de los granos de cereal, y pueden llegar a constituir el 30 % de la masa de estos cereales<sup>52</sup>.

Estos biopolímeros presentan una cadena central lineal de unidades de  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  sustituidas en las posiciones C-3 y/o C-2 por residuos de  $\alpha$ -L-arabinofuranosas. Además, algunas de las unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa pueden encontrarse esterificadas en la posición O-5 con ácido ferúlico o ácido cumárico<sup>52</sup>.

Desde la última década del siglo pasado se han reportado estudios sobre polisacáridos con este tipo de estructuras aislados de cereales y otras fuentes<sup>58-61</sup>. Hoffman *et al.*<sup>59</sup> publicaron un trabajo en 1992 donde estudiaron las características estructurales de los AX solubles en agua extraídos del endosperma del trigo. Los autores describieron numerosos fragmentos estructurales que surgen de la combinación de residuos arabinofuranósicos como sustituyentes en distintas posiciones de las unidades de xilosa de la cadena central, tal como se aprecia en la **Figura 1.14**.



**Figura 1.14.** Fragmentos estructurales de arabinoxilanos extraídos del endosperma del trigo. Los círculos negros (●) representan unidades de  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  mientras que los rombos blancos (◊) se corresponden con unidades terminales de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (adaptado de Hoffman *et al.*<sup>59</sup>)

Si bien generalmente las unidades de arabinofuranosas se presentan como residuos terminales, se han encontrado reportes donde las mismas se encuentran conformando

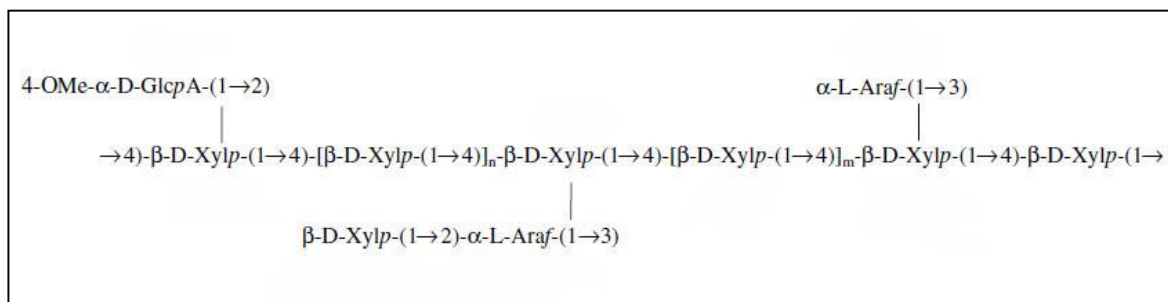


sustituídos con éstos últimos<sup>52</sup>. Los GAX suelen encontrarse en los distintos tejidos del endosperma de los granos de cereales como el trigo, el maíz y el arroz<sup>52</sup>. Tanto el grado de sustitución como la posición de los sustituyentes varía en función de la fuente de donde se extraen estos polisacáridos, lo que se refleja en la relación molar arabinosa:xilosa, el contenido de ácidos urónicos y la presencia de disacáridos.

Capek *et al.*<sup>63</sup> aislaron un AGX proveniente de las raíces de la planta *Rudbeckia fulgida* por extracción alcalina y cromatografía de intercambio aniónico. En este estudio los autores determinaron que los polisacáridos aislados estaban compuestos en un 82,3 % por xilosa, seguido de un 8,8 % de ácido 4-*O*-metil-glucurónico y un 6,8 % de arabinosa.

Por otra parte, Peña *et al.*<sup>64</sup> realizaron un estudio estructural muy extenso sobre glucuronoarabinoxilanos extraídos en medio alcalino de las paredes celulares de distintas especies de plantas monocotiledóneas, fundamentalmente del orden Commelinidae. En dicho estudio describieron que estos polisacáridos presentan una cadena central de unidades de (1→4)-β-D-xilopiranosas donde algunos de estos residuos se encuentran sustituidos en posición C-2 por disacáridos de ácido (4-*O*-metil)-α-D-glucurónico y α-L-arabinopiranosas o β-D-galactopiranosas mientras que otras unidades de la cadena central de xilosas se encuentran sustituidas por residuos terminales de α-L-arabinofuranosas en posición C-3. Debido al método extractivo empleado no pudieron determinar la presencia de grupos *O*-acetilo.

En un trabajo publicado en 2006 Høije *et al.*<sup>65</sup> extrajeron glucuronoarabinoxilanos solubles en agua de la cáscara de cebada y realizaron su determinación estructural. Como se puede observar en la **Figura 1.16**, en este caso encontraron además de residuos terminales de ácido 4-*O*-metil-α-D-glucurónico y α-L-arabinofuranosa enlazados en posiciones C-2 y C-3 respectivamente, un disacárido compuesto de β-D-Xilp-(1→2)-α-L-Araf enlazado en posición C-3 a una unidad de xilosa de la cadena central.



**Figura 1.16.** Estructura propuesta de GAX extraídos de cáscara de cebada (adaptado de Høije *et al.*<sup>65</sup>)

### 1.5.3.4 Xilanos presentes en gomas exudadas

La estructura preliminar propuesta<sup>47,48</sup> para los polisacáridos que constituyen la goma brea difiere de las estructuras antes descritas de las gomas comerciales más importantes. No obstante, existen antecedentes de D-xilanos aislados de los exudados de distintas fuentes que presentan características estructurales coincidentes con estos polisacáridos. Por ejemplo, distintos tipos de plantas como las angiospermas, algunas dicotiledóneas y monocotiledóneas presentan exudados que consisten en xilanos sustituidos<sup>50</sup>. En todos los casos, los polisacáridos que componen estas gomas se caracterizan por su solubilidad en agua, lo cual facilita su estudio<sup>50</sup>, y por la presencia de ácidos urónicos y otros azúcares conformando ramificaciones de cadenas cortas.

Un ejemplo de este tipo de exudados es la goma sapote la cual se obtiene del árbol *Manikara sapota*, que pertenece a la familia Sapotaceae y es originario de América Central<sup>50,66</sup>. Dutton y Kabir<sup>66</sup> estudiaron estructuralmente este exudado y publicaron sus resultados en 1972. Los autores determinaron que esta goma está compuesta por L-arabinosa, tanto piranósica como furanósica, D-xilosa, ácido D-glucurónico y ácido 4-O-metil-D-glucurónico en proporción 1,00:2,80;0,48;0,52. Si bien este estudio estructural no fue concluyente, se pudo determinar que los polisacáridos que componen el exudado presentan una estructura central de unidades de (1->4)-β-D-xilopiranosas, las cuales se encuentran altamente sustituidas principalmente en posición C-2 por unidades terminales de ácidos urónicos y oligosacáridos cuya composición no pudo ser elucidada<sup>66</sup>. Mediante un tratamiento enzimático con L-arabinofuranosidasa se pudieron liberar en grandes cantidades unidades de L-



arabinofuranosa aunque no se pudieron establecer las posiciones de sustitución de esta unidad en los polisacáridos<sup>66</sup>. Por las características informadas, este exudado estaría compuesto por un xilano altamente sustituido que presenta ciertas similitudes con la estructura de los polisacáridos de la goma brea.

Lelliot *et al.*<sup>67</sup> realizaron un estudio estructural sobre los polisacáridos que componen el material gomoso obtenido de los cormos de la planta *Watsonia pyramidata*. Los autores determinaron que estos polisacáridos están compuestos de una cadena central de unidades  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  sustituidas en las posiciones C-2 y C-3 por residuos de L-arabinofuranosa donde la unidad de L-Araf que se encuentra en la posición 2 presenta a su vez un residuo de  $\alpha$ -D-Galp como sustituyente en la posición C-3.

En un trabajo más reciente, Maurer-Menestrina *et al.*<sup>68</sup> estudiaron la composición de la goma exudada del árbol *Livistona chinensis* perteneciente a la familia Arecaceae. En este trabajo los autores encontraron que la misma está compuesta principalmente por xilosa, arabinosa y ácido 4-O-metil-glucurónico y presenta pequeñas cantidades de ramnosa, fucosa y galactosa. Estructuralmente este exudado presenta una cadena central de (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-xilopiranososa donde el 17% de los residuos presentan un sustituyente en la posición C-2 y el 16 % en la posición C-3. En cuanto a la identidad de los sustituyentes, las unidades de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -glucurónico se encuentran principalmente como unidades terminales en la posición C-2 mientras que se pudieron identificar cadenas laterales compuestas de fucopiranososa, arabinofuranosa y arabinopiranososa enlazadas en la posición C-3<sup>68</sup>.

Los ejemplos destacados demuestran la existencia de cierta variabilidad estructural en estos polisacáridos aunque presentan ciertas características estructurales en común.



# CAPÍTULO 2

## COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA GOMA BREA



## 2.1 Estudio de los polisacáridos de la goma brea por métodos químicos

### 2.1.1 Obtención de la goma brea

El exudado obtenido de los cortes realizados a árboles de *Cercidium praecox* ubicados en Santiago del Estero (Argentina) fue secado a temperatura ambiente por varios días para obtener un material seco que ayude a su conservación. Al momento de utilizarlo se lo suspendió en agua hasta alcanzar una concentración aproximada de 50 g/L y posteriormente se separó por filtración el material insoluble, que estaba compuesto de restos de corteza del árbol y polvo. El material obtenido se denominó goma brea cruda (**GBC**) y se obtuvo con un 68-80 % de rendimiento. Debido a que la cantidad de material insoluble adherido a la goma es diversa, los resultados de rendimientos obtenidos variaron levemente en distintos experimentos.

Posteriormente la fracción **GBC** fue disuelta nuevamente en agua a una concentración de 50 g/L y los biopolímeros constituyentes fueron precipitados por agregado de isopropanol hasta alcanzar una concentración final de 80 % del alcohol. El producto precipitado fue separado por centrifugación a 10°C y fue obtenido con un 76 % de rendimiento. Este producto se denominó goma brea purificada (**GB**) (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.2.1**) y se lo utilizó para el estudio estructural y reológico de los polisacáridos que componen la goma brea.

### 2.1.2 Caracterización química de las fracciones GBC y GB

Se determinó la composición química de las fracciones **GBC** y **GB**. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1.** Rendimientos (%<sup>a</sup>), composición (%<sup>a</sup>) de las fracciones **GBC** y **GB**.

	<b>GBC</b>	<b>GB</b>
Rendimiento	68-80 <sup>b</sup>	76 <sup>c</sup>
Carbohidratos	79	75
Proteínas	8,9	9,0
Grupos acetilo	1,8	2,6
Ácidos Urónicos	16	17

<sup>a</sup> Expresados en porcentajes m/m.

<sup>b</sup> Rendimiento calculado a partir del material de partida en base seca.

<sup>c</sup> Rendimiento calculado a partir de la fracción **GBC**.

Tanto la fracción **GBC** como la **GB** están compuestas principalmente por azúcares neutros y ácidos urónicos y por una pequeña proporción de proteínas. Las proporciones obtenidas de estos componentes presentan algunas similitudes con los valores informados en estudios previos<sup>47,48</sup>.

El primer estudio sobre las características químicas de la goma brea fue realizado en 1969 por Cerezo *et al.*<sup>47</sup>. En dicho trabajo los polisacáridos de la goma brea fueron purificados mediante disolución del exudado extraído del árbol en una solución acuosa de pH 2-2,5 y luego por precipitación con etanol al 80 %, procedimiento que fue realizado por duplicado. Los autores reportaron que la goma brea estaba compuesta por un 74 % por azúcares neutros y un 26 % por ácidos urónicos.

En un estudio posterior realizado por De Pinto *et al.*<sup>48</sup> sobre las características químicas y estructurales del exudado obtenido de árboles de *Cercidium praecox* de Venezuela se empleó un proceso distinto de purificación. En primer lugar el exudado fue extraído con etanol en frío. El material residual fue secado, disuelto en agua, filtrado y dializado por 48 h. Para la fracción obtenida los autores informaron una composición muy similar a la de Cerezo *et al.*<sup>47</sup>, 75 % de azúcares neutros y 25 % de ácidos urónicos.

Las diferencias obtenidas en este trabajo de Tesis con respecto a los valores informados en trabajos previos se pueden atribuir a la utilización de técnicas diferentes para la determinación de su composición química y al hecho de que en dichos estudios no se determinaron proteínas (ver más abajo). Además, en este trabajo se consideró el error que surge de la utilización de las técnicas de Fillisetti-Cozzi<sup>69</sup> para determinar ácidos urónicos y Dubois<sup>70</sup> para azúcares neutros y se realizó la corrección correspondiente (ver **Capítulo 5**

**Materiales y Métodos, secciones 5.3.1 y 5.3.2).** Si bien las técnicas colorimétricas son distintas, tanto los azúcares neutros como los ácidos urónicos interfieren mutuamente en cada determinación, obteniéndose de esta forma valores sobreestimados<sup>71</sup>. Para corregir dichos valores se realiza una iteración teniendo en cuenta el coeficiente de absorción y el porcentaje obtenido de cada derivado para cada colorimetría<sup>71</sup>.

En ninguno de los casos anteriores fue determinada ni cuantificada la presencia de proteínas. Sin embargo, en 2016 Castel *et al.*<sup>49</sup> publicaron un fraccionamiento y análisis de los polisacáridos de un exudado obtenido de árboles de *Cercidium praecox* de la provincia de Salta, Argentina. Los polisacáridos fueron purificados por disolución en agua, centrifugación, filtración y liofilización y posteriormente fueron fraccionados por cromatografía de interacción hidrofóbica. Los autores informaron para el exudado, utilizando el método de Kjeldahl, un 7,5 % de proteínas, un valor similar al encontrado en el presente trabajo. En dicho trabajo se determinó una proporción de polisacáridos<sup>49</sup> por diferencia del resto de los componentes cuantificados, y se informó un valor de 82 %. No se realizó una disquisición entre azúcares neutros y ácidos urónicos.

Además, en el trabajo de Castel *et al.*<sup>49</sup> de 2016 también realizaron la determinación colorimétrica de compuestos fenólicos utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu e informaron un valor de 1,25 %. Sin embargo, en el presente trabajo se realizó una determinación colorimétrica en condiciones experimentales similares<sup>72</sup> y se detectaron únicamente trazas de compuestos fenólicos. Cabe destacar que en ninguno de los espectros de resonancia magnética nuclear realizados se encontraron señales compatibles con este tipo de compuestos aunque existe la posibilidad que debido a su baja concentración no presenten señales con una intensidad apreciable.

La presencia de proteínas en la goma brea es un dato relevante ya que pueden tener un rol importante en las propiedades funcionales del exudado, tal como se ha observado en las propiedades reológicas de la goma arábiga. Por otro lado, desde un aspecto nutricional es valioso determinar la composición de aminoácidos esenciales en dichas proteínas. En un estudio preliminar realizado por Anderson *et al.*<sup>73</sup> sobre la composición de aminoácidos de las proteínas que componen el exudado de *Cercidium praecox*, se informó que estarían presentes todos los aminoácidos esenciales a excepción de triptofano y arginina. Sin embargo, dicho trabajo debe ser tomado con precaución ya que como se verá luego la composición informada

de los azúcares constituyentes de los polisacáridos de goma brea no es coincidente con los demás trabajos publicados, ni con los resultados encontrados en el presente trabajo de Tesis.

Por otro lado, en la **Tabla 2.1** se puede apreciar que las dos fracciones estudiadas contienen aproximadamente un 2 % (m/m) de grupos acetilo. La determinación cuantitativa fue realizada utilizando la técnica colorimétrica desarrollada por Hestrin<sup>74</sup>. El método colorimétrico empleado consiste en la reacción de los polisacáridos parcialmente acetilados con hidroxilamina en medio básico para formar ácidos hidroxámicos que luego, por agregado de cloruro férrico en medio ácido, forman un complejo coloreado que es cuantificado por espectroscopía UV-visible (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.3.4**). Además, como se verá posteriormente, se determinó por RMN que los grupos acetilos estaban esterificando algunos oxhidrilos de las unidades de los azúcares. En el estudio original de Cerezo *et al*<sup>47</sup> del año 1969, los autores realizaron una colorimetría similar y obtuvieron resultados positivos, aunque en ese momento los autores no lo relacionaron con la presencia de grupos acetilo, sino que lo adjudicaron a la lactonización del ácido glucurónico. Cabe recordar que en dicho trabajo los polisacáridos de la goma brea fueron purificados mediante disolución de los mismos en una solución acidificada con HCl hasta pH 2-2,5 y luego por precipitación con etanol al 80 %. Este procedimiento probablemente llevó a los autores a pensar que se estaban lactonizando los ácidos urónicos. Si bien en nuestro estudio el método de aislamiento no incluyó soluciones ácidas, decidimos explorar la posibilidad de que en ciertas condiciones ocurrieran las mencionadas ciclaciones. Al someter a la goma brea a disolución en medio ácido y empleando la técnica colorimétrica mencionada, no se encontró evidencia de que estuvieran ocurriendo procesos de lactonización. Asimismo, tampoco se observó la presencia de señales compatibles con lactonas por resonancia magnética nuclear en condiciones neutras ni ácidas. Por lo tanto es probable que los autores interpretaran erróneamente la reacción positiva con hidroxilamina y FeCl<sub>3</sub> empleada en esta técnica colorimétrica.

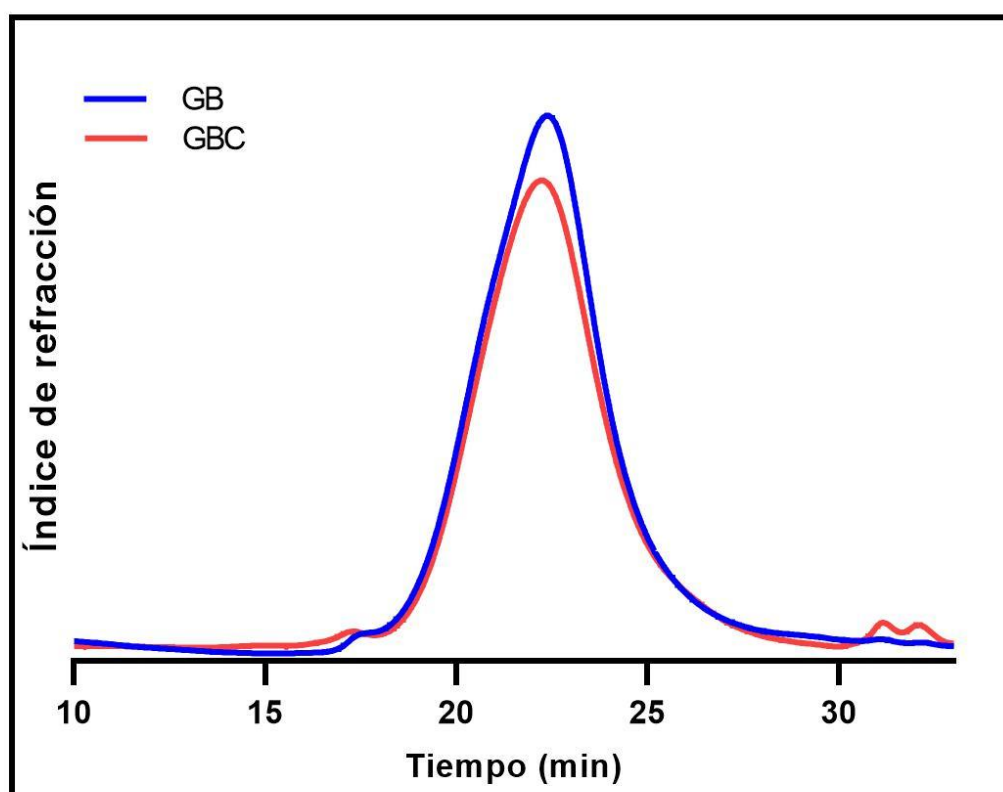
En el trabajo de De Pinto *et al*.<sup>48</sup> los autores destacaron en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C la presencia de señales cuyos desplazamientos químicos eran compatibles con los informados para los metilos de los grupos acetilo. Sin embargo, la localización en el polisacárido y la proporción de los mismos no fueron determinadas. En este trabajo de tesis, en el estudio por



resonancia magnética nuclear, se discutirá la localización de estos grupos en los polisacáridos y la complejidad adicional que aportan a la determinación estructural de los mismos.

### 2.1.3 Determinación del peso molecular de las fracciones GBC y GB

El peso molecular de las fracciones **GBC** y **GB** fue determinado por cromatografía de permeación en geles (GPC) con un detector de índice de refracción (RI) (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.3.8**). Los resultados se muestran en la **Tabla 2.2** y los perfiles cromatográficos obtenidos puede verse en la **Figura 2.1**.



**Figura 2.1.** Perfil de GPC de las fracciones **GBC** y **GB**.

**Tabla 2.2.** Peso molecular (kDa) y dispersión de las fracciones **GBC** y **GB**.

	<b>GBC</b>	<b>GB</b>
Peso Molecular a tope de pico (kDa)	111	122
Mn (kDa)	83	100
Mw (kDa)	152	171
Dispersión Mw/Mn	1,8	1,7

Como puede verse en la **Figura 2.1**, los perfiles de ambas fracciones son muy similares y en consecuencia los valores de peso molecular también lo son. Considerando el tope de cada pico se determinó que los valores de pesos moleculares para las fracciones **GBC** y **GB** son de 111 kDa y 122 kDa respectivamente. Cabe destacar que ambos perfiles cromatográficos muestran un solo pico con una dispersión ( $M_w/M_n$ ) muy similar para ambas fracciones, de 1,8 para la fracción **GBC** y de 1,7 para la fracción purificada **GB**.

Resulta llamativo que en bibliografía se encuentra una gran variabilidad de resultados en cuanto al peso molecular de los polisacáridos de la goma brea. Masuelli *et al.*<sup>75</sup> realizaron la determinación del peso molecular de los polisacáridos de goma brea empleando dos métodos distintos. Utilizaron un sistema de GPC con una columna de rango 50-2000 kDa con agua bidestilada como fase móvil y un detector de índice de refracción (RI) y por otro lado realizaron la determinación por Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Estos autores informaron valores entre 1300-2550 kDa para la determinación por GPC-RI y 2134 kDa para la determinación por DLS. En el trabajo de Castel *et al.*<sup>49</sup> anteriormente citado se estudió el peso molecular de los polisacáridos de la goma brea empleando GPC con un sistema de dos columnas en serie, una fase móvil de  $\text{NaNO}_3$  0,05 M y empleando un detector de índice de refracción. Los autores reportaron valores un tanto confusos ya que en el trabajo no queda claro si los resultados informados se encuentran expresados en Da o en kDa. Sin embargo, teniendo en cuenta los estándares de peso molecular que emplearon, es probable que el valor informado se encuentre en torno a 200 kDa, siendo éste último más cercano al encontrado en el presente trabajo de Tesis.

#### **2.1.4 Determinación de azúcares componentes de las fracciones GBC y GB**

Para poder determinar la identidad de los azúcares neutros que componen los polisacáridos de goma brea se obtuvieron los alditoles peracetilados de los hidrolizados de las fracciones **GBC** y **GB** para ser analizados por cromatografía gaseosa (CGL) con un detector de ionización de llama (FID) (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.4**). En la **Tabla 2.3** se pueden observar los resultados obtenidos.

**Tabla 2.3.** Azúcares componentes de las fracciones **GBC** y **GB** (moles/100 moles).

<b>Azúcar</b>	<b>GBC</b>	<b>GB</b>
Ara	45	44
Xil	55	56
4- <i>O</i> -Me-Glc	-	tr <sup>a</sup>
Glc	-	tr

<sup>a</sup> tr = trazas

El análisis de los azúcares que componen los polisacáridos de las fracciones **GBC** y **GB** muestra que la xilosa es el monosacárido mayoritario, seguido en un porcentaje levemente menor por la arabinosa. Además se encontraron trazas de glucosa y de 4-*O*-metilglucosa.

Cabe señalar que los ácidos urónicos presentan una velocidad de hidrólisis de su enlace glicosídico más lenta que los azúcares neutros<sup>76</sup> en condiciones de hidrólisis típicas (120°C, TFA (ácido trifluoroacético) 2 M), por lo que se hidrolizan de forma subcuantitativa. Además, el C-6 no puede reducirse utilizando NaBH<sub>4</sub>, por lo que los mismos no pueden ser detectados con la técnica utilizada. Para evitar este inconveniente respecto a la hidrólisis de los ácidos urónicos, normalmente se realiza una reducción previa de los mismos y de esta manera los ácidos urónicos se convierten en azúcares neutros plausibles de ser hidrolizados y determinados en las condiciones empleadas como sus contrapartes reducidas en C-6. En nuestro trabajo se empleó para su reducción la técnica de Taylor y Conrad<sup>77</sup> con pequeñas modificaciones.

En un primer paso de reacción se activan los ácidos carboxílicos empleando una carbodiimida soluble en agua, en este caso la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y luego en un segundo paso de reacción se utiliza NaBH<sub>4</sub> para realizar la reducción de los ácidos carboxílicos activados. Este procedimiento debía ser realizado por duplicado para obtener un producto totalmente reducido. En nuestro trabajo se optimizó la reacción de reducción para los polisacáridos de goma brea de forma de poder obtener un producto con trazas de ácidos urónicos sin la necesidad de realizar el procedimiento por duplicado.

En la **Tabla 2.4** se muestran las condiciones experimentales propuestas por Taylor y Conrad para la etapa de reducción con NaBH<sub>4</sub> y las modificaciones realizadas para optimizar la reacción de reducción de los polisacáridos de goma brea en conjunto con los resultados

obtenidos de la colorimetría de ácidos urónicos sin corrección. El primer paso de la reacción se realizó siguiendo el procedimiento experimental propuesto por los autores<sup>77</sup>.

**Tabla 2.4.** Condiciones experimentales empleadas para la reacción de reducción de los ácidos carboxílicos de **GB**.

	<b>NaBH<sub>4</sub></b> <b>(mmol)</b>	<b>Tiempo</b> <b>(min)</b>	<b>pH</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Ácidos urónicos (%)</b>
Taylor y Conrad	50	60	7	25	4
Taylor y Conrad modificado	50	60	8,5 - 9	45 – 50	0

Como se observa en la **Tabla 2.4**, mediante la reacción de reducción optimizada para los polisacáridos de goma brea se logró obtener un producto con un menor porcentaje de ácidos urónicos que con las condiciones sugeridas por Taylor y Conrad. Al aplicar las correcciones explicadas en la **sección 2.1.2** se obtuvo un producto con trazas de ácidos urónicos que se denominó **GBR** (goma brea reducida). La composición química del producto **GBR** puede observarse en la **Tabla 2.5**.

**Tabla 2.5.** Rendimientos (%<sup>a</sup>), composición (%<sup>a</sup>) y peso molecular del producto **GBR** en comparación con la fracción **GB**.

	<b>GB</b>	<b>GBR</b>
Rendimiento	76	78 <sup>b</sup>
Carbohidratos	75	81
Proteínas	9,0	3,6
Grupos acetilo)	2,6	2,9
Ácidos Urónicos	17	0
Peso Molecular a tope de pico (kDa)	122	71
Dispersión (Mw/Mn)	1,7	1,9

<sup>a</sup> Expresados en porcentajes m/m.

<sup>b</sup> Rendimiento calculado a partir de la fracción **GB**.

En la **Tabla 2.5** puede observarse que se pudieron reducir de forma completa los ácidos urónicos presentes en la goma brea mediante el método empleado. En contraste, la proporción de grupos acetilo respecto de azúcares neutros no varió con respecto a la fracción **GB**, lo cual es indicativo de la resistencia de los mismos a las condiciones empleadas durante la reducción. En cuanto al peso molecular obtenido para el producto **GBR** el valor obtenido a

tope de pico fue de 71 kDa, cercano a la mitad de lo obtenido para **GB**. Esta disminución del peso molecular implica que en promedio ocurrió una única ruptura en la cadena principal de los polisacáridos, por lo que en la práctica representa muy poca degradación.

El porcentaje de proteínas obtenido para **GBR** fue menor, lo que indica que posiblemente las condiciones de reacción pueden haber generado fragmentos proteicos de menor peso molecular que fueron perdidos en la purificación por diálisis.

Los azúcares neutros del producto reducido **GBR** se determinaron mediante la generación de los correspondientes alditoles peracetilados y posterior análisis por CG. Los resultados se presentan en la **Tabla 2.6**, y son comparados con los resultados obtenidos para la fracción **GB** (**Tabla 2.2**).

**Tabla 2.6.** Azúcares componentes de la fracción **GB** y del producto **GBR** (moles/100 moles).

Azúcar	GB	GBR
Ara	44	24
Xil	56	55
4- <i>O</i> -Me-Glc	tr <sup>a</sup>	12
Glc	tr	9

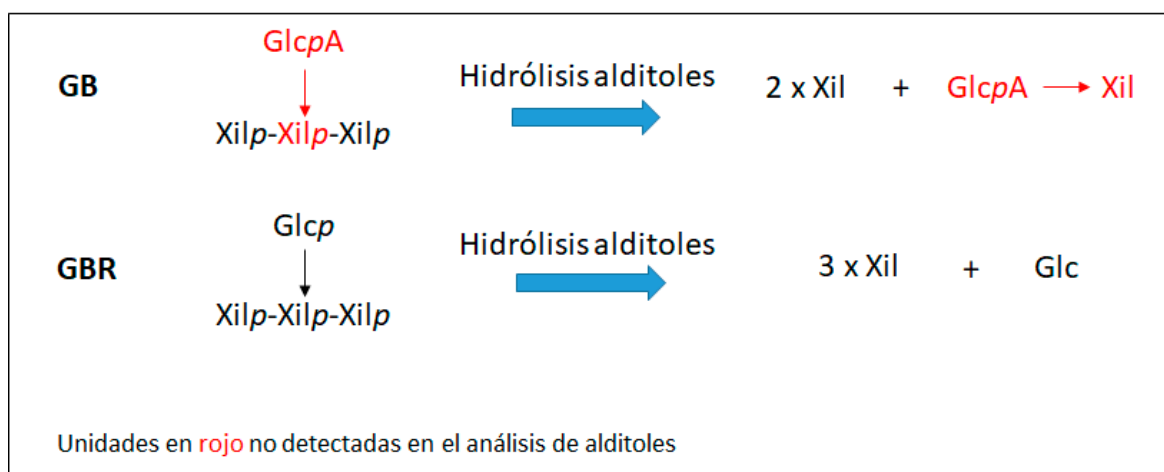
<sup>a</sup> tr = trazas

Al analizar los resultados obtenidos para el producto **GBR** se observa la presencia de glucosa y 4-*O*-metilglucosa en porcentajes del 9% y 12% respectivamente. Además, se aprecia que la cantidad de arabinosa disminuye de 44% en **GB** a 24% en **GBR**, lo cual está asociado con la aparición de las nuevas unidades de glucosa y 4-*O*-metilglucosa. Sin embargo, se observa que el porcentaje de xilosa no varía significativamente (56% en **GB** y 55% en **GBR**).

La prácticamente nula variación de los valores de xilosa entre ambas fracciones puede explicarse teniendo en cuenta los estudios previos sobre los polisacáridos de goma brea<sup>47,48</sup> que proponen que las unidades de ácidos urónicos se encuentran enlazadas a unidades de xilosa que conforman la cadena principal. Debido a la resistencia a las condiciones de hidrólisis del enlace glicosídico de los ácidos urónicos<sup>76</sup>, luego del paso inicial de hidrólisis, al menos una parte de las unidades de xilosa sustituidas con ácidos urónicos quedarían formando disacáridos (ver **Figura 2.2**), razón por la cual no son detectadas por la técnica cromatográfica

empleada. Al realizar la hidrólisis para determinar la proporción de los azúcares neutros del producto **GBR**, los azúcares correspondientes a los ácidos urónicos reducidos son hidrolizados sin inconvenientes y por lo tanto no queda un remanente de unidades de xilosa formando disacáridos, permitiendo detectar y cuantificar la totalidad de las unidades de xilosa que estaban originalmente enlazadas a los ácidos urónicos (**Figura 2.2**).

Este fenómeno produce un aumento relativo de unidades de xilosa cuantificadas en **GBR** respecto de la fracción original **GB**. Sin embargo, al mismo tiempo se observa un efecto compensatorio entre este aumento y la disminución que surge de la incorporación de los azúcares correspondientes a los ácidos urónicos reducidos (Glc y 4-*O*-Me-Glc) al total de azúcares neutros. Es decir, estos efectos se contrarrestan generando una diferencia muy pequeña en la proporción de unidades de xilosa entre la fracción **GB** y el producto **GBR**. De estos resultados se desprende que la cantidad de xilosa encontrada en la fracción **GB** está subcuantificada en comparación a la arabinosa y deja en evidencia que el estudio por cromatografía gaseosa de las fracciones de la goma brea reducidas permite obtener conclusiones mucho más representativas de la composición de los polisacáridos del exudado.



**Figura 2.2.** Esquema de hidrólisis de ácidos urónicos y unidades de xilosa presentes en **GB** y su variante reducida **GBR**.

Del análisis de la fracción reducida **GBR** se desprende que la relación molar de arabinosa y xilosa encontrada en el presente trabajo es de 1 a 2,3, mientras que en el trabajo original de Cerezo *et al.*<sup>47</sup> se reportó para una fracción reducida un valor de 1 a 3,7. La menor cantidad de arabinosa encontrada en el mencionado trabajo puede explicarse por el método empleado

por los autores para la purificación de los polisacáridos. Como se verá luego, parte de las unidades de arabinosa constituyentes de los polisacáridos de goma brea se encuentran en forma furanósica, las cuales presentan una velocidad de hidrólisis ácida mayor que los azúcares piranósicos en las mismas condiciones<sup>76,78,79</sup>. Como ya se mencionó anteriormente, los autores de dicho trabajo utilizaron una solución de pH 2 en el proceso extractivo, por lo que es posible que algunos residuos de arabinosa se hayan hidrolizado durante la purificación de los polisacáridos. De esta manera, los biopolímeros precipitados por Cerezo *et al.*<sup>47</sup> probablemente hayan perdido parte de sus unidades de arabinosa furanósicas, obteniendo un producto enriquecido en xilosa. Este hecho seguramente llevó a que la estructura informada por los autores para los mencionados polisacáridos no contemplara la presencia de arabinosas furanósicas.

Asimismo, en el estudio realizado por De Pinto *et al.*<sup>48</sup> se informó una relación molar de arabinosa y xilosa idéntica a la del trabajo de Cerezo *et al.*<sup>47</sup> de 1:3,7. Sin embargo dicha relación se calculó sobre la goma original y no sobre una fracción reducida. Los autores detectaron por estudios de metilación la presencia de arabinosa piranósica y furanósica, aunque no realizaron una cuantificación de cada uno de los residuos que encontraron.

Es importante destacar que se han encontrado trabajos en literatura que presentan algún tipo de estudio sobre la composición de la goma brea y que difieren con los resultados presentados por Cerezo *et al.*<sup>47</sup> y De Pinto *et al.*<sup>48</sup>. Anderson *et al.*<sup>73</sup> en 1990 informaron que la goma brea poseía un 34 % de unidades de ácido galacturónico. No obstante, ni en este trabajo de Tesis ni en los trabajos anteriormente citados se ha podido determinar la presencia del mencionado ácido urónico. Además, Castel *et al.*<sup>49</sup> en 2016 sugirieron que las proteínas que se encuentran en la goma brea estarían probablemente formando complejos con arabinogalactanos (AGP), lo que implicaría la presencia de unidades de galactosa en la estructura de los polisacáridos. Sin embargo, esta afirmación tampoco pudo ser respaldada por el estudio por métodos químicos realizado en este trabajo de Tesis sobre **GB** y los distintos productos obtenidos. Tampoco se encontraron señales compatibles con este tipo de residuos en el exhaustivo análisis estructural realizado por resonancia magnética nuclear (**sección 2.2**). Otros trabajos<sup>75,80</sup> donde se presentan diversas aplicaciones de la goma brea han replicado parte de los resultados informados por Anderson *et al.*<sup>73</sup> y Castel *et al.*<sup>49</sup>, generando cierta confusión sobre la composición real de los polisacáridos mencionados.

Por lo tanto la determinación de la verdadera estructura de los polisacáridos que componen la goma brea es importante y adquiere mayor relevancia desde el momento que el Código Alimentario Argentino autoriza en el año 2012 el uso de la goma brea como aditivo alimentario<sup>43</sup>. Como se verá posteriormente en detalle, todas las evidencias experimentales mostradas en este trabajo de Tesis indican claramente que los polisacáridos de la goma brea son arabinoglucuronoxilanos.

### **2.1.5 Determinación de la configuración absoluta de las unidades de xilosa y arabinosa presentes en los polisacáridos de la goma brea**

Se determinó la configuración de las unidades de xilosa y arabinosa constituyentes de los polisacáridos de la goma brea por cromatografía gaseosa siguiendo la técnica descrita por Cases *et al.*<sup>81</sup> (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.4.4**). La determinación se realizó generando diasterómeros de aminoalditoles peracetilados por aminación reductiva empleando la amina quiral (*S*)-metilbencilamina. Los derivados luego se analizaron por cromatografía gaseosa y se asignaron según sus tiempos de retención.

Mediante esta metodología se pudo determinar que las unidades de arabinosa se encuentran con configuración L mientras que las unidades de xilosa se encuentran con configuración D.

La configuración absoluta de los residuos de ácidos urónicos se podría haber determinado empleando para el análisis el producto reducido **GBR**. Sin embargo, dada la baja resolución que presenta esta técnica para las unidades de glucosa, no puede determinarse fehacientemente la configuración de estos residuos por esta técnica. De todas formas, todos los antecedentes bibliográficos encontrados sobre este tipo de polisacáridos informan que el ácido glucurónico y su derivado metilado en *O*-4 pertenecen en todos los casos a la serie D<sup>50</sup>. En conjunto con los estudios previos de asignación de señales de RMN en glucuronoxilanos, en la sección de análisis por resonancia magnética nuclear se muestra la existencia de los ácidos urónicos mencionados con configuración  $\alpha$ -D.



### 2.1.6 Análisis por metilación de la fracción GB y el producto GBR

Para obtener información sobre el tipo de unión de los distintos residuos en los polisacáridos de goma brea se permitilaron las fracciones **GB** y **GBR** empleando el método de Ciucanu y Kerek que se realiza utilizando  $\text{ICH}_3$  y NaOH pulverizado en DMSO. Los productos permitilados se hidrolizaron y derivatizaron como alditoles y aldononitrilos peracetilados para ser analizados cuantitativamente por cromatografía gaseosa utilizando un detector FID. En los casos en los que fue necesario, se confirmó la identidad de los analitos empleando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentajes molares de cada unidad permitilada o como moles de cada monosacárido permitilado por cada 100 moles de las unidades de xilosa que conforman la cadena principal del polisacárido (unidades de monosacárido/100 unidades de xilosa de cadena).

Las unidades consideradas de cadena son aquellas enlazadas por las posiciones 1 y 4. Al tratarse de residuos piranósicos, las posiciones libres y plausibles de metilación son la 2 y/o la 3. Por lo tanto las unidades de xilosa de cadena están comprendidas por la suma de los alditoles peracetilados de la 2,3-di-*O*-metilxilosa (2,3-*O*-Me-Xil), la 2-*O*-metilxilosa (2-*O*-Me-Xil), la 3-*O*-metilxilosa (3-*O*-Me-Xil) y la xilosa (Xil).

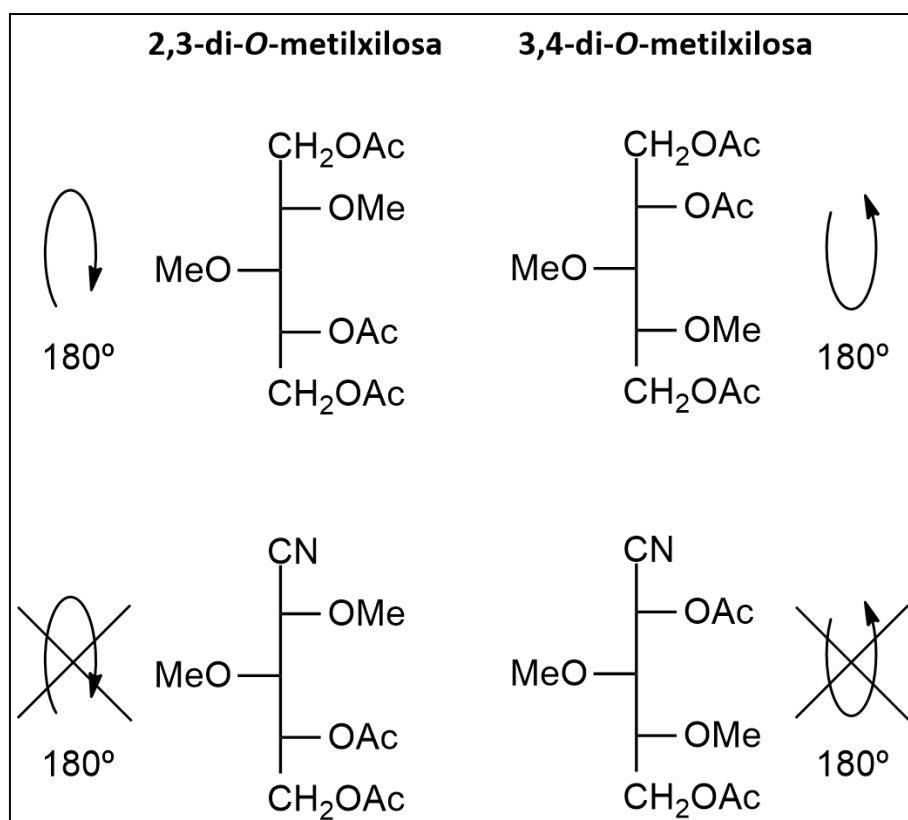
Cabe señalar que como las condiciones utilizadas para permitir el polisacárido emplean NaOH, no es posible localizar los grupos acetilos mediante esta técnica dado que estos grupos son lábiles en las condiciones experimentales. Se intentó permitir los productos bajo condiciones más suaves en un medio neutro, empleando trifluorometansulfonato de metilo en fosfato de trimetilo (método de Prehm<sup>82</sup>). En todos los casos se obtuvieron productos con altos porcentajes de submetilación, de manera que los resultados obtenidos no eran representativos y por lo tanto no fueron analizados.

#### 2.1.6.1 Resolución de metilpentosas peracetiladas

Los derivados metilados 2,3-di-*O*-metilxilosa y 3,4-di-*O*-metilxilosa obtenidos en el proceso de metilación e hidrólisis dan lugar posteriormente a alditoles acetilados que son en

realidad enantiómeros (ver **Figura 2.3**) y por lo tanto son indistinguibles por cromatografía gaseosa utilizando columnas no quirales. Para poder distinguir la proporción de cada unidad se generaron los aldononitrilos peracetilados de manera de evitar la simetría y así romper la isomería (ver **Figura 2.3**), de modo de poder resolverlos por CG<sup>83</sup>.

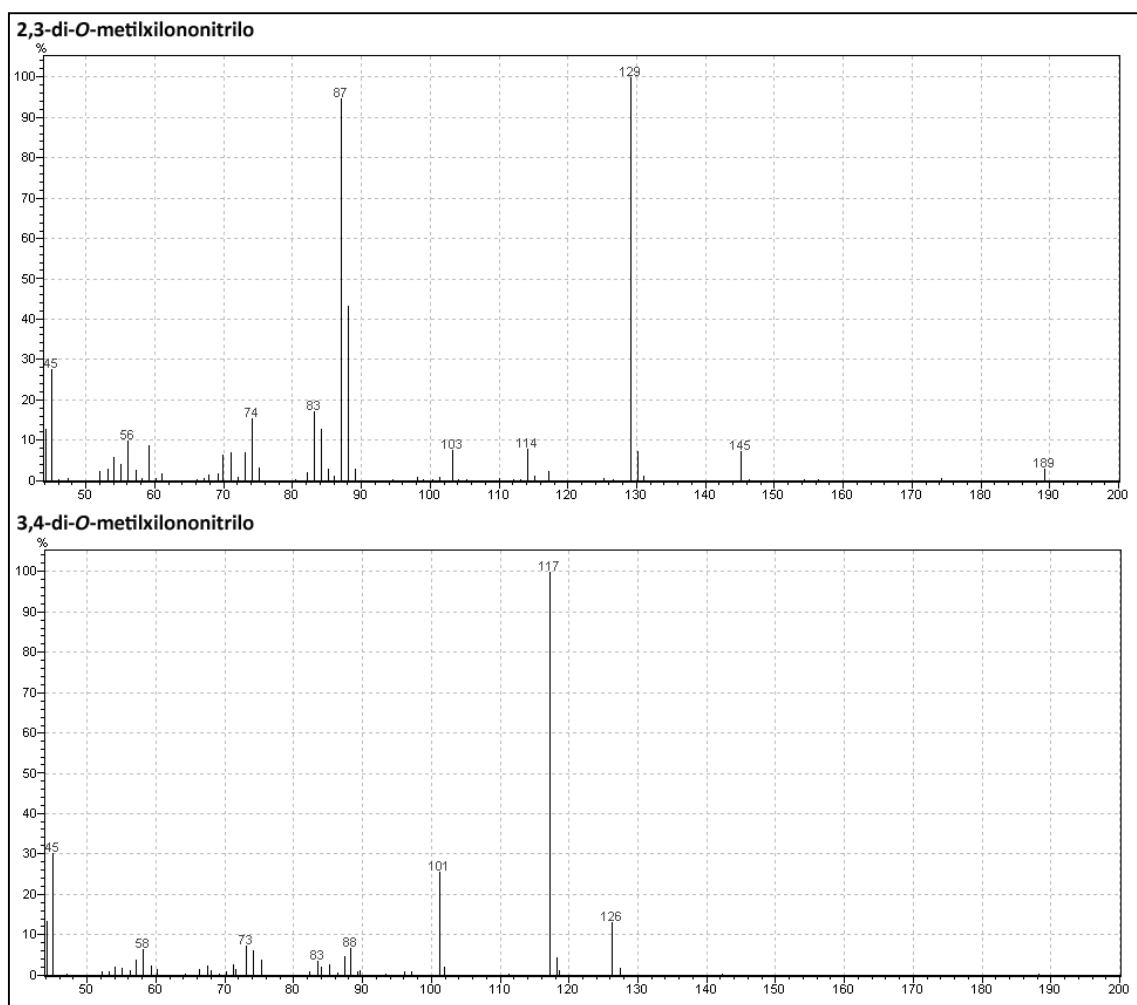
Para confirmar la identidad de cada unidad, se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado con espectrometría de masa con ionización por impacto electrónico (CGL-IE-EM). Para cada derivado se buscaron los picos con valor  $m/z$  diagnóstico, los cuales se corresponden a las fragmentaciones más probables de cada uno, ya que el ión molecular no suele observarse con dicha fuente de ionización en las condiciones empleadas.



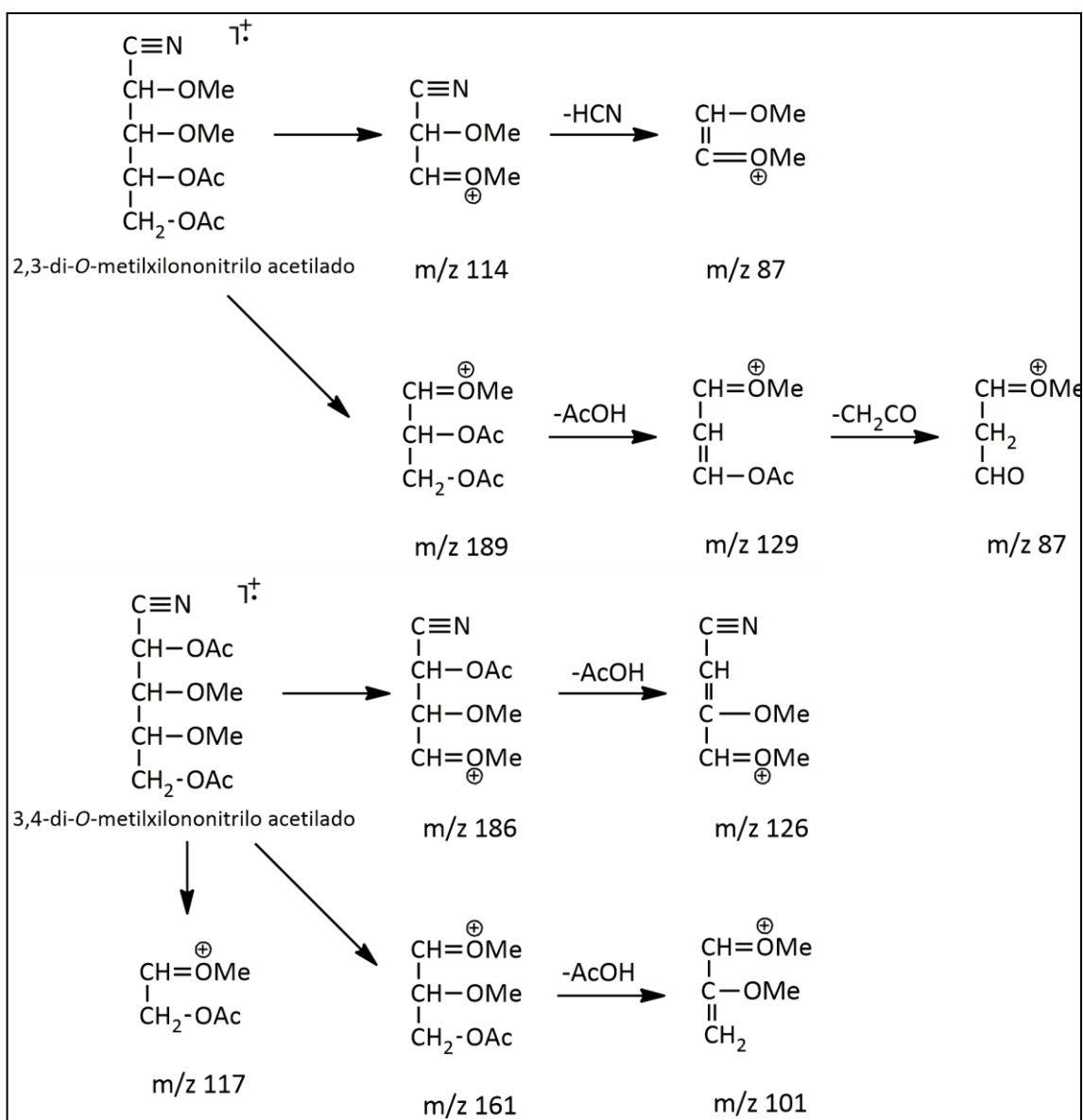
**Figura 2.3.** Alditoles y aldononitrilos peracetilados correspondientes a las unidades de 2,3-di-O-Me-Xil y 3,4-di-O-Me-Xil.

En bibliografía<sup>84-86</sup> se encuentran estudios completos de fragmentación de aldononitrilos de hexosas alquiladas, por lo que generalmente la identificación de ese tipo de monosacáridos es sencilla. Sin embargo, la información correspondiente a las fragmentaciones más probables de los derivados metilados de los aldononitrilos de pentosas

es muy escasa, encontrándose unos pocos ejemplos en la bibliografía disponible<sup>86,87</sup>. Por dicha razón, para asignar cada uno de los picos del cromatograma se tuvo que realizar un análisis previo de las fragmentaciones de estos derivados. En la **Figura 2.4** se muestran los espectros de masa de los derivados acetilados de 2,3-di-*O*-metilxilononitrilo y 3,4-di-*O*-metilxilononitrilo y en la **Figura 2.5** se presentan las fragmentaciones más probables de dichos derivados.



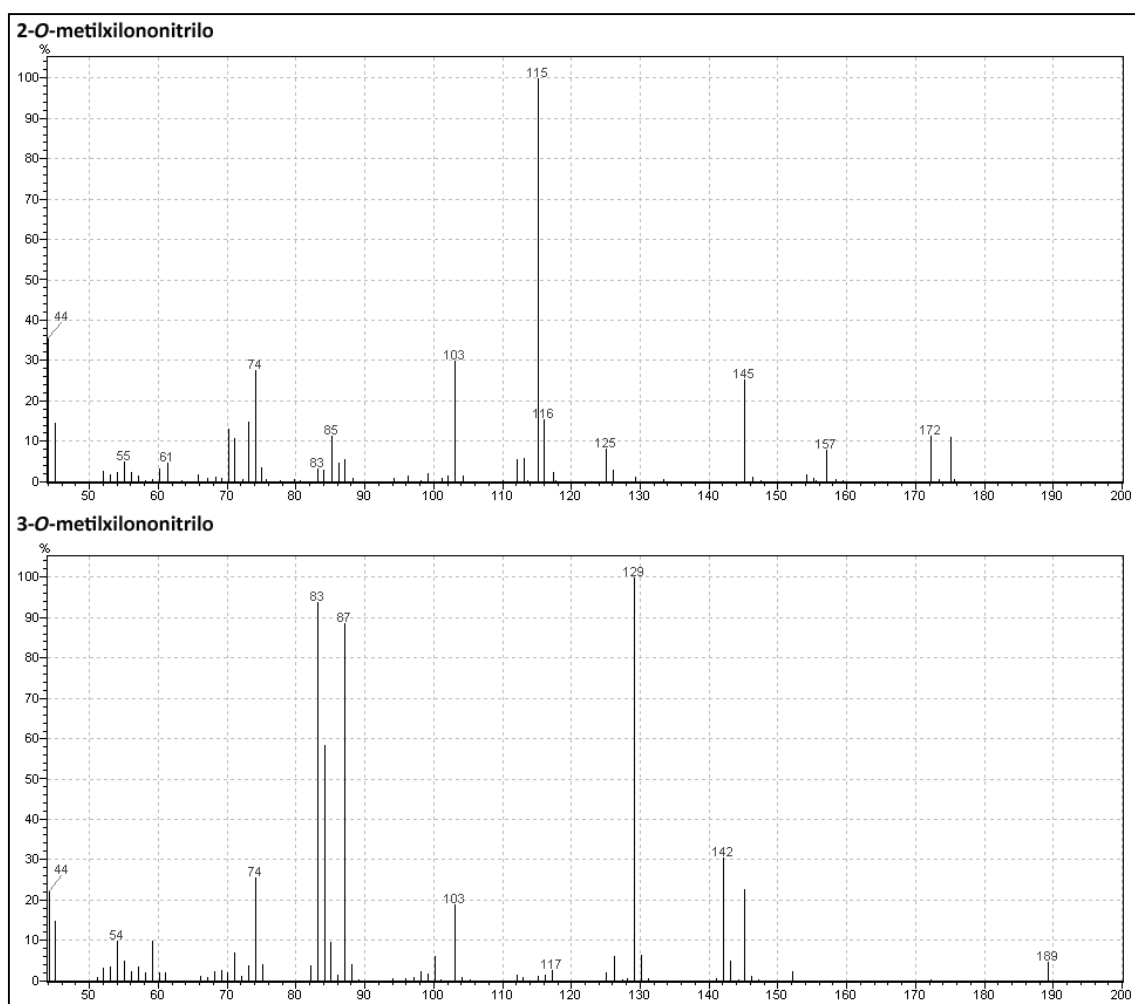
**Figura 2.4.** Espectros de masa de los derivados peracetilados de 2,3-di-*O*-metilxilononitrilo y 3,4-di-*O*-metilxilononitrilo.



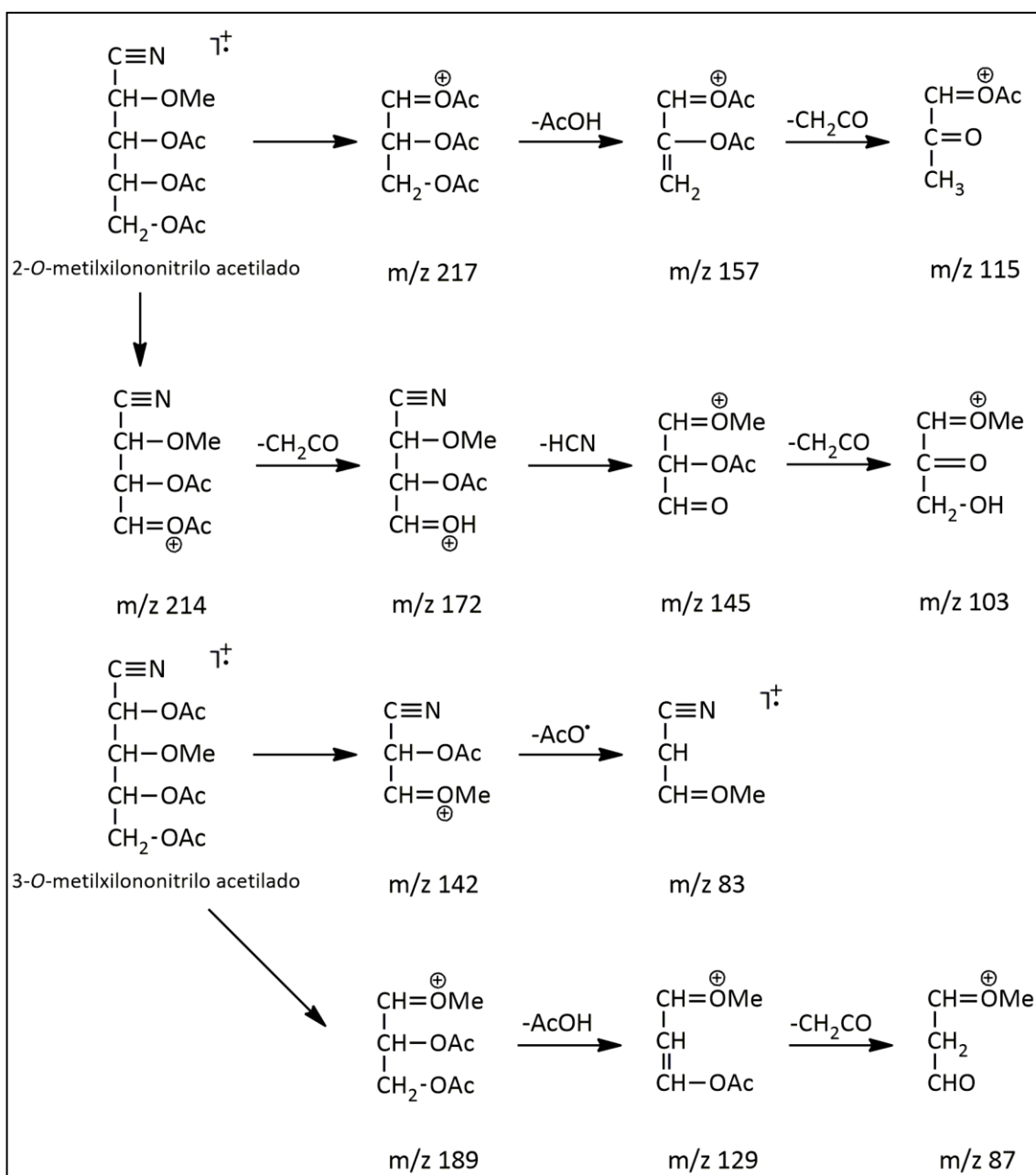
**Figura 2.5.** Fragmentaciones más importantes de los derivados peracetilados 2,3-di-O-metilxilonitrilo y 3,4-di-O-metilxilonitrilo.

Como puede observarse en las figuras anteriores los iones moleculares de los analitos no son detectados. Coincidentemente con antecedentes bibliográficos<sup>84-86</sup>, se encontró que las fragmentaciones más probables por impacto electrónico de este tipo de derivados son aquellas donde el enlace que se rompe se encuentra adyacente a un grupo O-metilo, soportándose la carga sobre estos. La generación de estos fragmentos determina los perfiles de los espectros de masa. Las fragmentaciones posteriores implican la pérdida de moléculas neutras como ácido acético, ácido cianhídrico y cetena.

Una situación similar se observó con las unidades 2-*O*-metilxilosa y 3-*O*-metilxilosa ya que a pesar de no formar alditoles peracetilados simétricos, no pueden resolverse en las condiciones cromatográficas empleadas<sup>83,88,89</sup>. La proporción específica de cada unidad pudo determinarse mediante el análisis de los aldononitrilos peracetilados. La confirmación de la identidad de cada pico se realizó mediante el mismo procedimiento que los derivados dimetilados mostrados anteriormente. Se realizó un análisis previo de sus fragmentaciones más probables y de los picos con valores *m/z* mayoritarios. En las **Figuras 2.6 y 2.7** se muestran los espectros de masa de los derivados peracetilados de 2-*O*-metilxilnonitrilo y 3-*O*-metilxilnonitrilo y las fragmentaciones más probables de estos derivados respectivamente.



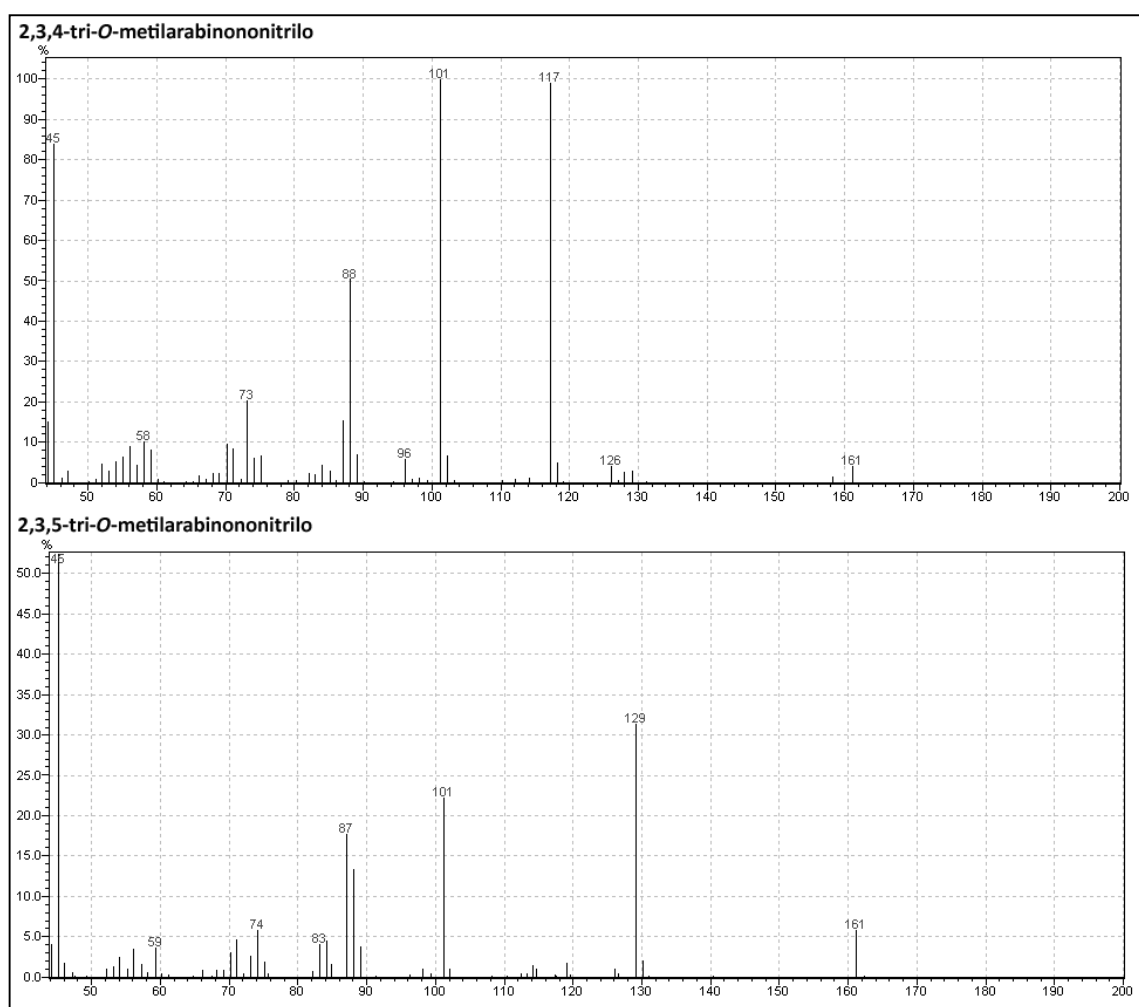
**Figura 2.6.** Espectros de masa de los derivados peracetilados 2-*O*-metilxilnonitrilo y 3-*O*-metilxilnonitrilo.



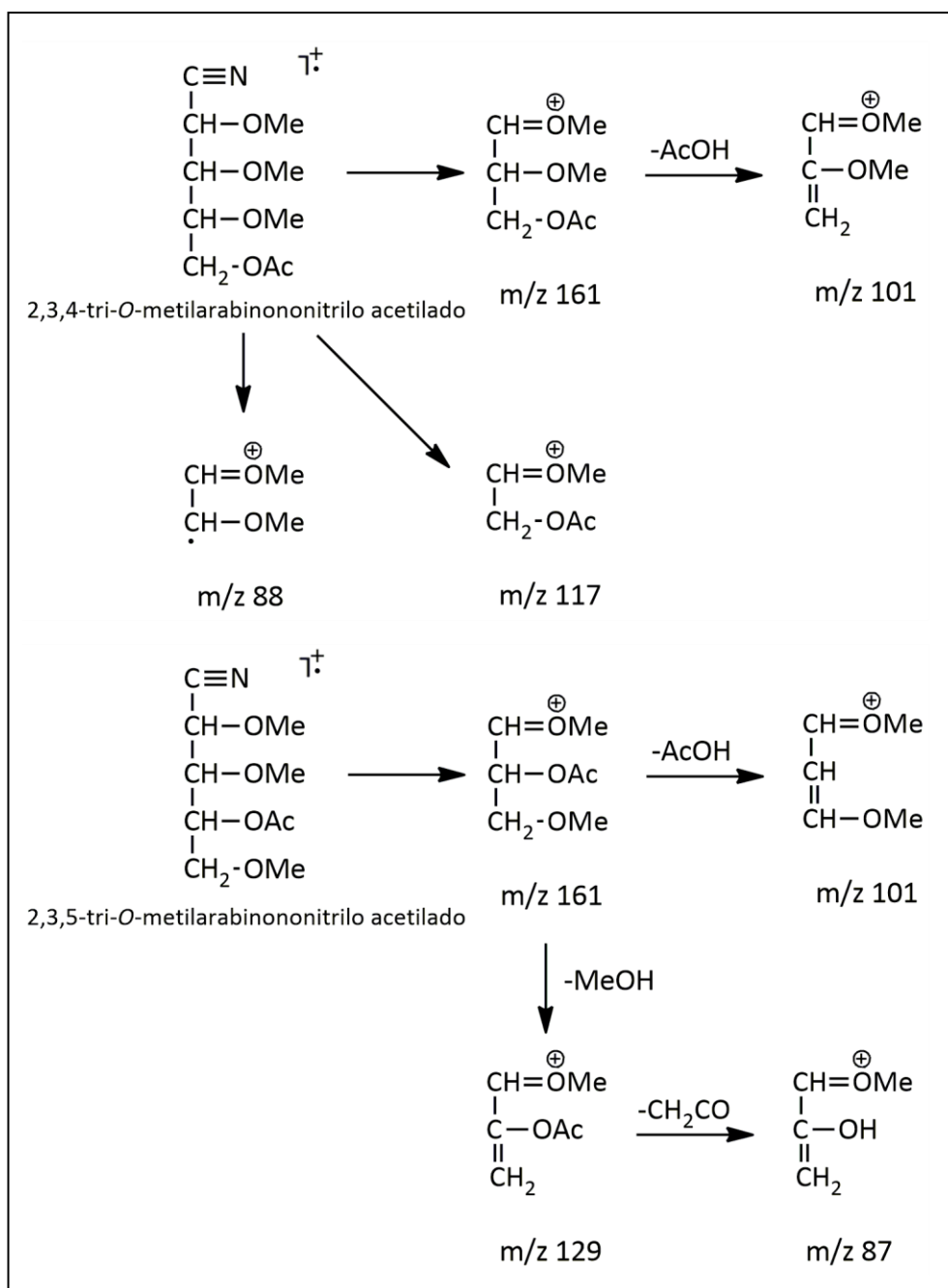
**Figura 2.7.** Fragmentaciones más importantes de los derivados peracetilados 2-O-metilxilononitrilo y 3-O-metilxilononitrilo.

Al igual que lo analizado anteriormente, en los espectros de masa mostrados no pueden observarse los iones moleculares de los analitos analizados. Asimismo se puede apreciar que los picos mayoritarios se corresponden con las fragmentaciones donde el enlace que se rompe se encuentra adyacente a un grupo *O*-metilo. Cabe destacar que en la generación del fragmento de valor de *m/z* 83 se observa la pérdida de un radical acetato, lo cual si bien no es común ha sido reportado en bibliografía anteriormente<sup>85</sup>.

Asimismo, en bibliografía prácticamente no se pudo encontrar información relativa a los espectros de masa y las fragmentaciones más probables de los aldononitrilos permetilados correspondientes a residuos piranósicos y furanósicos de pentosas terminales. Únicamente en el trabajo de Tesis del Dr. Stortz<sup>85</sup> se encontró un análisis del espectro de masa del derivado 5-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metilxilononitrilo. Por lo tanto se realizó el análisis de fragmentaciones más probables sobre los espectros de los derivados 2,3,4-tri-*O*-metilarabinonitrilo y 2,3,5-tri-*O*-metilarabinonitrilo correspondientes a residuos piranósicos y furanósicos terminales respectivamente. En las **Figuras 2.8** y **2.9** se observan los espectros de masa y las fragmentaciones más probables de dichos derivados respectivamente.



**Figura 2.8.** Espectros de masa de los derivados peracetilados 2,3,4-tri-*O*-metilarabinonitrilo y 2,3,5-tri-*O*-metilarabinonitrilo



**Figura 2.9.** Fragmentaciones más importantes de los derivados peracetilados 2,3,4-tri-O-metilarabinonitrilo y 2,3,5-tri-O-metilarabinonitrilo.

En los espectros de masa obtenidos de los derivados aldononitrilos permetilados correspondientes a residuos de pentosas terminales se puede apreciar que se obtienen varios picos con intensidades importantes, a diferencia de los espectros anteriores donde en general se obtuvieron uno o dos picos mayoritarios. Ese hecho se puede explicar por la presencia de tres grupos *O*-metilo en estos derivados que provoca una fragmentación más dirigida de los mismos.



La proporción relativa determinada en el análisis por aldononitrilos peracetilados fue aplicada en los resultados cuantitativos obtenidos en el análisis por CGL de los alditoles peracetilados. Los resultados se muestran en la **Tabla 2.7** y la **Tabla 2.8**.

### 2.1.6.2 Análisis de resultados por metilación

En la **Tabla 2.7** pueden observarse los resultados del análisis por metilación de las fracciones **GB** y **GBR** expresados según los porcentajes molares obtenidos. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de disminución de cada derivado al pasar de la fracción **GB** al producto **GBR**.

**Tabla 2.7.** Análisis por metilación de los alditoles peracetilados de la fracción **GB** y el producto **GBR**. Valores expresados como moles/100 moles.

Monosacárido <sup>a</sup>	Unidad	GB	GBR	Diferencia (%)
<b>2,3,5-Ara</b>	Araf <sub>t</sub>	5,6	3,9	29
<b>2,3,4-Ara</b>	Arap <sub>t</sub>	20,7	15,6	24
<b>2,5-Ara</b>	→3)-Araf	3,9	2,8	29
<b>2,3-Ara</b>	→5)-Araf <sup>d</sup>	1,3	0,9	27
<b>2,3,4-Xil</b>	Xilp <sub>t</sub>	20,2	13,6	33
<b>2,3-Xil<sup>b</sup></b>	→4)-Xilp	7,6	5,3	31
<b>3,4-Xil<sup>b</sup></b>	→2)-Xilp	1,0	1,0	0
<b>3-Xil<sup>c</sup></b>	→2,4)-Xilp	33,4	28,1	16
<b>2-Xil<sup>c</sup></b>	→3,4)-Xilp	4,5	4,3	5
<b>Xil</b>	→2,3,4)-Xilp	1,9	1,1	39
<b>2,3,4,6-Glc</b>	Glc p <sub>t</sub>	-	7,9	-
<b>3,4,6-Glc</b>	→2)-Glc p	-	14,9	-

<sup>a</sup> Alditoles peracetilados que poseen grupos metilo en las posiciones especificadas. Ejemplo 2,3-Xil corresponde a 2,3-di-*O*-metilxilosa

<sup>b</sup> Dado que los alditoles son enantiómeros, la proporción relativa de cada uno fue determinada realizando los aldononitrilos peracetilados.

<sup>c</sup> Como los alditoles no se resuelven en las condiciones ensayadas, se distinguieron realizando los aldononitrilos peracetilados<sup>83</sup>.

<sup>d</sup> El patrón de metilación se podría corresponder a la unidad →4)-Arap pero como se explica posteriormente se corresponde con la unidad furanósica descrita.

Mediante el análisis de los aldononitrilos peracetilados se pudo determinar que la relación 2,3-di-*O*-metilxilosa a 3,4-di-*O*-metilxilosa en la fracción **GB** es de 89:11, mientras que en el producto **GBR** es de 84:16. Estos resultados indican que la proporción relativa prácticamente no cambia en el producto reducido **GBR** con respecto a **GB** y que la mayoría de dichos residuos son de 2,3-di-*O*-metilxilosa, los cuales se corresponden con unidades de xilosa de cadena unidas 1→4. La presencia minoritaria de unidades dimetiladas en posición C-3 y C-4 denotan la existencia de unidades xilosa sustituidas en posición C-2 probablemente formando pequeñas cadenas laterales.

Además, se pudo determinar que la relación entre 3-*O*-metilxilosa y 2-*O*-metilxilosa en **GB** es de 88:12, mientras que en el producto **GBR** es de 87:13. Estos resultados implican que las unidades mayoritarias en ambos casos son los residuos de xilosa de cadena que presentan un sustituyente en la posición C-2 (3-*O*-metilxilosa).

Por otro lado, la diferencia más importante al comparar los resultados obtenidos para **GB** y **GBR** se debe a que se incorporan los derivados metilados de glucosa y 4-*O*-metilglucosa en el producto reducido, provenientes de los correspondientes ácidos urónicos. Estas unidades representan aproximadamente el 23% de los derivados.

Al analizar los porcentajes de disminución obtenidos en la columna de la derecha de la **Tabla 2.7** podemos apreciar que todos los derivados disminuyen aproximadamente entre un 25-30%, a excepción de las unidades 3,4-di-*O*-metilxilosa, 3-*O*-metilxilosa y 2-*O*-metilxilosa. Las unidades de 3-*O*-metilxilosa y 2-*O*-metilxilosa disminuyen en menor proporción que el resto de los residuos, más precisamente un 16 % y un 5 % respectivamente. Como se detalló en la **sección 2.1.4**, la velocidad de hidrólisis del enlace glicosídico de los ácidos urónicos es más lenta que la de los azúcares neutros y en consecuencia las unidades a las cuales dichos ácidos estaban unidos no fueron detectadas. Por dicha razón se observó que el porcentaje obtenido en el análisis de azúcares componentes para los residuos de xilosa no varió entre las fracciones **GB** y **GBR**, mientras que el valor asociado a las unidades de arabinosa disminuyó marcadamente en **GBR**. Por lo tanto, se puede considerar que una disminución en una menor proporción de los derivados metilados 3-*O*-metilxilosa y 2-*O*-metilxilosa puede indicar que en el producto **GBR** hay una cantidad de estos derivados que se incorporan al total, compensando parcialmente la disminución por la incorporación de las unidades metiladas de glucosa y 4-*O*-metilglucosa. Es decir que estos resultados estarían sugiriendo que los ácidos urónicos se

encuentran enlazados a las xilosas de la cadena principal en posición C-2 (3-*O*-metilxilosa) y en posición C-3 (2-*O*-metilxilosa).

En la **Tabla 2.8** se muestran los mismos resultados del análisis por metilación de la fracción **GB** y del producto **GBR** pero expresados como moles de cada alditol permetilado por cada 100 moles de las unidades de xilosa que conforman la cadena principal del polisacárido.

Como se mencionó anteriormente, la información más representativa de la estructura de los polisacáridos de goma brea obtenida por análisis químicos se pudo extraer del estudio del producto reducido. De dicha fracción se pudo obtener información de manera indirecta sobre los sitios de unión de los ácidos urónicos a partir del análisis de los derivados de glucosa y además, en función de una hidrólisis completa, se logró cuantificar de forma confiable los azúcares neutros, en particular las unidades de xilosa.

**Tabla 2.8.** Análisis por metilación de los alditoles peracetilados de la fracción **GB** y su producto **GBR** (moles/100 moles de xilosa de cadena<sup>a</sup>)

Monosacárido <sup>b</sup>	Unidad	GB	GBR
<b>2,3,5-Ara</b>	Araf <sub>t</sub>	12	10
<b>2,3,4-Ara</b>	Arap <sub>t</sub>	44	40
<b>2,5-Ara</b>	→3)-Araf	8	7
<b>2,3-Ara</b>	→5)-Araf <sup>e</sup>	3	2
<b>2,3,4-Xil</b>	Xilp <sub>t</sub>	43	35
<b>2,3-Xil<sup>c</sup></b>	→4)-Xilp	16	14
<b>3,4-Xil<sup>c</sup></b>	→2)-Xilp	2	3
<b>3-Xil<sup>d</sup></b>	→2,4)-Xilp	71	72
<b>2-Xil<sup>d</sup></b>	→3,4)-Xilp	10	11
<b>Xil</b>	→2,3,4)-Xilp	4	3
<b>2,3,4,6-Glc</b>	Glc p <sub>t</sub>	-	20
<b>3,4,6-Glc</b>	→2)-Glc p	-	39

<sup>a</sup> 100 unidades de xilosa de cadena = 2,3 Xil + 3-Xil + 2-Xil + Xil.

<sup>b</sup> Alditoles peracetilados que poseen grupos metilo en las posiciones especificadas. Ejemplo 2,3-Xil corresponde a 2,3-di-*O*-metilxilosa

<sup>c</sup> Dado que los alditoles son enantiómeros, la proporción relativa de cada uno fue determinada realizando los aldononitrilos peracetilados.

<sup>d</sup> Como los alditoles no se resuelven en las condiciones ensayadas, se distinguieron realizando los aldononitrilos peracetilados<sup>83</sup>.

<sup>e</sup> El patrón de metilación se podría corresponder a la unidad →4)-Arap pero como se explica posteriormente se corresponde con la unidad furanósica descrita.

Del análisis de la **Tabla 2.8** se deduce la existencia de una cadena conformada por unidades de xilosa piranósica con uniones del tipo 1→4 tanto en la fracción **GB** y como en el producto **GBR**. Para el producto reducido **GBR** se determinó que de cada 100 unidades de xilosa unidas por posición 4, 72 unidades se encuentran sustituidas en C-2 (→2,4-Xil), 11 en C-3 (→3,4-Xil), 14 no se encuentran sustituidas y 3 unidades estarían trisustituidas, aunque este último dato debe ser considerado con precaución ya que puede ser producto de una submetilación. Además, por cada 100 unidades de xilosa de cadena se encuentran 38 unidades laterales de xilosa (2,3,4-tri-*O*-metilxilosa y 3,4-di-*O*-metilxilosa), 3 de las cuales se encuentran sustituidas en posición 2. La presencia minoritaria de unidades dimetiladas en posición C-3 y C-4 denotan la existencia de unidades de xilosa sustituidas en posición C-2 probablemente formando pequeñas cadenas laterales. Aunque la existencia de algunas de estas unidades había sido informada previamente, la proporción relativa de cada una de ellas nunca había sido determinada<sup>47,48</sup>.

La presencia de 2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucosa y 3,4,6-tri-*O*-metilglucosa en el producto **GBR** es indicativa de que los ácidos urónicos se encuentran como unidades terminales en el producto original, donde aproximadamente los dos tercios de ellos se encuentran sustituidos en posición 2. En particular, por cada 100 unidades de xilosa de cadena se encuentran 59 unidades de glucosa terminal y su derivado metilado en posición 4. El 66 % de estos azúcares (39 unidades) están sustituidas en posición 2 (incluyendo los derivados de 4-*O*-metilglucosa). En este punto cabe destacar que en ninguno de los trabajos anteriores sobre las características estructurales de estos polisacáridos se determinó la proporción relativa de estas unidades.

En la **Tabla 2.8** puede observarse para las fracciones **GB** y **GBR** la presencia de cuatro tipos de unidades de arabinosa diferentes: arabinosas terminales piranósicas y furanósicas (68% de 2,3,4-Me-Ara y 17% de 2,3,5-Me-Ara respectivamente), arabinosas furanósicas sustituidas en C-3 (12% de 2,5-Me-Ara) y arabinosas sustituidas en posición C-4 o C-5 (3% de 2,3-Me-Ara).

En los estudios previos realizados sobre goma brea, De Pinto *et al.*<sup>48</sup> informaron la presencia de residuos de arabinosa furanósica en estudios por metilación, aunque únicamente como unidades terminales. Dichas unidades no fueron cuantificadas y no se determinaron unidades de arabinofuranosa sustituidas. En el trabajo anterior realizado por Cerezo *et al.*<sup>47</sup>

sólo encontraron arabinosas piranósicas, lo cual se deba probablemente, como ya se ha indicado, al método extractivo utilizado<sup>47</sup>.

Para el producto **GBR**, si se ordenan las unidades laterales según su proporción, las más abundantes son los ácidos urónicos con 59 unidades/100 unidades de xilosa de cadena, seguidos por los residuos de arabinosa piranósica terminal con 40 unidades/100 unidades de xilosa de cadena, en tercer lugar por las unidades terminales de xilosa piranósica con 35 unidades/100 unidades de xilosa de cadena y por último la suma de las unidades de arabinofuranosas con un total de 19 unidades/100 unidades de xilosa de cadena. Con la información conseguida hasta aquí no se pueden determinar de forma certera las posiciones de unión de cada una de las cadenas laterales.

Para profundizar el estudio estructural de los polisacáridos de goma brea se decidió modificarlos químicamente para luego someterlos a estudios de alquilación y RMN. Al realizar una hidrólisis o reacción de degradación con selectividad se puede eliminar un residuo en particular del polisacárido, descartarlo por diálisis y posteriormente metilar el producto. De esa forma la posición que previo al tratamiento se encontraba ocupada por dicho residuo se va a encontrar metilada en el producto degradado. Comparando los resultados obtenidos del análisis por metilación de la fracción de partida y del producto degradado se puede obtener información sobre su sitio de unión. Algunos de estos resultados se corroborarán posteriormente en el análisis por RMN (ver **sección 2.2**).

### **2.1.7 Caracterización química de los productos hidrolizados GBH y GBRH**

Es sabido que los residuos de tipo furanósicos son mucho más lábiles a la hidrólisis ácida que los azúcares piranósicos en las mismas condiciones<sup>76,78,79</sup>. John W. Green en el libro "The Glycofuranosides" informa que la alta velocidad de hidrólisis de este tipo de residuos frente a sus pares piranósicos fue la primera propiedad utilizada para poder diferenciarlos<sup>78</sup>. Por lo tanto, para determinar los sitios de unión de este tipo de residuos a la cadena central de xilosas se sometió a la fracción **GB** y al producto **GBR** a una hidrólisis en condiciones suaves, empleando TFA 0,02 M a 100°C. Posteriormente, se realizó un proceso de purificación por diálisis con una bolsa de peso molecular de corte de 3500 Da, de manera de eliminar los

residuos hidrolizados de bajo peso molecular del producto final. Se obtuvieron las fracciones **GBH** (goma brea hidrolizada) y **GBRH** (goma brea reducida e hidrolizada), las cuales fueron analizadas.

Los resultados obtenidos de la composición química de los productos **GBH** y **GBRH** se presentan en la **Tabla 2.9** y se agregan los resultados ya informados de los productos originales de partida de manera de facilitar su comparación. Se observa que el rendimiento obtenido para el producto **GBH** fue del 59%, lo cual indica que en la hidrólisis se perdieron efectivamente una parte de los residuos que constituyen los polisacáridos de **GB**.

**Tabla 2.9.** Rendimientos (%<sup>a</sup>), composición (%<sup>a</sup>) y peso molecular de la fracción **GB** y los productos **GBH**, **GBR** y **GBHR**.

	<b>GB</b>	<b>GBH</b>	<b>GBR</b>	<b>GBRH</b>
Rendimiento	76	59 <sup>b</sup>	78 <sup>b</sup>	48 <sup>b</sup>
Carbohidratos	75	85	81	79
Proteínas	9,0	2,5	3,6	ND <sup>c</sup>
Grupos acetilo	2,6	3,2	2,9	2,6
Ácidos Urónicos	17	23	0	0
Peso Molecular a tope de pico (kDa)	122	31	71	11
Dispersión (Mw/Mn)	1,7	2,9	1,9	2,8

<sup>a</sup> Expresados en porcentajes m/m.

<sup>b</sup> Rendimiento calculado a partir de la fracción **GB**

<sup>c</sup> ND = no determinado.

Las composiciones de las dos fracciones conseguidas por hidrólisis en condiciones suaves (**GBH** y **GBRH**) se asemejan a las de los productos de partida, manteniéndose las proporciones de azúcares neutros y de grupos acetilo. La diferencia más notoria se observa entre **GB** y **GBH** en la cantidad de proteínas, tal como se observó entre **GB** y **GBR**. Se aprecia que tanto un tratamiento realizado en medio ácido como alcalino podrían actuar como agentes disgregantes o degradantes lo que podría llevar a una pérdida de fragmentos proteicos en el proceso de diálisis.

Los pesos moleculares determinados a tope de pico para los productos hidrolizados disminuyó con respecto a las fracciones originales **GB** y **GBR**. Sin embargo, sus perfiles cromatográficos conservan las formas aproximadamente gaussianas (**Figura 2.10**). Es lógico que al emplear condiciones ácidas suaves para obtener estos productos, se haya producido

una leve degradación de los polisacáridos, disminuyendo el largo de la cadena y por consiguiente su peso molecular. De todas formas, el producto **GBH**, con un peso molecular a tope de pico de 31 kDa, y el producto reducido **GBRH** con un peso molecular de 11 kDa, poseen un número suficientemente grande de residuos como para ser representativos de la estructura de los polisacáridos originales.

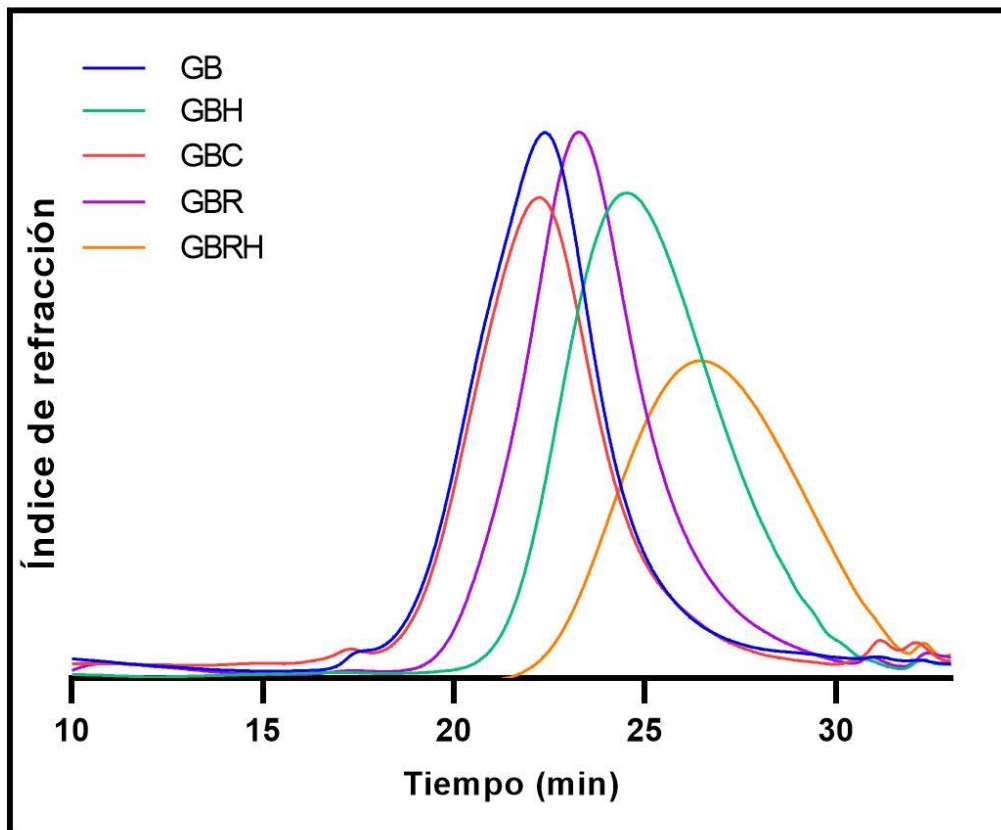


Figura 2.10. Perfil de GPC de las fracciones **GBC**, **GB** y los productos **GBH**, **GBR** y **GBRH**.

### 2.1.8 Determinación de azúcares componentes de los productos **GBH** y **GBRH**

Al igual que con los productos anteriores, se realizaron los alditoles y aldonitrilos peracetilados de los productos **GBH** y **GBRH** para ser analizadas por CGL-FID. Los resultados pueden observarse en la **Tabla 2.10**.

**Tabla 2.10.** Azúcares componentes de la fracción **GB** y los productos **GBH**, **GBR** y **GBRH** (moles/100 moles).

Azúcar	GB	GBH	GBR	GBRH
Ara	44	25	24	15
Xil	56	72	55	63
4- <i>O</i> -Me-Glc	tr <sup>a</sup>	tr	12	12
Glc	tr	tr	9	10

<sup>a</sup> tr = trazas.

Al comparar los productos hidrolizados en condiciones suaves con los de partida (**GBH** vs. **GB** y **GBRH** vs. **GBR**) se observa una disminución del 40% de las unidades de arabinosa, lo cual es consistente con la pérdida en el proceso de hidrólisis y posterior diálisis de unidades de arabinosa furanósica. No obstante, se puede percibir claramente que una parte de las unidades de arabinosa es resistente a las condiciones de hidrólisis empleadas, por lo que se desprende que la arabinosa se encontraría en el polisacárido tanto en forma furanósica como piranósica.

Si se observan los resultados obtenidos para el producto **GBRH** la relación arabinosa:xilosa obtenida es de 1:4,2, un valor mucho más cercano al informado en el trabajo original de Cerezo *et al.*<sup>47</sup> (1:3,7). Como fue mencionado en la **sección 2.1.4**, los autores del mencionado trabajo realizaron una purificación a pH = 2, por lo que se pueden haber perdido unidades de arabinofuranosas en ese proceso.

### 2.1.9 Análisis por metilación de los productos **GBH** y **GBRH**

Los productos **GBH** y **GBRH** fueron permetilados y sus correspondientes alditoles y aldononitrilos peracetilados fueron analizados por cromatografía gaseosa. Los resultados obtenidos fueron expresados en moles por cada 100 moles de xilosa de cadena y pueden observarse en la **Tabla 2.11**.

Como se mencionó anteriormente, las unidades de arabinofuranosa se encuentran como unidades terminales (2,3,5-tri-*O*-metilarabinosa), como unidades sustituidas en la posición C-3 (2,5-di-*O*-metilarabinosa) o bien como unidades sustituidas en posición C-5 (2,3-



di-*O*-metilarabinosa). Éstas últimas podrían tratarse de residuos del tipo piranósicos o furanósicos, sin embargo cuando la fracción **GB** y el producto **GBR** fueron sometidos a hidrólisis suave para eliminar las unidades furanósicas, se observó que dicho derivado metilado desaparecía en los productos **GBH** y **GBRH** (ver **Tabla 2.11**).

**Tabla 2.11.** Análisis por metilación de los alditoles peracetilados de los distintos productos generados a partir de la goma brea (moles/100 moles de xilosa de cadena <sup>a</sup>)

Monosacárido <sup>b</sup>	Unidad	GB	GBH	GBR	GBRH
<b>2,3,5-Ara</b>	Ara <sub>f</sub> <sub>t</sub>	12	2	10	2
<b>2,3,4-Ara</b>	Ara <sub>p</sub> <sub>t</sub>	44	45	40	34
<b>2,5-Ara</b>	→3)-Ara <sub>f</sub>	8	-	7	1
<b>2,3-Ara</b>	→5)-Ara <sub>f</sub>	3	1	2	1
<b>2,3,4-Xil</b>	Xil <sub>p</sub> <sub>t</sub>	43	48	35	29
<b>2,3-Xil<sup>c</sup></b>	→4)-Xil <sub>p</sub>	16	58	14	39
<b>3,4-Xil<sup>c</sup></b>	→2)-Xil <sub>p</sub>	2	5	3	5
<b>3-Xil<sup>d</sup></b>	→2,4)-Xil <sub>p</sub>	71	31	72	49
<b>2-Xil<sup>d</sup></b>	→3,4)-Xil <sub>p</sub>	10	6	11	7
<b>Xil</b>	→2,3,4)-Xil <sub>p</sub>	4	5	3	5
<b>2,3,4,6-Glc</b>	Glc <sub>p</sub> <sub>t</sub>	-	-	20	31
<b>3,4,6-Glc</b>	→2)-Glc <sub>p</sub>	-	-	39	30

<sup>a</sup> 100 unidades de xilosa de cadena = 2,3 Xil + 3-Xil + 2-Xil + Xil.

<sup>b</sup> Alditoles peracetilados que poseen grupos metilo en las posiciones especificadas. Ejemplo 2,3-Xil corresponde a 2,3-di-*O*-metilxilosa

<sup>c</sup> Dado que los alditoles son enantiómeros, la proporción relativa de cada uno fue determinada realizando los aldononitrilos peracetilados.

<sup>d</sup> Como los alditoles no se resuelven en las condiciones ensayadas, se distinguieron realizando los aldononitrilos peracetilados<sup>83</sup>.

Al analizar los resultados obtenidos para ambos productos hidrolizados (**GBH** y **GBRH**) se observa claramente una gran disminución de la cantidad de residuos furanósicos de arabinosa. Paralelamente se aprecia el aumento en la proporción de las unidades de 2,3-*O*-metilxilosa y una consecuente disminución de la 3-*O*-metilxilosa.

Además, observando los resultados obtenidos para el producto **GBH** se observa una deficiencia de puntos de ramificación. Este tipo de inconsistencias refuerzan la importancia de analizar más en detalle los productos reducidos para obtener conclusiones estructurales representativas de los polisacáridos que constituyen la goma brea.

Analizando en detalle las diferencias encontradas en los productos reducidos **GBR** y **GBRH** se observa que en el producto hidrolizado las arabinosas furanósicas (2,3,5-Ara, 2,3-Ara y 2,5-Ara) disminuyen de 19 a 4 unidades cada 100 unidades de xilosa de cadena. Además, comparando los derivados permetilados de los productos **GBR** y **GBRH**, se observó que el proceso de hidrólisis suave produjo también una pérdida del 16% de unidades piranósicas terminales (2,3,4-tri-*O*-metilxilosa y 2,3,4-tri-*O*-metilarabinosa), lo que sugiere que las condiciones de hidrólisis suave afectaron parcialmente las uniones de dichas pentopiranosas (**Tabla 2.11**). En particular, se observa una disminución en un 17% de las unidades de xilopiranosas terminales entre **GBR** y **GBRH** mientras que para las unidades de arabinopiranosas terminales la pérdida observada es de un 15%.

Para confirmar la hipótesis de que las pentosas piranósicas terminales se hidrolizaban parcialmente en las condiciones suaves empleadas, se realizó un experimento paralelo utilizando las mismas condiciones de hidrólisis (TFA 0,02 M y 100°C) sobre xilogalactanos sulfatados extraídos del alga roja *Corallina officinalis*. Estos xilogalactanos sulfatados, denominados coralinanos, según lo informado por Cases *et al.*<sup>84</sup> y Navarro y Stortz<sup>90</sup>, poseen unidades de xilopiranosas terminales. Los xilogalactanos fueron sometidos a hidrólisis suave, luego dializados y sobre los nuevos productos generados se realizaron los alditoles peracetilados. En la **Tabla 2.12** se presentan los resultados obtenidos comparando el xilogalactano original (**Coff**) y el mismo parcialmente hidrolizado (**CoffH**).

Comparando los resultados de ambos polisacáridos queda en evidencia que para el producto **CoffH** se perdieron aproximadamente un 20% de las unidades terminales de xilopiranosas con respecto al producto original **Coff**. Este porcentaje de pérdida es consistente con las cantidades de unidades terminales de xilo- y arabinopiranosas que se perdieron en el producto **GBRH**. Es decir, que las condiciones ácidas empleadas hidrolizan la mayor parte de las pentosas furanósicas y también parcialmente las pentosas piranósicas terminales. Esta falta de selectividad aportó un factor más de complejidad al estudio de metilación, y alertó a manejar los resultados obtenidos con mayor precaución.

**Tabla 2.12.** Azúcares neutros de los xilogalactanos de *Corallina officinalis* nativos y parcialmente hidrolizados (moles/100 moles).

Azúcar	Coff	CoffH
Xil	26	21
2-Gal	14	15
3-Gal + 4-Gal	6	6
6-Gal	2	2
Gal	41	46
Man	1	1
Glc	9	9

Las variaciones en las cantidades de las pentosas furanósicas entre las fracciones originales y los productos hidrolizados están relacionadas con su pérdida en el proceso de diálisis, pero además se afectan los resultados cuantitativos de las unidades a las que estas se encontraban unidas. Es así que al comparar las cantidades correspondientes a las unidades de 2,3-di-*O*-metilxilosa, 3-*O*-metilxilosa y 2-*O*-metilxilosa, se observa un aumento de la unidad dimetilada y una disminución de los residuos de xilosa monometilados en el producto **GBRH** con respecto a **GBR**. En particular, la unidad 2,3-di-*O*-metilxilosa aumenta de 14 a 39 unidades/100 unidades de xilosa de cadena (25 unidades en total) mientras que los residuos monometilados, 3-*O*-metilxilosa y 2-*O*-metilxilosa, disminuyen de 72 y 11 a 49 y 7 unidades/100 unidades de xilosa de cadena respectivamente (29 unidades en total). El efecto de la disminución de la cantidad de 3-*O*-metilxilosa y el aumento de 2,3-di-*O*-metilxilosa en **GBRH** (Tabla 2.11) indica que las unidades de arabinofuranosas se encontrarían principalmente enlazadas en la posición C-2 de las unidades de xilosa que conforman la cadena principal ( $\rightarrow 2,4$ )-Xilp-(1 $\rightarrow$ ).

La disminución de unidades de xilosa de cadena con sustituyente en posición C-2 (3-*O*-metilxilosa) se podría deber también a la pérdida de unidades de xilopiranosas y arabinopiranosas terminales producto de la hidrólisis suave como ya fue descrito. Sin embargo, la suma de estas unidades piranósicas terminales que se pierden es de 12 unidades/100 unidades de xilosa de cadena, lo cual indica que la disminución de 3-*O*-metilxilosa no podría deberse únicamente a la pérdida de este tipo de residuos.

Luego de la hidrólisis suave puede observarse que el valor de la suma de unidades de glucosa y 4-*O*-metilglucosa se mantiene constante (59 en **GBR** y 61 en **GBRH**). Empero, queda

evidenciado que se produce un aumento de las unidades terminales (2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucosa) y una disminución de las unidades que poseen un sustituyente en posición C-2 (3,4,6-tri-*O*-metilglucosa). Esta interconversión entre las unidades de glucosa sustituidas y terminales puede ser explicado como el caso anterior por pérdida de sustituyentes en la posición C-2. Sin información adicional no se puede establecer inequívocamente la posición de los sustituyentes, aunque por antecedentes bibliográficos de polisacáridos similares<sup>52,64,91</sup> y estudios previos sobre los polisacáridos de la goma brea<sup>47,48</sup>, es esperable que las unidades de arabinofuranosas se encuentren como sustituyentes de la cadena principal de xilosa probablemente como disacáridos mientras que las unidades de arabinopiranosas se encuentren como sustituyentes de los ácidos urónicos formando pequeñas cadenas laterales.

#### 2.1.10 Análisis por etilación del producto reducido GBR

Es importante destacar que la metilación del polisacárido no permitió distinguir si el ácido 4-*O*-metilglucurónico, y por lo tanto la 4-*O*-metilglucosa en el producto **GBR**, se encuentra preferentemente como unidad terminal sin sustituir o con un sustituyente en posición C-2 o bien se distribuye aleatoriamente. Entonces, para poder determinar la proporción de ácido glucurónico y ácido 4-*O*-metilglucurónico como unidades terminales o sustituidas se realizó un estudio por etilación sobre el producto **GBR**. El experimento se realizó en las mismas condiciones que la permetilación de los polisacáridos empleando el método de Ciucanu y Kerek<sup>92</sup> pero utilizando yoduro de etilo (ICH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.6.2**). Los aldononitrilos peracetilados del producto etilado fueron identificados por CGL-IE-EM utilizando la información referida por Cases *et al.*<sup>84</sup> en conjunto con lo reportado en su trabajo de tesis de 1995<sup>86</sup> y se determinó la proporción relativa de cada unidad mediante CGL-FID.

Se pudo determinar entonces que la relación entre 2,3,6-tri-*O*-etil-4-*O*-metilglucosa a 2,3,4,6-tetra-*O*-etilglucosa, que se corresponde a la relación entre unidades terminales de 4-*O*-metilglucosa y glucosa sin sustituir era de 58:42, mientras que la relación entre 3,6-di-*O*-etil-4-*O*-metilglucosa y 3,4,6-tri-*O*-etilglucosa, que se corresponde a la relación entre unidades de 4-*O*-metilglucosa y glucosa con un sustituyente en la posición C-2 era de 53:47. Estos

resultados indican una leve tendencia del ácido 4-*O*-metilglucurónico por sobre el ácido glucurónico a encontrarse como unidades terminales sin sustituyente, mientras que para aquellos que presentan un sustituyente en posición C-2 las proporciones obtenidas son muy similares.

En la **Tabla 2.13** se presentan los resultados finales de los estudios de alquilación obtenidos para el producto **GBR**.

**Tabla 2.13.** Análisis por metilación de los alditoles peracetilados del producto **GBR** (moles/100 moles de xilosa de cadena<sup>a</sup>). Proporciones de glucosa y 4-*O*-metilglucosa determinadas por el análisis por etilación.

Monosacárido <sup>b</sup>	Unidad	GBR
<b>2,3,5-Ara</b>	Araf <sub>t</sub>	10
<b>2,3,4-Ara</b>	Arap <sub>t</sub>	40
<b>2,5-Ara</b>	→3)-Araf	7
<b>2,3-Ara</b>	→5)-Araf	2
<b>2,3,4-Xil</b>	Xilp <sub>t</sub>	35
<b>2,3-Xil<sup>c</sup></b>	→4)-Xilp	14
<b>3,4-Xil<sup>c</sup></b>	→2)-Xilp	3
<b>3-Xil<sup>d</sup></b>	→2,4)-Xilp	72
<b>2-Xil<sup>d</sup></b>	→3,4)-Xilp	11
<b>Xil</b>	→2,3,4)-Xilp	3
<b>2,3,4,6-Glc</b>	Glc <sub>p</sub> <sub>t</sub>	8
<b>2,3,4,6-Glc</b>	4- <i>O</i> -Me-Glc <sub>p</sub> <sub>t</sub>	12
<b>3,4,6-Glc</b>	→2)-Glc <sub>p</sub>	18
<b>3,4,6-Glc</b>	→2)-4- <i>O</i> -Me-Glc <sub>p</sub>	21

<sup>a</sup> 100 unidades de xilosa de cadena = 2,3 Xil + 3-Xil + 2-Xil + Xil.

<sup>b</sup> Alditoles peracetilados que poseen grupos metilo en las posiciones especificadas. Ejemplo 2,3-Xil corresponde a 2,3-di-*O*-metilxilosa

<sup>c</sup> Dado que los alditoles son enantiómeros, la proporción relativa de cada uno fue determinada realizando los aldononitrilos peracetilados.

<sup>d</sup> Como los alditoles no se resuelven en las condiciones ensayadas, se distinguieron realizando los aldononitrilos peracetilados<sup>83</sup>.

Adicionalmente, para obtener mayor información sobre el sitio de unión de los residuos arabinofuranósicos, se diseñó un experimento de etilación sobre los polisacáridos del producto **GBR**. El procedimiento consistía en permetilar este producto, posteriormente realizar una hidrólisis suave seguida de diálisis, y finalmente sobre el nuevo producto metilado

e hidrolizado una etilación. La idea era hidrolizar los residuos furanósicos sobre el producto previamente metilado, quedando libres los sitios de unión de las unidades arabinofuranósicas para finalmente poder marcar dichas posiciones de unión mediante la etilación.

Se realizaron los alditoles peracetilados sobre los productos peretilados y los mismos fueron analizados cuantitativamente por CGL-FID. Se observó que el paso de hidrólisis suave luego de la metilación fracasaba, no lográndose liberar las arabinosas furanósicas. La resistencia a las condiciones de hidrólisis empleadas indicaba que las velocidades de hidrólisis se modificaban entre los polisacáridos reducidos respecto de los reducidos y metilados.

Se intentó optimizar el paso de hidrólisis empleando distintas concentraciones de ácido trifluoroacético, sin embargo para ninguna de las condiciones de hidrólisis ensayadas se observó una disminución significativa de los residuos de arabinofuranosas, por lo que no se pudo obtener información adicional sobre su sitio de unión.

#### **2.1.11 Análisis por metilación del producto GBS obtenido por la degradación de Smith**

Los polisacáridos de la fracción **GB** fueron sometidos a una degradación de Smith<sup>93,94</sup> obteniéndose así el producto denominado **GBS** (goma brea con tratamiento de Smith).

La degradación de Smith consiste en tres etapas: un tratamiento inicial de los polisacáridos con  $\text{NaIO}_4$  para romper las uniones de los dioles vecinales, oxidándolos a los aldehídos correspondientes; luego se realiza una reducción de los aldehídos obtenidos con  $\text{NaBH}_4$ ; finalmente, se realiza una hidrólisis suave que rompe exclusivamente las uniones glicosídicas de los azúcares que han sido atacados por el periodato, quedando intactas las uniones glicosídicas restantes. Si esos azúcares atacados forman parte de cadenas laterales, son luego eliminados por diálisis (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.3.7**). Con este tratamiento, las unidades terminales con dioles vecinales libres como los residuos de arabinosa, xilosa y ácidos urónicos son oxidados y eliminados de los polisacáridos de la goma brea. También se acorta la cadena central de xilosas ya que las unidades que no presentan sustitución son oxidadas. Los residuos de arabinofuranosas sustituidos en posición 3, las unidades de ácido 4-*O*-metilglucurónico sustituidas en posición 2 y los residuos de la cadena

central de xilasas que se encuentran sustituidos en *O*-2 y/o en *O*-3 no presentan dioles vecinales libres y por lo tanto no sufren degradación.

Para poder realizar un análisis por metilación representativo de las características estructurales, el producto **GBS** fue reducido con las mismas condiciones empleadas anteriormente y posteriormente permetilado (producto **GBSR**). Se generaron los alditos peracetilados del producto metilado para ser analizados por cromatografía gaseosa y los resultados se muestran en la **Tabla 2.14** en comparación con los correspondientes al producto **GBR**. Cabe destacar que no se realizaron los aldononitrilos de este producto por lo que no se pudieron resolver las unidades de 2,3-di-*O*-metilxilosa, 3,4-di-*O*-metilxilosa y 2-*O*-metilxilosa y 3-*O*-metilxilosa. De todas formas por el análisis realizado previamente (ver **Tabla 2.8**) se sabe que las unidades mayoritarias son los derivados 2,3-di-*O*-metilxilosa y 3-*O*-metilxilosa.

Comparando los productos **GBSR** y **GBR** se observa que la goma brea tratada por el método de Smith contiene una cantidad de unidades terminales mucho menor que **GBR**. En contraposición, las unidades de xilasas de cadena (2,3-di-*O*-metilxilosa) son los residuos mayoritarios indicando el bajo grado de ramificación de los polisacáridos luego del tratamiento realizado. Además se observa la presencia de residuos de 3-*O*-metilxilosa (y 2-*O*-metilxilosa) en una cantidad apreciable (24 unidades / 100 unidades de cadena) indicando que a pesar del tratamiento existen unidades laterales que lo resisten por lo que algunas unidades de la cadena central de xilasas presentan sustituyentes en posición C-2.

Como se discutió anteriormente los sustituyentes que resisten el tratamiento son aquellos que no poseían dioles vecinales plausibles de ser oxidados en la fracción original **GB** como las unidades de ácido 4-*O*-metilglucurónico sustituidas en posición 2 y los residuos de arabinofuranosas sustituidos en posición 3. Como luego del tratamiento se pierden los sustituyentes de estas unidades, las mismas se transforman en las unidades terminales 2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucosa y 2,3,5-tri-*O*-metilarabinosa respectivamente.

**Tabla 2.14.** Análisis por metilación de los alditoles peracetilados de los productos **GBSR** y **GBR** (moles/100 moles de xilosa de cadena<sup>a</sup>)

Monosacárido <sup>b</sup>	Unidad	GBR	GBSR
<b>2,3,5-Ara</b>	Araf <sub>t</sub>	10	6
<b>2,3,4-Ara</b>	Arap <sub>t</sub>	40	3
<b>2,5-Ara</b>	→3)-Araf	7	2
<b>2,3-Ara</b>	→5)-Araf	2	0
<b>2,3,4-Xil</b>	Xilp <sub>t</sub>	35	4
<b>2,3-Xil/3,4-Xil</b>	→4)-Xilp / →2)-Xilp	17	66
<b>3-Xil/2-Xil</b>	→2,4)-Xilp / →3,4)-Xilp	83	24
<b>Xil</b>	→2,3,4)-Xilp	3	7
<b>2,3,4,6-Glc</b>	Glc <sub>p</sub> <sub>t</sub>	20	12
<b>3,4,6-Glc</b>	→2)-Glc <sub>p</sub>	39	1

<sup>a</sup> 100 unidades de xilosa de cadena = 2,3 Xil + 3-Xil + 2-Xil + Xil.

<sup>b</sup> Alditoles peracetilados que poseen grupos metilo en las posiciones especificadas. Ejemplo 2,3-Xil corresponde a 2,3-di-*O*-metilxilosa

Como se verá posteriormente en la **sección 2.2**, la obtención y caracterización de este producto fue importante para la confirmación de algunos aspectos estructurales.

### 2.1.12 Conclusiones parciales

En resumen, los resultados obtenidos por métodos químicos indican que los polisacáridos de la goma brea estarían compuestos fundamentalmente por un xilano con uniones (1→4) altamente sustituido principalmente en posición C-2 con unidades de L-arabinosa, D-xilosa, ácido glucurónico y ácido 4-*O*-metilglucurónico. Se determinó que la arabinosa se encuentra tanto en forma furanósica como piranósica con configuración L. El ácido 4-*O*-metilglucurónico y el ácido glucurónico se encuentran como unidades terminales no reductoras o bien como cadenas cortas con sustituyentes en la posición 2. Asimismo se pudo determinar la presencia de grupos acetilo, aunque su ubicación en los polisacáridos no pudo ser determinada mediante estas técnicas.



## 2.2 Análisis estructural por Resonancia Magnética Nuclear

### 2.2.1 Consideraciones generales

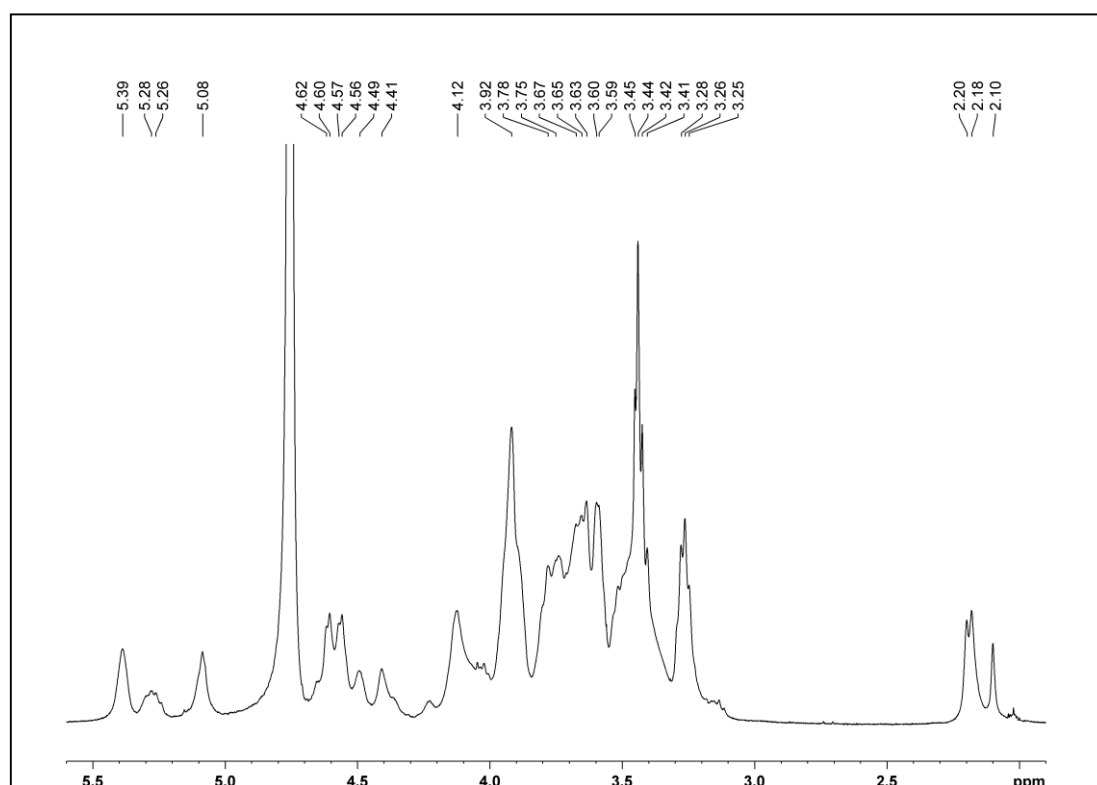
En la sección anterior se estudió por métodos químicos la estructura y composición de los polisacáridos de goma brea. Del análisis de los resultados conseguidos pudo obtenerse una gran cantidad de información, aunque algunas de las características estructurales no pudieron ser determinadas. Las posiciones de unión de los grupos acetilo no pudieron ser develadas, y en igual sentido tampoco se pudieron elucidar los sitios de unión de algunas unidades que se encuentran como ramificaciones de la cadena central de unidades de xilosa. Asimismo, del análisis por metilación surgió la posibilidad de que existan pequeñas cadenas laterales, aunque su composición y longitud tampoco pudo ser determinada con los mencionados análisis. Para poder dilucidar dichos aspectos y realizar una determinación estructural completa fue fundamental la utilización de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). La fracción **GB** y los derivados generados fueron sometidos a un análisis espectroscópico minucioso usando diferentes experimentos de RMN. Se realizaron experimentos unidimensionales (1D) como  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y bidimensionales (2D) de correlación  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  como HSQC y de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  como COSY, TOCSY y NOESY. Para algunos de estos experimentos, como los de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY y NOESY, los parámetros empleados fueron optimizados para obtener una mayor sensibilidad y resolución (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.8.2**). Todos los espectros de RMN que se utilizaron fueron realizados usando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente y a temperatura ambiente.

Los experimentos de RMN HMBC permiten obtener señales de correlación a por lo menos dos enlaces entre átomos de H y C, lo que resulta muy útil para establecer la conectividad de las distintas unidades en el polisacárido. En ese sentido se realizaron numerosos intentos para obtener estos espectros de correlación  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  a 2 o 3 enlaces de distancia, variando los parámetros empleados y las condiciones experimentales como concentración o temperatura. No obstante, los espectros en general resultaron de baja calidad y presentaron un conjunto reducido de señales. Sólo fueron analizados para obtener información sobre algunas señales específicas, pero lamentablemente no pudieron utilizarse para un análisis profundo, en especial para obtener información respecto a los posiciones de unión entre distintas unidades de azúcares.

Entre los experimentos de RMN realizados, los espectros bidimensionales de correlación  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC fueron los que mayor información aportaron, por lo que el análisis y asignación de las señales se basó en gran medida en dichos espectros. El análisis espectral permitió obtener los desplazamientos químicos de los átomos de carbono y protones asociados, los cuales se pudieron comparar con datos bibliográficos. Además, mediante los espectros de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, diseñado para poder observar las señales de correlación de un dado protón con todos los hidrógenos con los cuales existe una constante de acoplamiento (J), fueron establecidas las conectividades entre los hidrógenos dentro de una misma unidad monosacáridica. Para obtener información sobre las posiciones de unión entre las distintas unidades, fueron de especial utilidad los espectros NOESY, en los cuales se observan correlaciones de átomos de hidrógenos cercanos en el espacio, cuya intensidad se relaciona con la distancia que los separa. La información adquirida de estos experimentos, en conjunto con información adicional, aunque fue tomada con precaución, reemplazó en parte a los datos que se podrían haber obtenido de los espectros HMBC.

### 2.2.2 Espectros de RMN de $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ de la fracción GB

En la **Figura 2.11** se presenta el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la fracción **GB**. El espectro fue realizado sin supresión de solvente, por lo que el pico de mayor intensidad, con desplazamiento químico de 4,7 ppm aproximadamente, se corresponde con el protón del HOD.



**Figura 2.11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de la fracción **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.

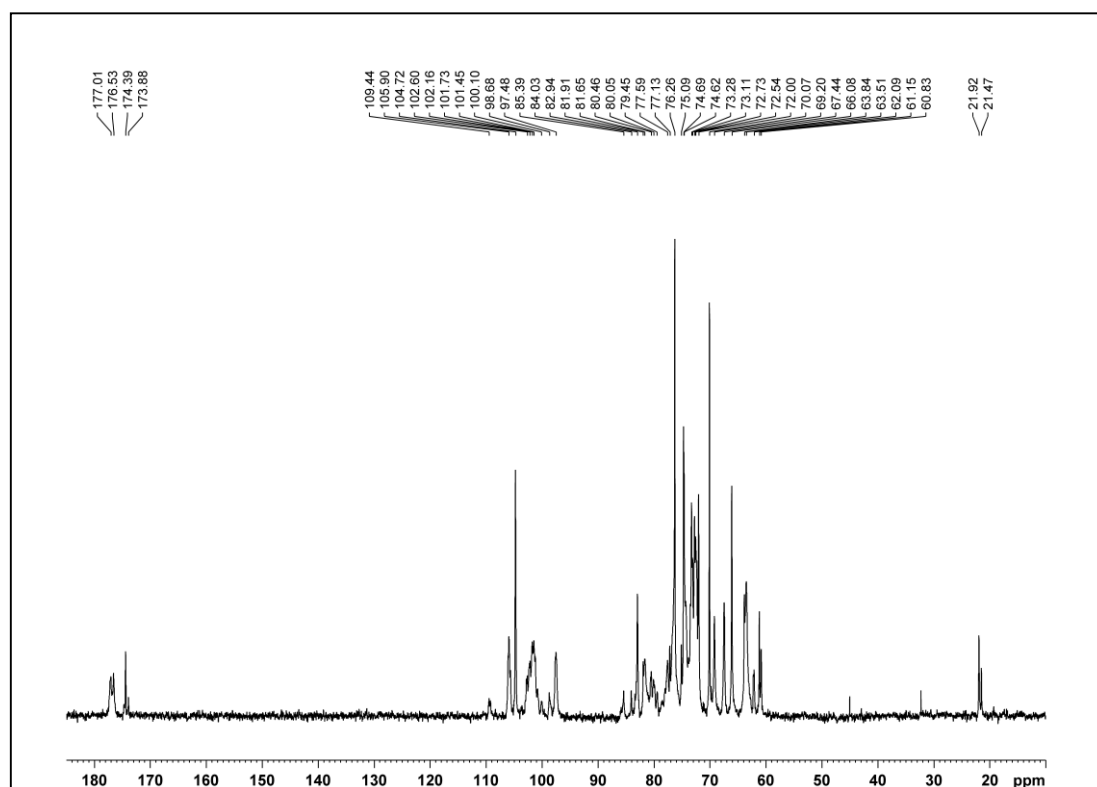
Como se observa en el espectro RMN de  $^1\text{H}$  de **GB**, las señales están poco resueltas debido principalmente a que muchas de ellas se encuentran superpuestas.

Entre 2,10 ppm y 2,20 ppm se distinguen las señales originadas por los protones pertenecientes al metilo de los grupos acetilo<sup>56,57,95,96</sup>. Se pueden distinguir tres singuletes, lo que indica que estos grupos se encuentran en entornos químicos distintos, lo cual será analizado en detalle posteriormente. Entre 3,1 ppm y 4,4 ppm aproximadamente se encuentran una gran cantidad de señales superpuestas pertenecientes a los hidrógenos 2 a 5

de los distintos residuos. Por último, las señales originadas por los protones anoméricos se hallan en la zona de desplazamiento químico comprendida entre 4,4 ppm y 5,4 ppm.

La alta superposición de señales observada en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GB** se deriva de la presencia de diferentes tipos de azúcares en entornos químicos distintos lo que le confiere a los polisacáridos de la goma brea una gran complejidad estructural. Por este motivo, la utilidad de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de la fracción **GB** y de sus derivados para extraer información estructural fue limitada.

En la **Figura 2.12** se muestra el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la fracción **GB**. Como es característico de este tipo de espectros, las señales son más angostas y se encuentran más resueltas que en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , aunque su sensibilidad es menor.

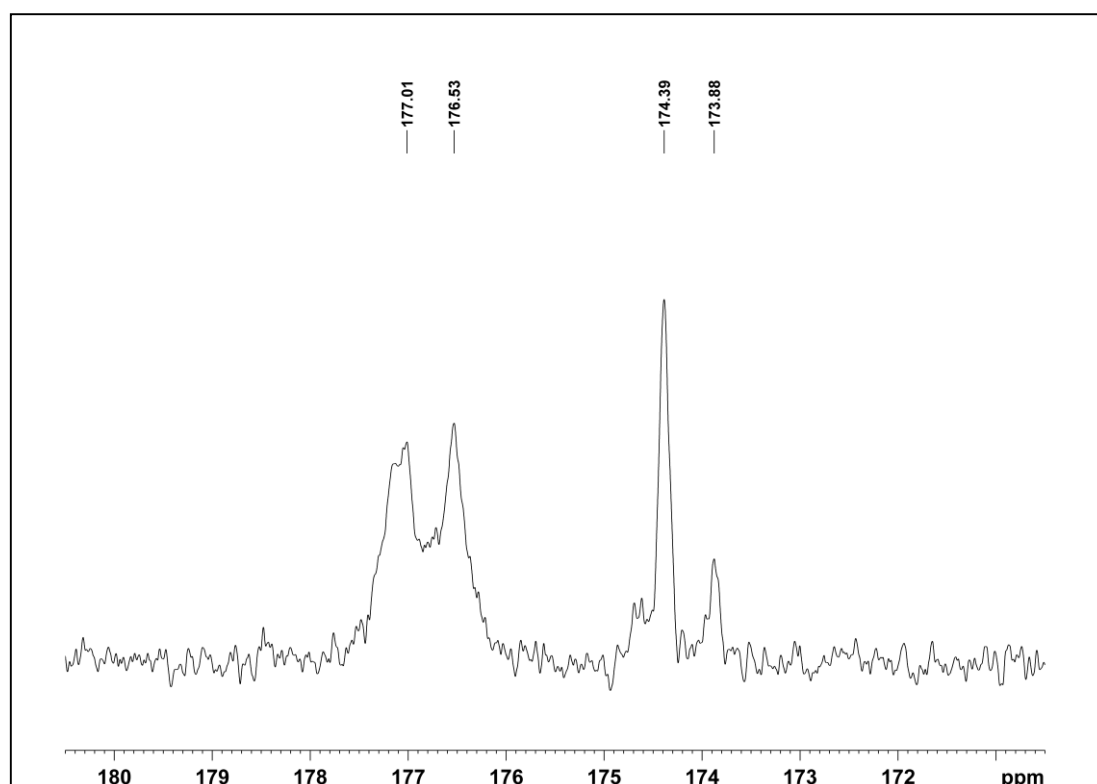


**Figura 2.12.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de la fracción **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GB** se pueden observar cuatro zonas de señales con desplazamientos químicos distintos. En la zona de desplazamiento químico de 21,5/22 ppm se aprecian señales que se corresponden con los carbonos de los metilos de los grupos acetilos<sup>56,96</sup>. En la región comprendida entre los 60 y 86 ppm aproximadamente se encuentran

las señales originadas por los carbonos 2 a 5 de las distintas unidades de azúcares. A campos más bajos, entre 97 y 110 ppm, se encuentran las señales correspondientes a los carbonos anoméricos y por último, en una zona de desplazamientos químicos típica de grupos carbonilo de ácidos y ésteres, se pueden observar señales entre 174 ppm y 177 ppm aproximadamente.

Una ampliación del espectro de esta región puede apreciarse en la **Figura 2.13** donde se distinguen dos pares de señales. El primer par de señales poseen un desplazamiento químico de 173,9 y 174,4 ppm y como se verá posteriormente se originan en los carbonos de los carbonilos de los grupos acetilo<sup>57,96</sup>. El segundo par de señales con desplazamiento químico de 176,5 y 177,0 ppm se corresponden con los carbonos de los ácidos carboxilos o carboxilatos de las unidades de ácidos urónicos<sup>97-99</sup>.



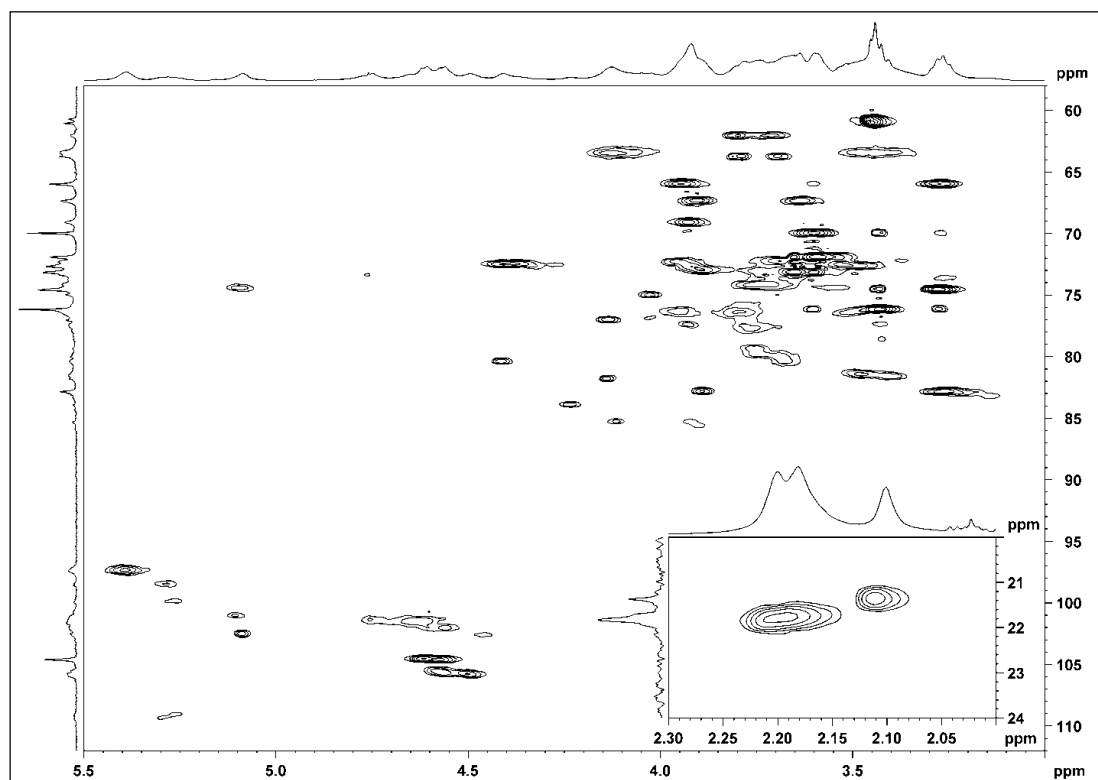
**Figura 2.13.** Ampliación del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de la fracción **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

Como se puede apreciar en las **Figuras 2.12** y **2.13** los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  permitieron obtener información estructural muy limitada, únicamente sobre las señales pertenecientes a los grupos acetilo y a los ácidos carboxílicos. Debido a la gran cantidad de

señales presentes que se encuentran con un alto grado de superposición, fue necesaria la utilización de experimentos de RMN bidimensionales.

### 2.2.3 Análisis por experimentos bidimensionales de correlación $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ de la fracción GB y sus derivados

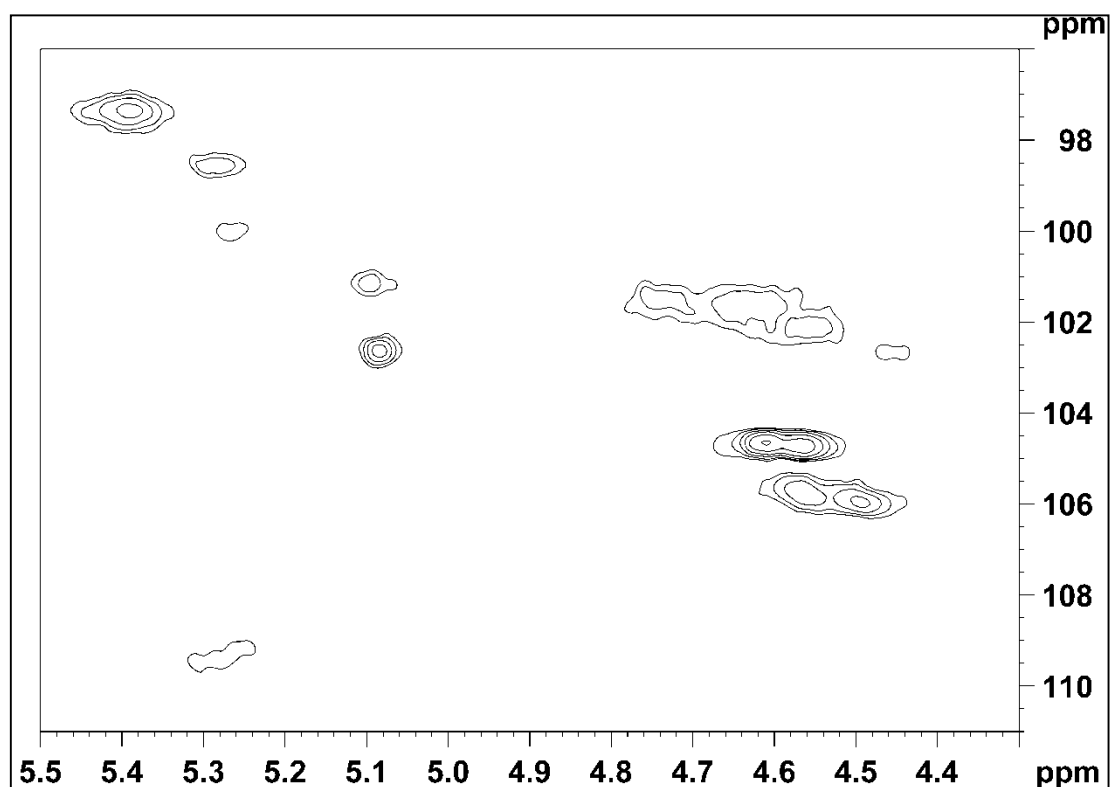
En la **Figura 2.14** se presentan el espectro HSQC de la fracción **GB** y una ampliación del mismo, en los cuales se pueden apreciar espectros muy complejos con gran cantidad de señales, donde la mayoría de ellas pueden dividirse dos grandes conjuntos. Por un lado, las señales comprendidas en la región 96-110 ppm para  $^{13}\text{C}$  y 4,4-5,5 ppm para  $^1\text{H}$  (96-110/4,4-5,5 ppm) se corresponden con las señales originadas por la presencia de carbonos e hidrógenos anoméricos. Por otro lado, en la zona de desplazamiento químico comprendida entre 60-90/3,0-5,1 ppm aproximadamente se encuentran las señales asignables a los carbonos e hidrógenos de las posiciones 2 a 5 de los distintos residuos.



**Figura 2.14.** Espectro HSQC de la fracción **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.

Además de las señales en las regiones descritas se pueden observar al menos tres señales con desplazamiento químico entre 21-22/2,10-2,20 ppm que son asignadas a los metilos de los grupos acetilo presentes en **GB**.

En la **Figura 2.15** se puede apreciar una ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC de la fracción **GB**.



**Figura 2.15.** Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC de **GB** a temperatura ambiente.

En estudios de RMN previos sobre arabinoxilanos<sup>59,64,65,100</sup> y glucuronoxilanos<sup>64,99,101-104</sup> aislados de diferentes fuentes naturales, en la región de desplazamientos químicos comprendida entre 101–105/4,4–4,7 ppm se encuentran las señales provenientes de los átomos anoméricos de distintas unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosas, mientras que en la zona definida entre 97–110 y 5,0–5,5 ppm se ubican aquellas señales originadas por las unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa y del ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico. En función de estos datos, el espectro presentado en la **Figura 2.15** podría dividirse en dos regiones definidas por la configuración anomérica de cada azúcar. Las señales

correspondientes a residuos piranósicos con la configuración  $\beta$ -D o  $\beta$ -L suelen presentar desplazamientos químicos entre 4,4 ppm y 5 ppm para  $^1\text{H}$ , mientras que las señales originadas en las unidades que tienen configuración  $\alpha$ -D o  $\alpha$ -L se suelen encontrar en la zona de  $\delta$  entre 5 ppm y 5,6 ppm, aunque existen excepciones.

En la zona anomérica de la ampliación del espectro HSQC de la fracción **GB** (ver **Figura 2.15**) se observan al menos 15 señales, cuyos desplazamientos químicos se presentan en la **Tabla 2.15**.

**Tabla 2.15.** Desplazamiento químico de las señales anoméricas del espectro HSQC de la fracción **GB**.

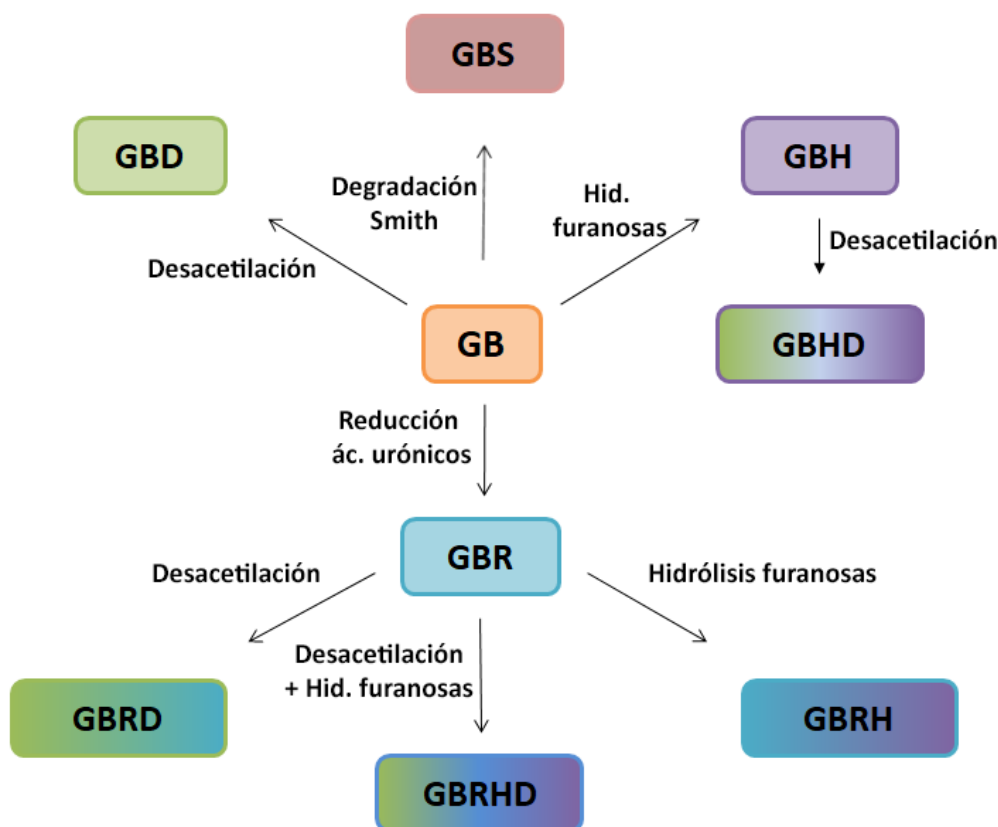
Desplazamiento químico (ppm)		Desplazamiento químico (ppm)	
$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
102,6	4,45	102,6	5,08
105,9	4,49	101,3	5,09
102,1	4,55	109,3	5,25
105,6	4,57	100,0	5,24
104,7	4,56	98,5	5,28
104,7	4,61	109,5	5,29
101,5	4,62	97,4	5,39
101,5	4,75	-	-

La gran cantidad de señales anoméricas y la posibilidad de que existan superposiciones en cada una de ellas nos obligó a realizar modificaciones químicas sobre la fracción **GB**, de manera de poder obtener información adicional que contribuya a la asignación de las señales. Con el análisis de los espectros de los productos modificados de la fracción **GB** se pudo lograr la caracterización estructural completa de los polisacáridos presentes en la goma brea.

Como se mencionó en la sección de análisis por metilación, los polisacáridos de la goma brea fueron reducidos y/o hidrolizados en condiciones ácidas suaves. Además, para el estudio por espectroscopia de RMN, se realizaron procesos de desacetilación de los polisacáridos empleando NaOH 0,1 M a 37°C por 6 h<sup>105</sup>. Al igual que para la fracción **GB**, todos estos derivados fueron estudiados mediante los experimentos de RMN 1D y 2D antes mencionados.



En la **Figura 2.16** se muestra un esquema de las modificaciones químicas realizadas sobre los polisacáridos de la fracción **GB**. Se puede observar que a los productos modificados ya mostrados en la sección anterior, se suman los correspondientes desacetilados: goma brea desacetilada (**GBD**); goma brea reducida y desacetilada (**GBRD**); goma brea hidrolizada y desacetilada (**GBHD**); goma brea reducida, hidrolizada y desacetilada (**GBRHD**) (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.10**).



**Figura 2.16.** Esquema de las modificaciones químicas realizadas y los productos obtenidos a partir de la fracción **GB**. **R** = Reducción; **H** = Hidrólisis de unidades furanósicas; **D** = Desacetilación; **S** = Tratamiento de Smith.

A continuación se muestran en las **Figuras 2.17-2.24** se presentan los espectros de RMN HSQC de todos los productos derivados de **GB**.

En el apéndice de este trabajo de Tesis se muestran el conjunto de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , TOCSY y NOESY de todas las fracciones (a excepción de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN que se presentan sólo de algunos derivados). En el presente capítulo se mostrarán las ampliaciones de las zonas de aquellos espectros que fueron necesarias para poder concluir el análisis detallado que nos llevó a obtener la mayor información estructural posible.

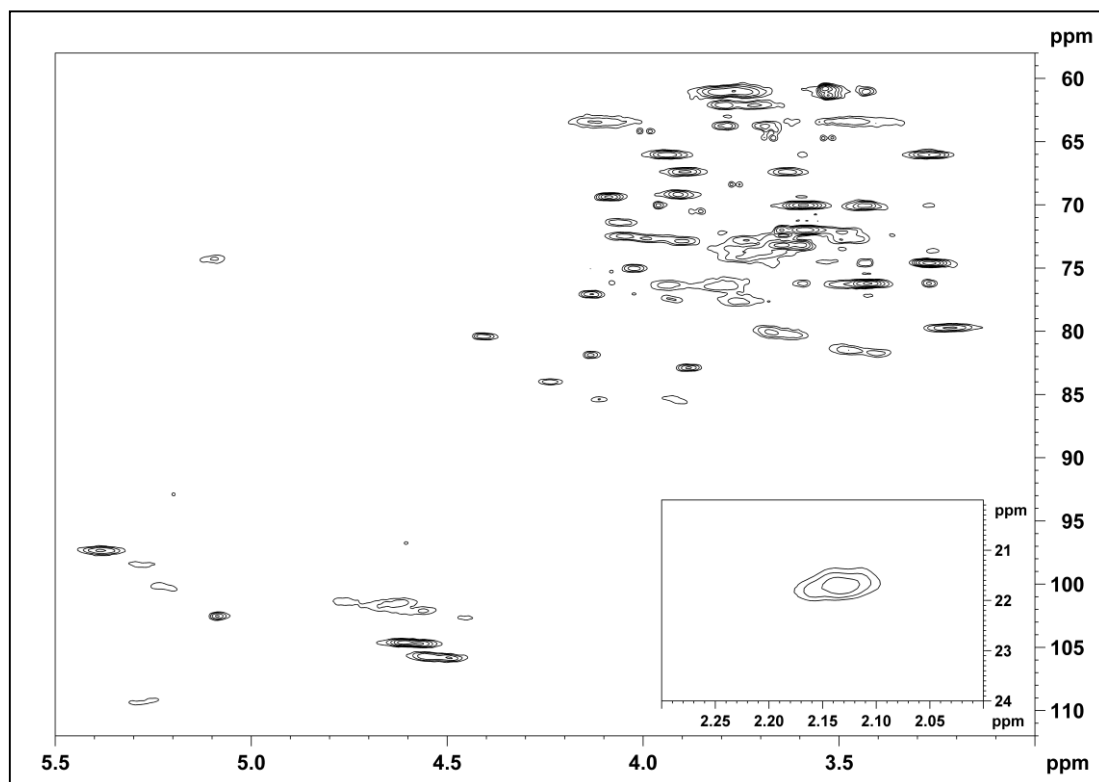


Figura 2.17. Espectro HSQC del derivado reducido **GBR** en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

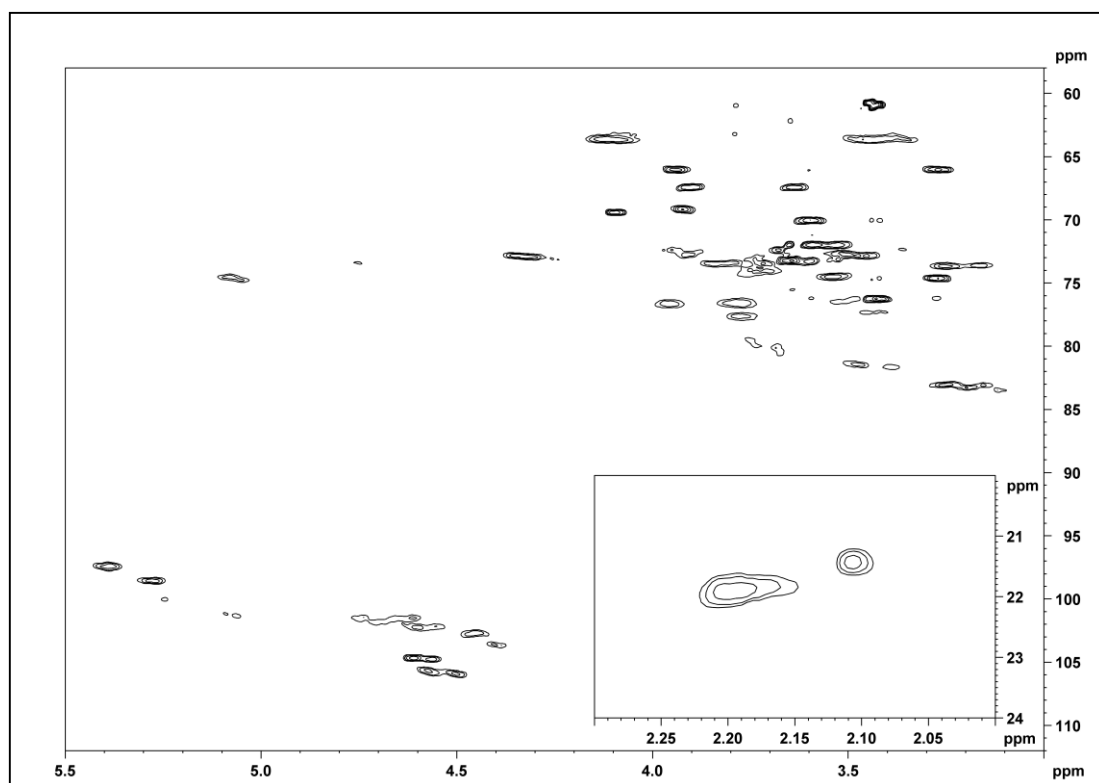


Figura 2.18. Espectro HSQC del derivado hidrolizado **GBH** en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

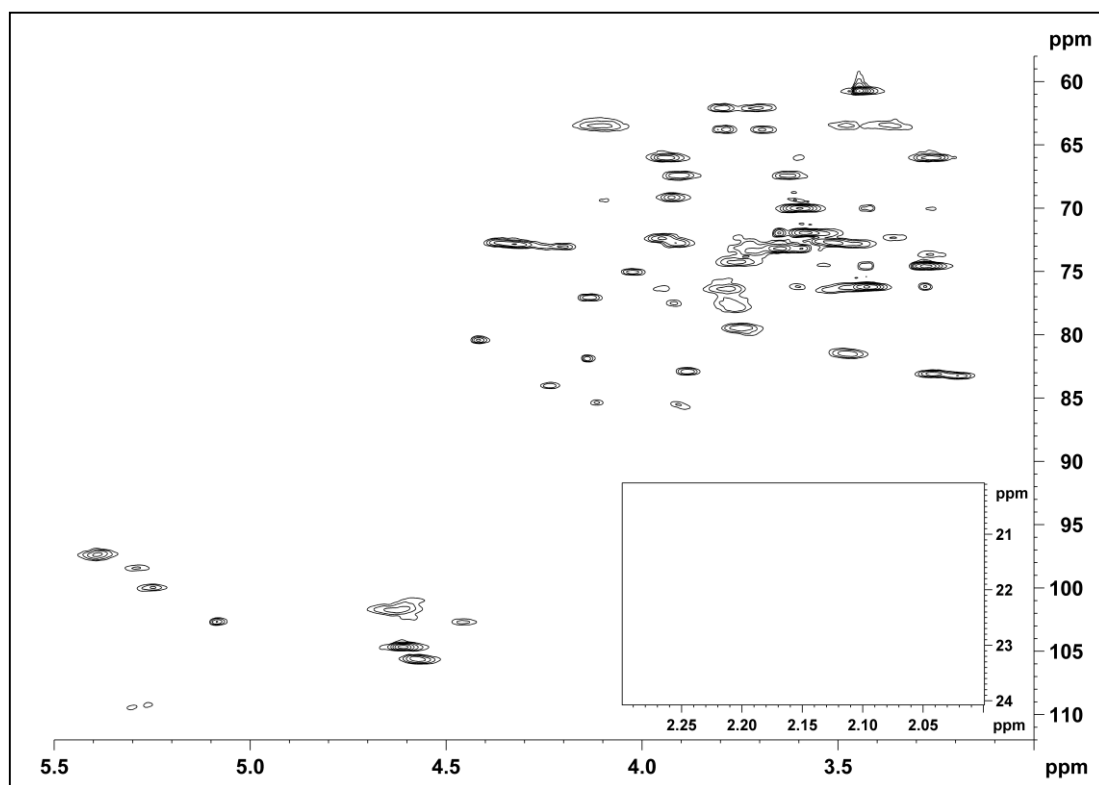


Figura 2.19. Espectro HSQC del derivado desacetilado **GBD** en  $D_2O$  a temperatura ambiente.

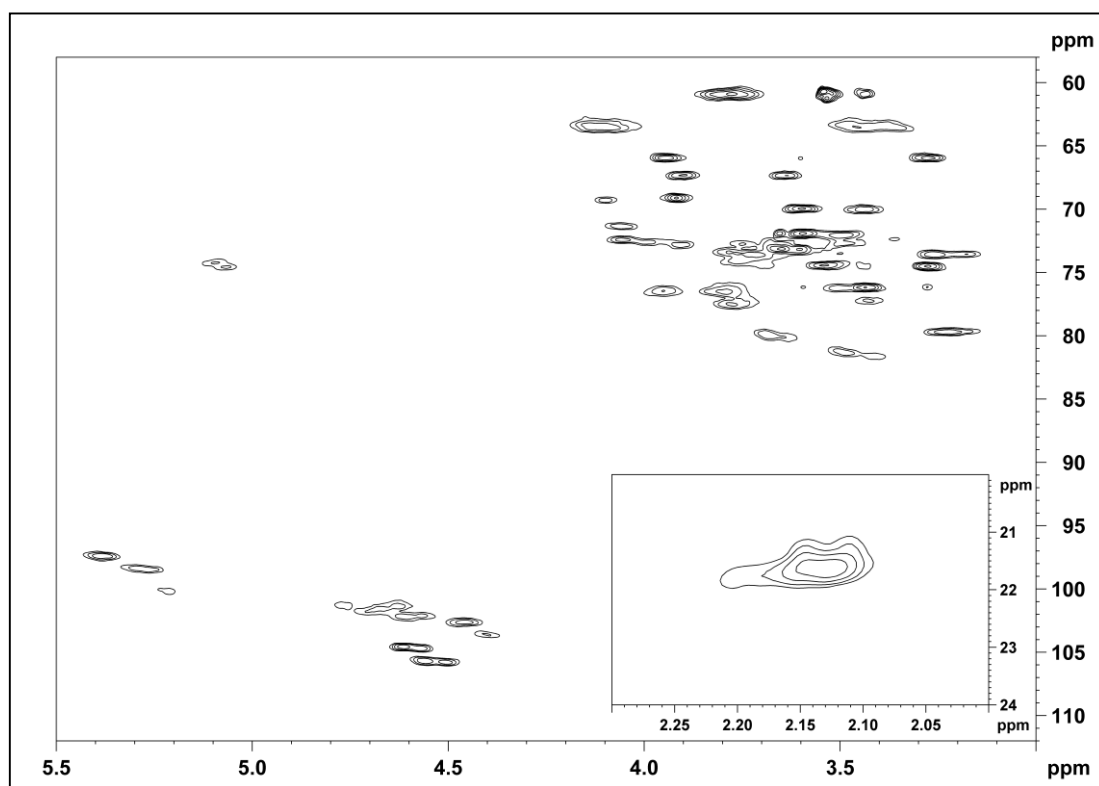


Figura 2.20. Espectro HSQC del derivado reducido e hidrolizado **GBRH** en  $D_2O$  a temperatura ambiente.

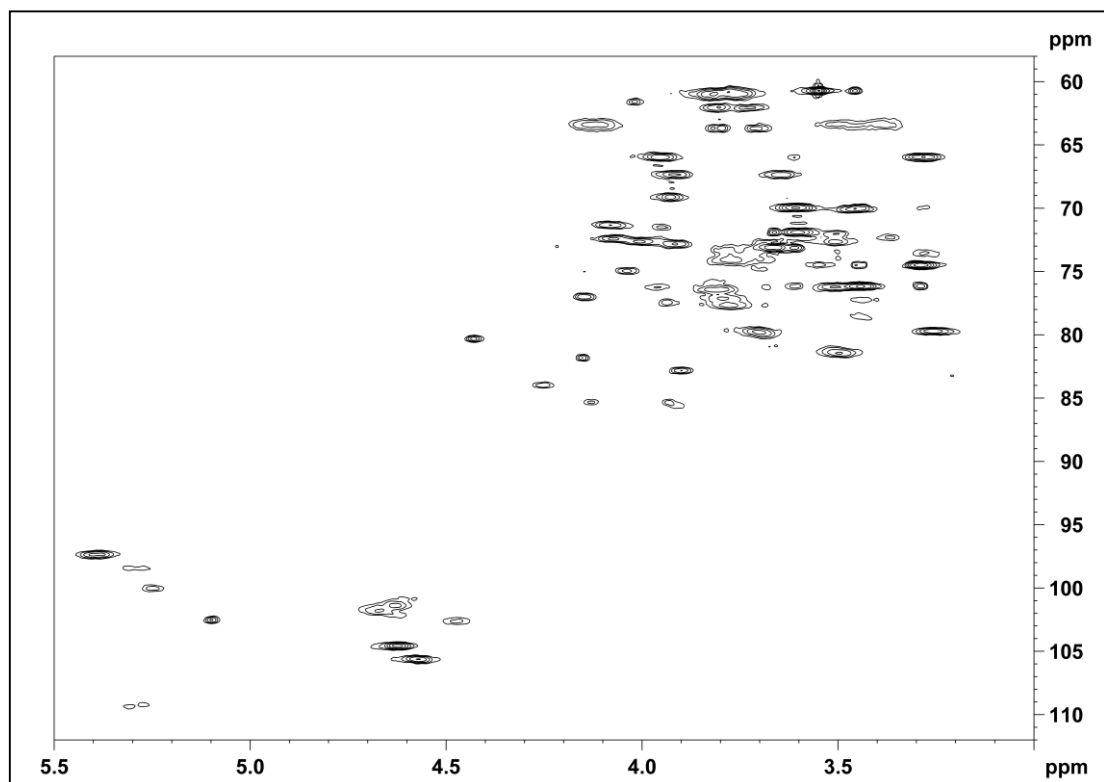


Figura 2.21. Espectro HSQC del derivado reducido y desacetilado **GBRD** en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

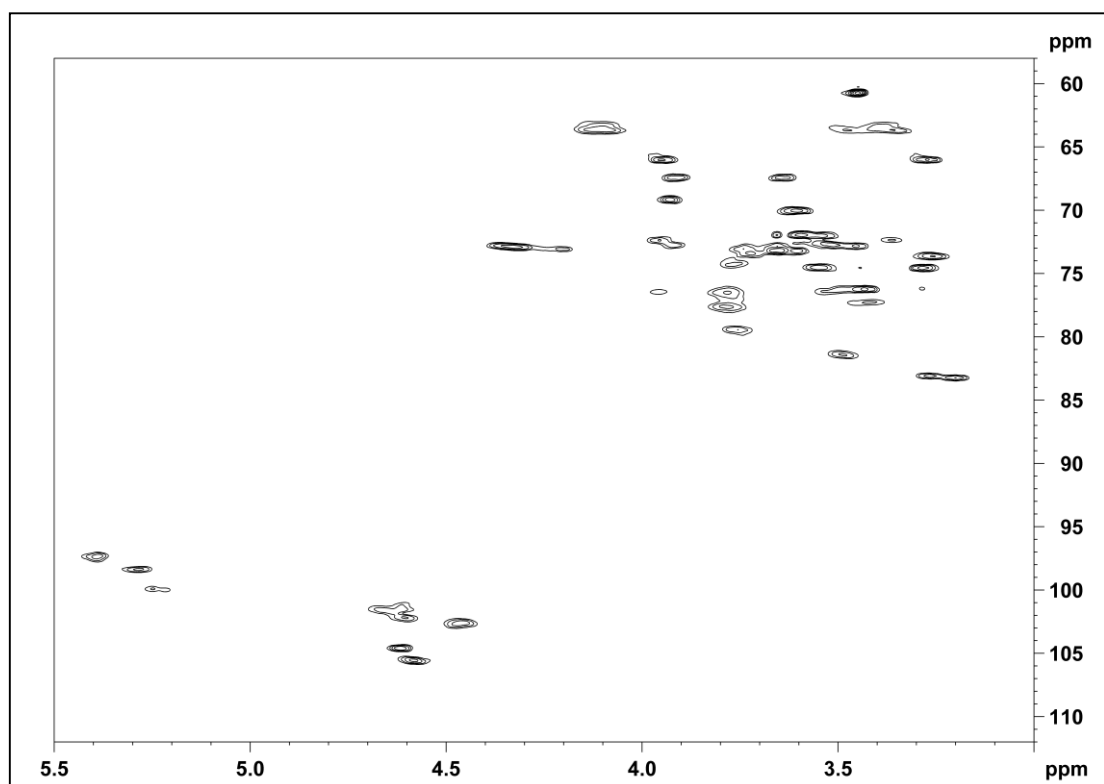


Figura 2.22. Espectro HSQC del derivado hidrolizado y desacetilado **GBHD** en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

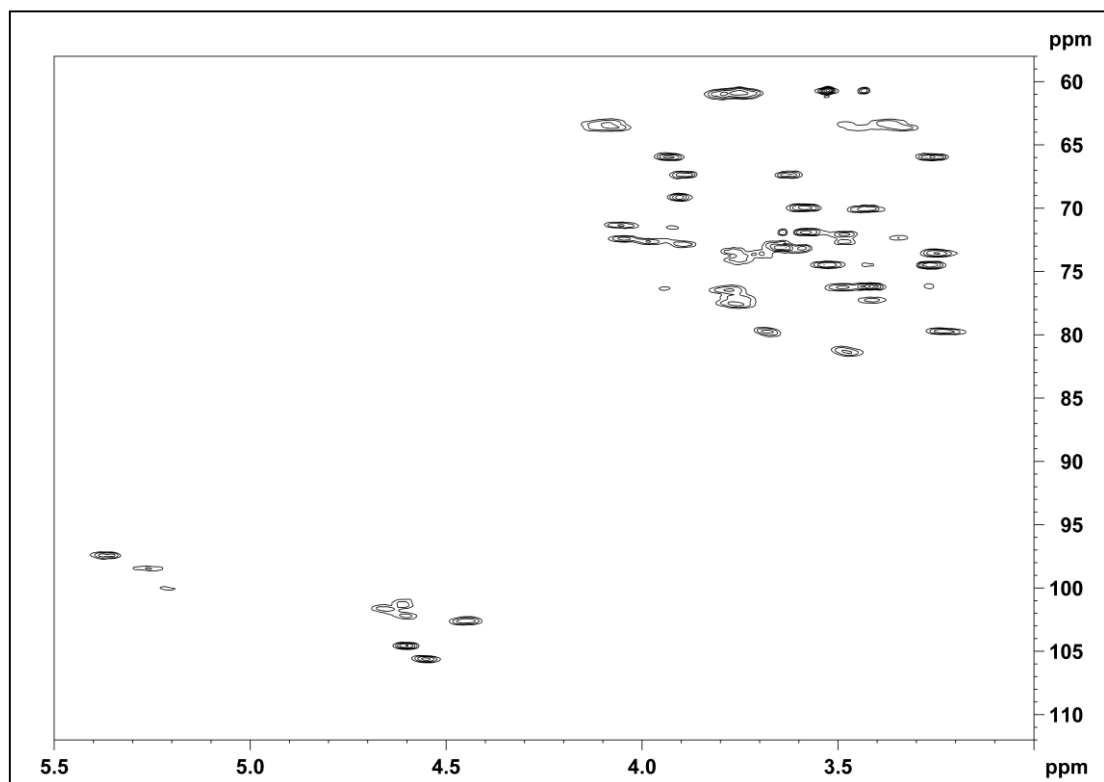


Figura 2.23. Espectro HSQC del derivado reducido, hidrolizado y desacetilado **GBRHD** en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

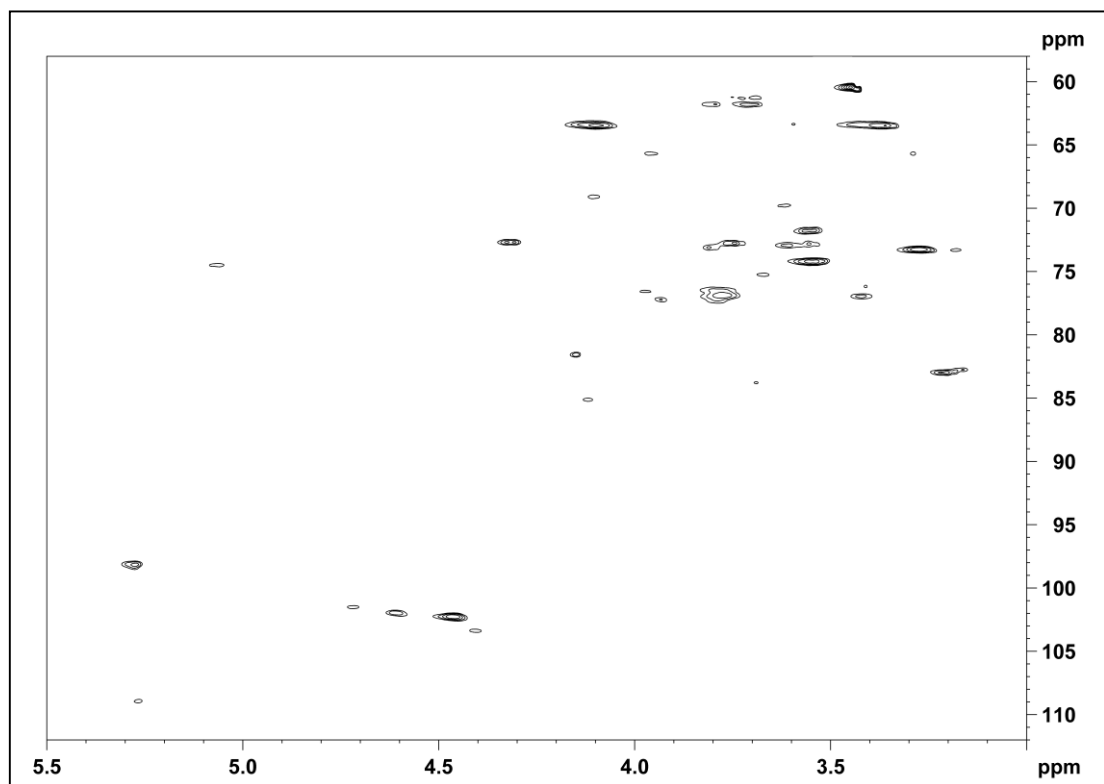


Figura 2.24. Espectro HSQC del derivado sometido al tratamiento de Smith **GBS** en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

En un análisis global preliminar de los espectros de las **Figuras 2.17-2.24** se puede apreciar que los espectros obtenidos de los productos modificados de la fracción **GB** presentan una menor cantidad de señales en comparación con el producto original, especialmente para los productos obtenidos con más de una modificación química. La disminución de la complejidad espectral se aprecia con mayor claridad en los espectros HSQC obtenidos de los derivados **GBHD**, **GBRHD** y **GBS** (**Figura 2.22**, **2.23** y **2.24** respectivamente). Por ejemplo, en los espectros correspondientes a las fracciones **GBHD** y **GBRHD** se aprecian en la zona anomérica un total de 9 señales, 6 menos en comparación con lo observado en el espectro HSQC de la fracción **GB**. Esta simplificación se verifica no sólo en los espectros HSQC de los distintos derivados sino que también se aprecia en general en los distintos espectros de RMN obtenidos de dichos productos. Por lo tanto, la utilización de los espectros de RMN de los productos derivados de **GB** obtenidos por modificaciones químicas controladas fue fundamental para el análisis estructural. En este punto es necesario aclarar que en todos los casos en los que se obtuvo información a partir de espectros obtenidos de derivados de **GB** se verificó que dichas señales estuviesen presentes en los espectros del polisacárido nativo.

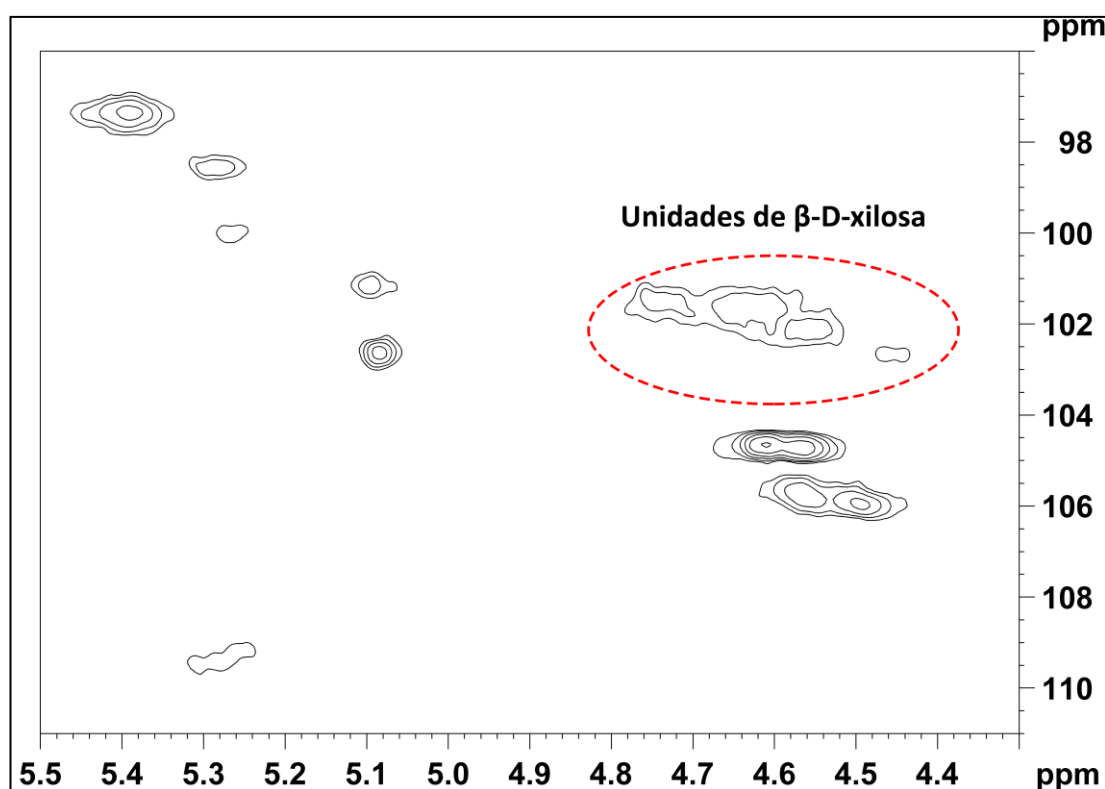
Como se verá en detalle posteriormente, la presencia de grupos acetilo introduce una complejidad adicional a los distintos espectros de RMN, debido a que un conjunto importante de fragmentos presentan señales prácticamente duplicadas con mínimas diferencias. La eliminación de los grupos acetilo disminuye la complejidad espectral sin perder información estructural de la conectividad de los distintos residuos, obviamente a excepción de dichos grupos. Por lo tanto, de modo de simplificar el análisis estructural, en una primera etapa se van a describir todos los fragmentos estructurales que no están influenciados por los grupos acetilo y se encuentran tanto en la fracción **GB** como en los productos desacetilados. Una vez descritas estas unidades, se completará el análisis estructural con los fragmentos que se encuentren acetilados o influenciados por la presencia de estos grupos.

## 2.2.4 Elucidación estructural de los polisacáridos de GB

### 2.2.4.1 Asignación de señales de RMN de xilopiranososa de cadena

En la zona anomérica del espectro HSQC de la **GB**, más precisamente en la región de 102 ppm y 4,40-4,75 ppm (ver **Figura 2.25**), se aprecian una gran cantidad de señales correspondientes a unidades de  $\beta$ -D-xilosa que se encontrarían en diferentes entornos químicos.

Cabe destacar que dentro de ese conjunto hay una señal claramente resuelta con  $\delta$  de 102,6/4,46 ppm. En la **Figura 2.26** se muestran ampliaciones de la zona anomérica de los espectros de RMN HSQC de todos los productos modificados obtenidos a partir de **GB** (a excepción del producto sometido al tratamiento de Smith GBS) donde se aprecia que esta señal anomérica se encuentra en todos los espectros mostrados.



**Figura 2.25.** Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC de la fracción **GB**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con unidades de  $\beta$ -D-xilopiranososa de cadena.

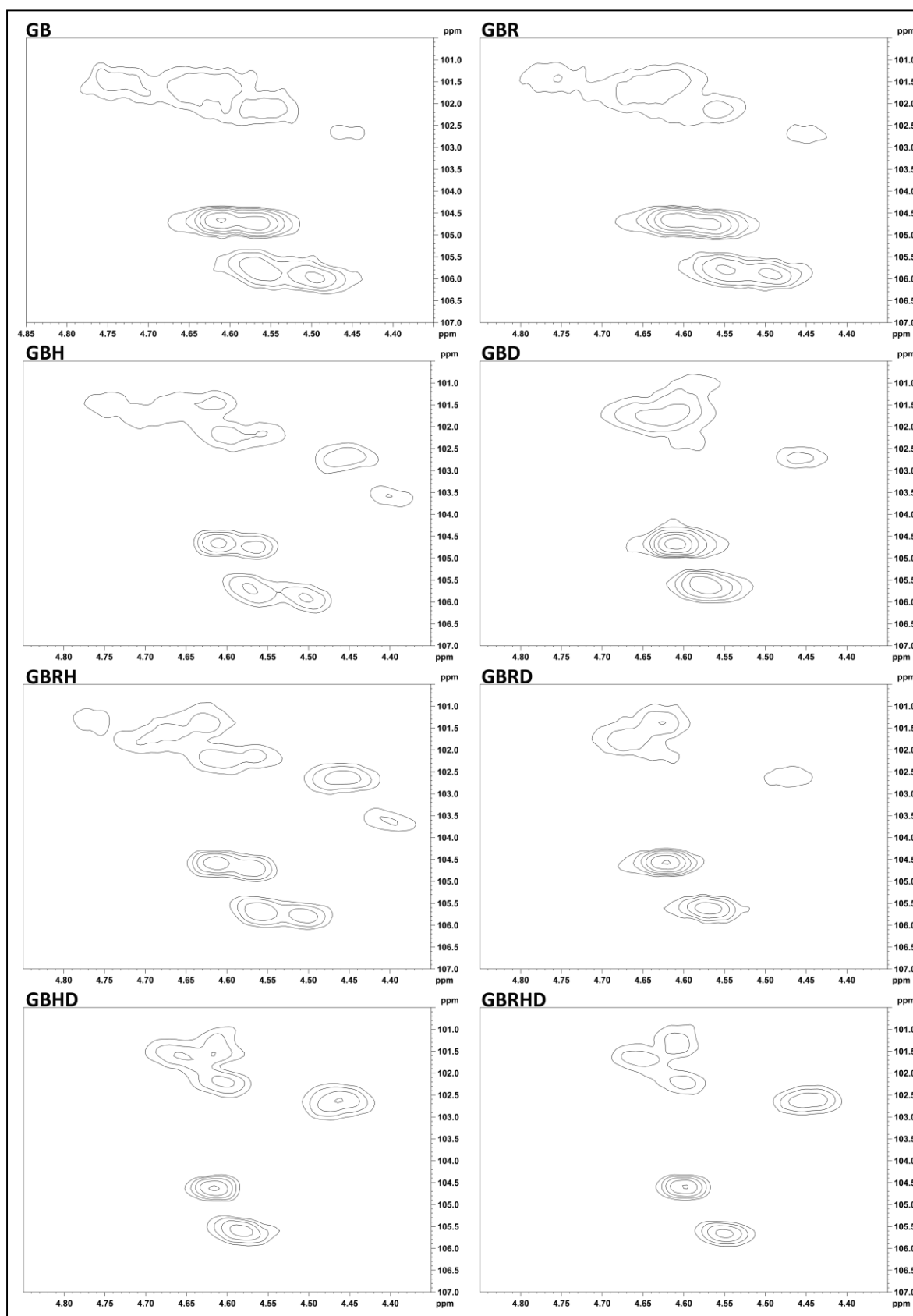


Figura 2.26. Ampliación de parte de la zona anomérica de espectros HSQC de la fracción GB y sus productos modificados.



Al comparar las ampliaciones de los espectros HSQC de la **Figura 2.26** se observa que la intensidad relativa de la señal descrita a 102,6/4,46 ppm es variable, siendo más intensa en los productos que fueron desacetilados y parcialmente hidrolizados (**GBHD** y **GBRHD**). En consecuencia y coincidiendo con los antecedentes bibliográficos<sup>55,59,100,106</sup>, la señal a 102,6 y 4,46 ppm fue asignada al C-1/H-1 de las unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xilopiranosas sin ningún sustituyente lateral (**Figura 2.82**, **Tabla 2.16**, unidad **X**). La presencia de este tipo de unidades es coincidente con los resultados obtenidos en el análisis por metilación.

Además, cabe destacar que la zona mostrada de los espectros de la **Figura 2.26** presenta una serie de señales que varían aún en los productos más modificados. Este factor facilitó la interpretación de los espectros correspondiente a la goma brea original y a los de sus productos modificados.

La asignación de los protones de la unidad **X** se realizó utilizando espectros TOCSY mediante las señales de correlación entre los hidrógenos del residuo y el H-1, a excepción de uno de los hidrógenos en posición 5 que debió ser asignado por medio de los espectros HSQC. Con esta información se pudo completar la asignación de los carbonos correspondientes a dichos protones mediante el empleo de espectros HSQC. En las **Figuras 2.27** y **2.28** se muestran ampliaciones del espectro TOCSY del producto **GBRHD** y del espectro HSQC del producto **GBHD** respectivamente donde se aprecian las señales asignadas a la unidad  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  (**X**). La utilización de los espectros de los productos menos ramificados facilitó notablemente la interpretación de los mismos, y debe tenerse en consideración que las señales están presentes en los espectros de la goma brea original (**GB**), aunque con mucha menos resolución por estar superpuestas con otras señales (ver **Figuras 2.84-2.86**). La asignación completa de esta unidad se muestra en la **Tabla 2.16**.

**Tabla 2.16.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales correspondientes a la unidad de xilosa de cadena no sustituida (**X**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ( <b>X</b> )	102,6 4,46	73,6 3,26	74,5 3,55	76,7* 3,77	63,5 4,11; 3,36

\* En el espectro de HSQC de **GB** esa señal se observó entre 76,7 y 77,1 ppm.

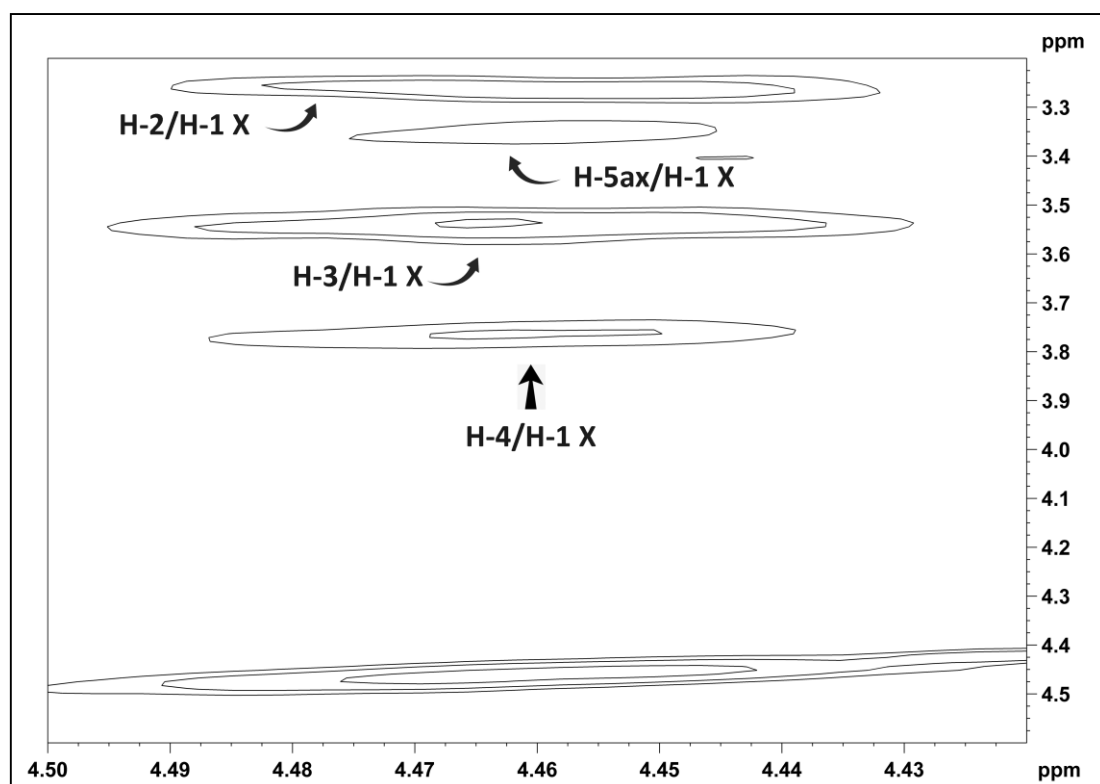


Figura 2.27. Ampliación del espectro TOCSY del producto **GBRHD** donde se muestran las correlaciones entre el H-1 de la unidad **X** y el resto de los protones del residuo.

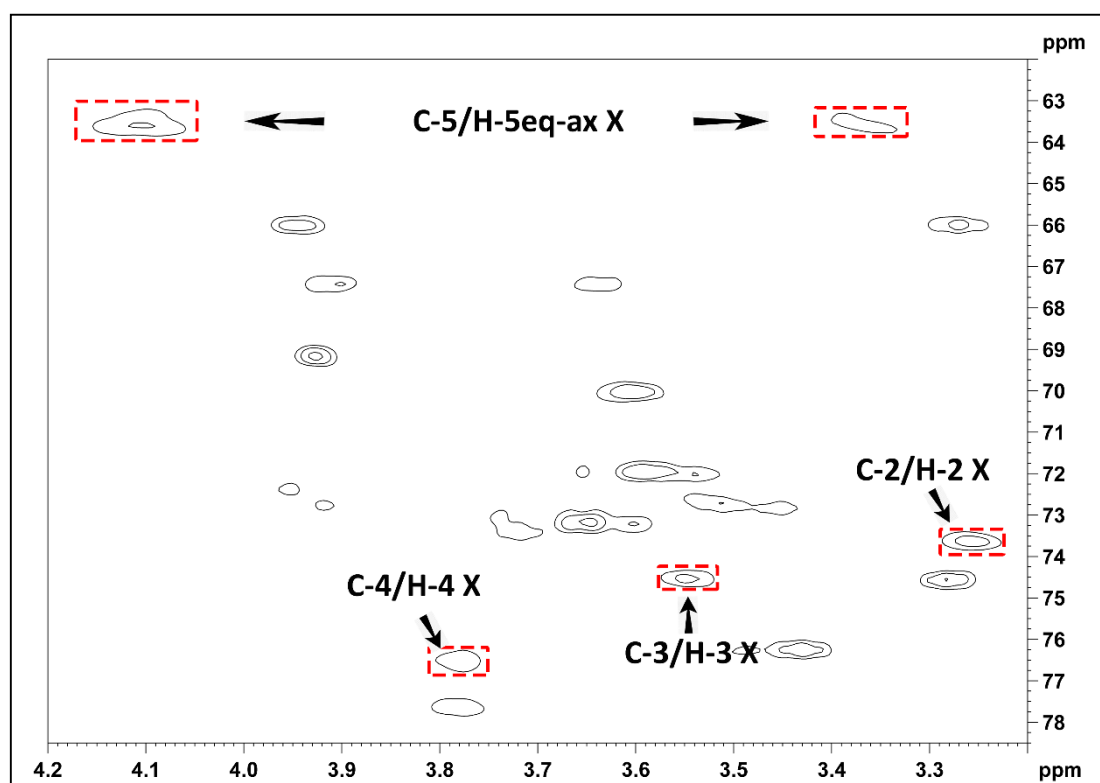
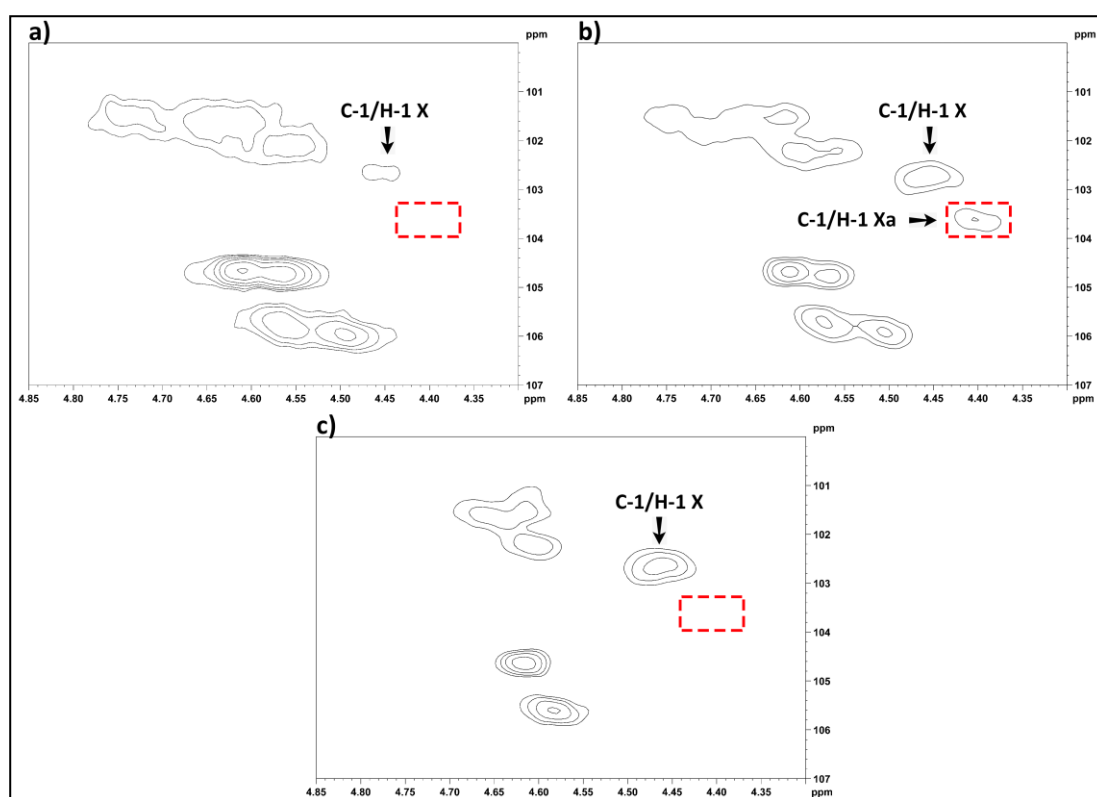


Figura 2.28. Ampliación del espectro HSQC del producto **GBHD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden a las correlaciones C2-5/H2-5 de la unidad **X**.

Al comparar la región anomérica de los espectros de RMN HSQC de la **Figura 2.26**, se puede apreciar que en los espectros de los productos hidrolizados parcialmente **GBH** y **GBRH** aparece una señal a 103,6 y 4,41 ppm, la cual desaparece en los espectros HSQC de esos productos cuando se desacetilan (**GBHD** y **GBRHD**). En la **Figura 2.29** se muestran en detalle las ampliaciones de los espectros de a) **GB**, b) **GBH** y c) **GBHD** donde se puede observar claramente la aparición de dicha señal. En el espectro c) correspondiente al producto **GBHD** se aprecia que al mismo tiempo que la mencionada señal anomérica desaparece, la correspondiente a la unidad **X** se intensifica.



**Figura 2.29.** Comparación de las ampliaciones de la zona anomérica de espectros HSQC de a) **GB**, b) **GBH** y c) **GBHD**. La señal marcada en rojo se corresponde con la correlación C-1/H-1 de la unidad **Xa**.

Al hidrolizar las unidades furanósicas que se encuentran como cadenas laterales se genera un polisacárido con una mayor cantidad de unidades de xilosa de cadena sin sustituir (ver análisis por metilación, **Tabla 2.8**). Los desplazamientos químicos encontrados para el resto de las señales de la unidad cuyo C-1/H-1 presentan  $\delta$  de 103,6 y 4,41 ppm resultaron ser muy similares a los encontrados para la unidad **X**. Además, estas señales en los espectros de

RMN están relacionadas con la presencia de grupos acetilos en el polisacárido, ya que las mismas desaparecen en los espectros de los productos desacetilados. Sin embargo, por el análisis de los desplazamientos químicos encontrados se descartó la posibilidad que esta unidad estuviera acetilada. La explicación encontrada, que coincide con los antecedentes bibliográficos<sup>57,106,107</sup> consultados, es que se trata de una unidad del tipo  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-xilosa-(1 $\rightarrow$ ) unida a otra unidad similar que se encuentra sustituida con un grupo acetilo (unidad **Xa**, **Figura 2.82**), es decir, una unidad que se encuentra influenciada por el entorno que le genera el acetilo en la unidad vecina.

En la **Tabla 2.17** se muestra la asignación completa de las señales de este residuo en comparación con la unidad **X**.

**Tabla 2.17.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales correspondientes de las unidades de xilosa de cadena no sustituidas (**X** y **Xa**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
$\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) ( <b>X</b> )	102,6 4,46	73,6 3,26	74,5 3,55	76,7* 3,77	63,5 4,11; 3,36
$\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) ( <b>Xa</b> ) (unidad vecina O-acetilada)	103,6 4,41	73,6 3,18	74,5 3,52	77,5 3,74	63,5 4,08; 3,41

\* En el espectro de HSQC de **GB** esa señal se observó entre 76,7 y 77,1 ppm.

Como los polisacáridos que constituyen **GB** se encuentran altamente sustituidos, es probable que la unidad **Xa** no exista o que se encuentra en una muy baja proporción en esta fracción. Consecuentemente, las señales correspondientes a esta unidad en los espectros de **GB** seguramente sean muy pequeñas, lo que sumado al alto grado de superposición con las señales de la unidad **X** resultan difíciles de observar.

#### 2.2.4.2 Asignación de señales de RMN de residuos arabinofurósicos

Observando la ampliación de la zona anomérica del espectro RMN HSQC de la fracción **GB** (ver **Figura 2.15**) se pueden apreciar un conjunto de señales con desplazamientos químicos en torno a 109,4 y 5,27 ppm que según antecedentes bibliográficos corresponden a unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa<sup>59,62,65,108</sup>.

En la **Figura 2.30 a)** se muestra una ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC del producto **GBD** donde pueden observarse dos señales que presentan desplazamientos químicos de 109,3/5,25 ppm y 109,5/5,29 ppm. En función de los resultados obtenidos del análisis por metilación (ver **sección 2.1.6** y **Tabla 2.8**) y los antecedentes bibliográficos consultados<sup>59,62,65,108</sup>, estas señales con  $\delta$  de 109,3/5,25 ppm y a 109,5/5,29 ppm en el espectro HSQC de **GBD** fueron asignadas a la correlación C-1/H-1 de unidades de  $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$  y  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$  respectivamente (**Figura 2.82**, unidades **Af $\alpha$**  y **Af $\alpha$ 3R**).

En la **Figura 2.30 b)** se muestra una ampliación en la zona anomérica del espectro HSQC de la fracción hidrolizada **GBHD**, donde se observa la desaparición de las señales asignadas a los residuos de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa **Af $\alpha$**  y **Af $\alpha$ 3R**, confirmándose de esta manera la asignación realizada.

La asignación completa de las unidades **Af $\alpha$**  y **Af $\alpha$ 3R** pudo realizarse mediante el análisis combinado de espectros TOCSY y HSQC. Se utilizaron espectros de fracciones desacetiladas debido a que los mismos presentan una menor cantidad de señales y por lo tanto de superposición de las mismas, lo que facilitó la asignación. Se corroboró que las señales identificadas estuviesen presentes en los espectros de RMN de la fracción original **GB**, por lo que no se observó ninguna incidencia de los grupos aceto sobre las señales originadas de arabinosas furanósicas.

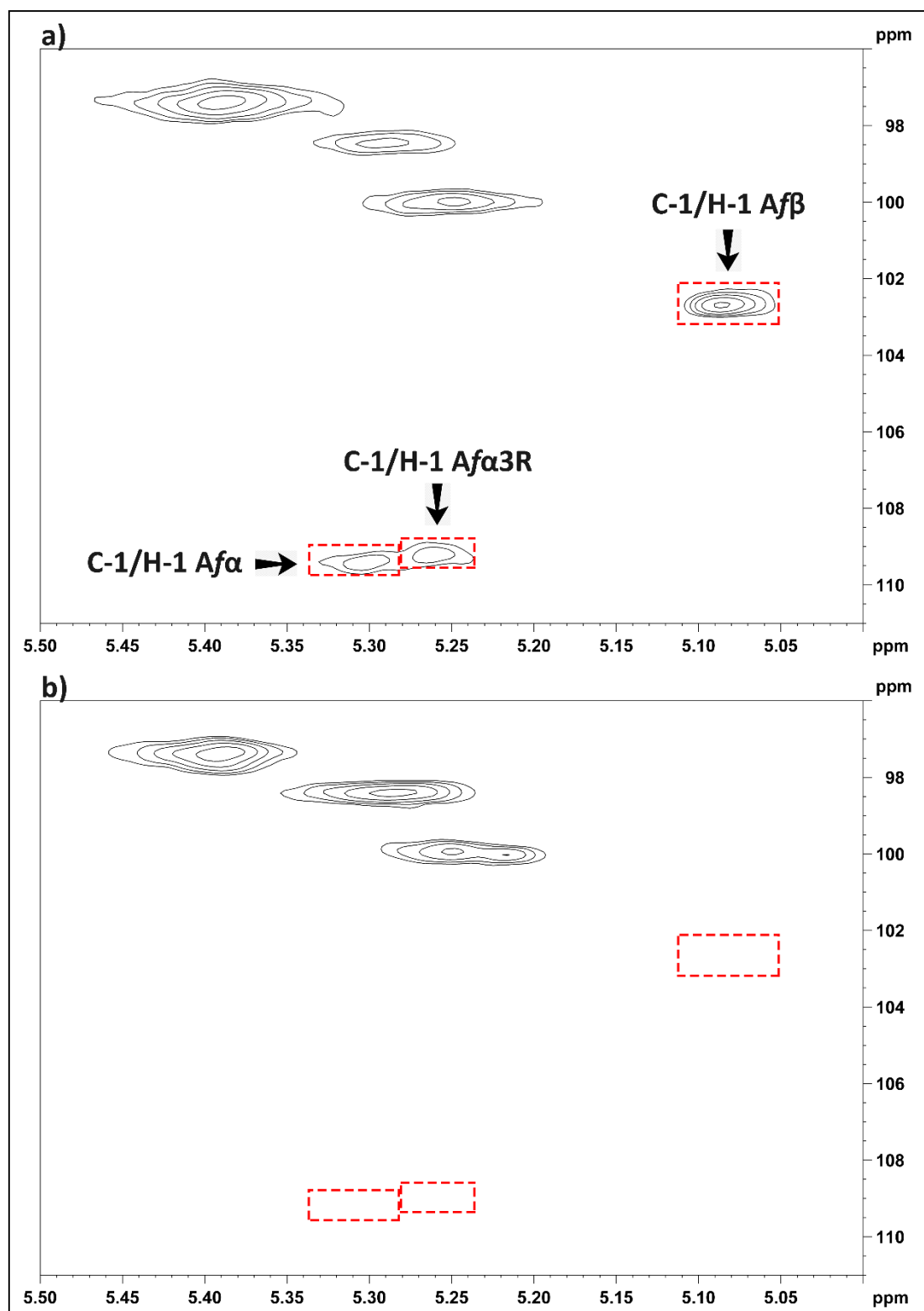


Figura 2.30. Ampliación de la zona anomérica de los espectros de HSQC de los productos a) GBD y b) GBHD.

En la **Figura 2.31** se muestra una ampliación de la región de desplazamiento químico comprendida entre 4,55 y 4,25 ppm de los espectros de RMN TOCSY de las fracciones **GBD** y **GBHD**. En la ampliación del espectro TOCSY de **GBD** se pueden observar las señales de acoplamiento entre el H-2 de la unidad **Afa3R** con el resto de los hidrógenos del residuo. Se seleccionó el H-2 por sobre el protón anomérico para mostrar el acoplamiento con el resto de los protones de la unidad debido a que las señales se encuentran mejor resueltas. Con esta información, en conjunto con los antecedentes bibliográficos mencionados<sup>59,62,65,108</sup>, se pudieron asignar todos los protones del residuo. En el espectro de **GBHD** (espectro inferior b)) se observa que luego del proceso de hidrólisis suave dichas señales desaparecen, confirmando que las señales pertenecen a residuos furanósicos.

El mismo procedimiento se realizó para la señal **Afa**, empleando el espectro TOCSY de **GBD** para poder identificar todos los protones del residuo y describir sus desplazamientos químicos (ver **Figura 2.32**, no se muestran las señales de correlación con los H5). Con la información del desplazamiento químico de todos los protones de las unidades **Afa** y **Afa3R**, en conjunto con los antecedentes bibliográficos mencionados, se pudieron asignar las señales de los carbonos correspondientes empleando el espectro HSQC de la fracción original **GB**. La asignación completa de las señales correspondientes a las unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa en la fracción **GB** se presentan en la **Tabla 2.18**.

**Tabla 2.18.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales correspondientes a las unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (**Afa** y **Afa3R**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5 eq/H-5 ax
$\alpha$ -L -Araf-(1→ ( <b>Afa</b> )	109,3	81,8	77,5	85,3	62,1
	5,25	4,13	3,92	4,11	3,71;3,79
→3)- $\alpha$ -L-Araf-(1→ ( <b>Afa3R</b> )	109,5	80,4	85,4	84,0	62,1
	5,29	4,40	3,91	4,23	3,71;3,79

De los valores de desplazamiento químico informados en la **Tabla 2.18** se aprecia que las mayores diferencias se presentan en el C-3 de la unidad **Afa3R** (+7,9 ppm respecto de la unidad **Afa**) y en el valor correspondiente al H-2 **Afa3R** (+0,27 ppm respecto de **Afa**).

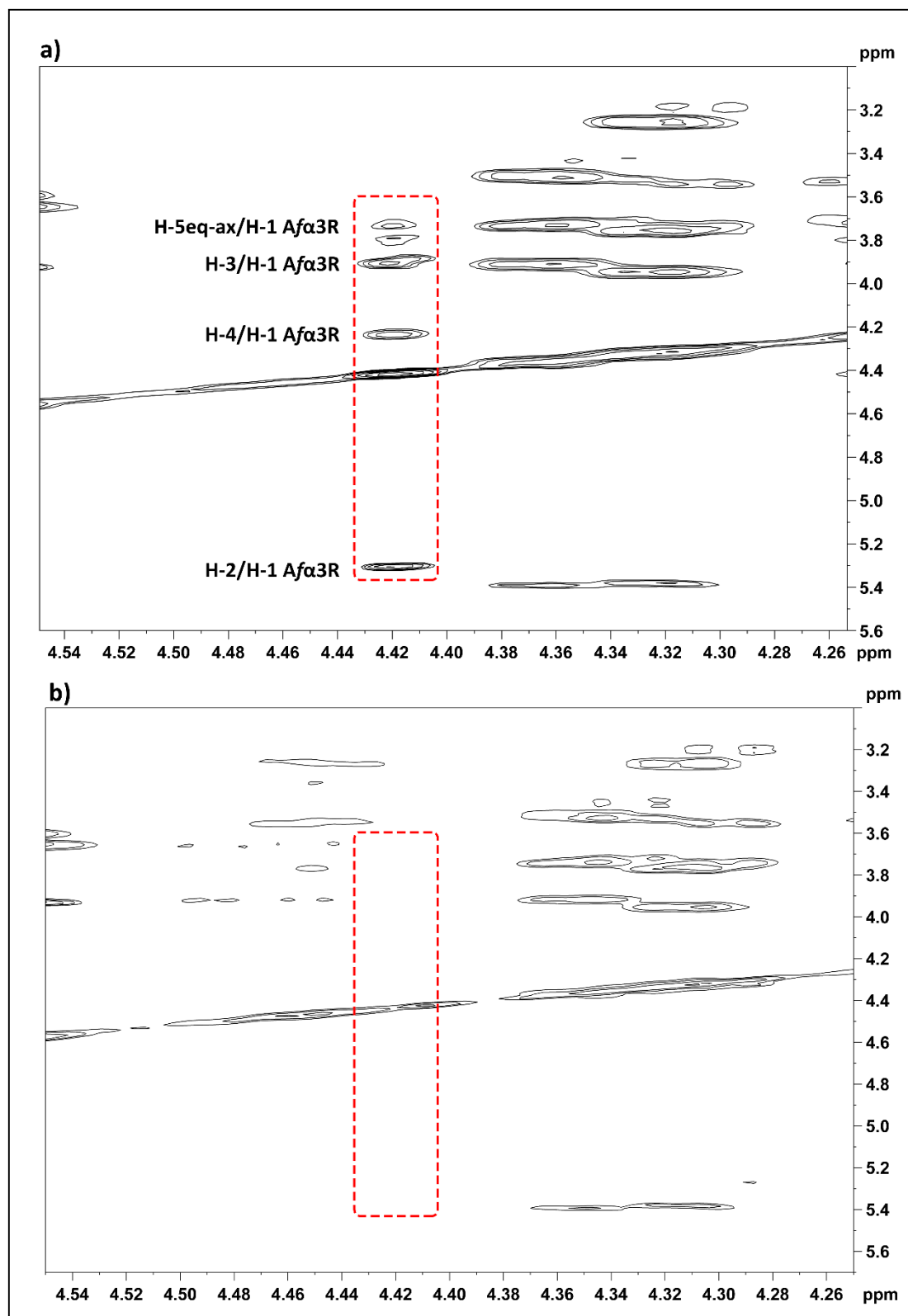
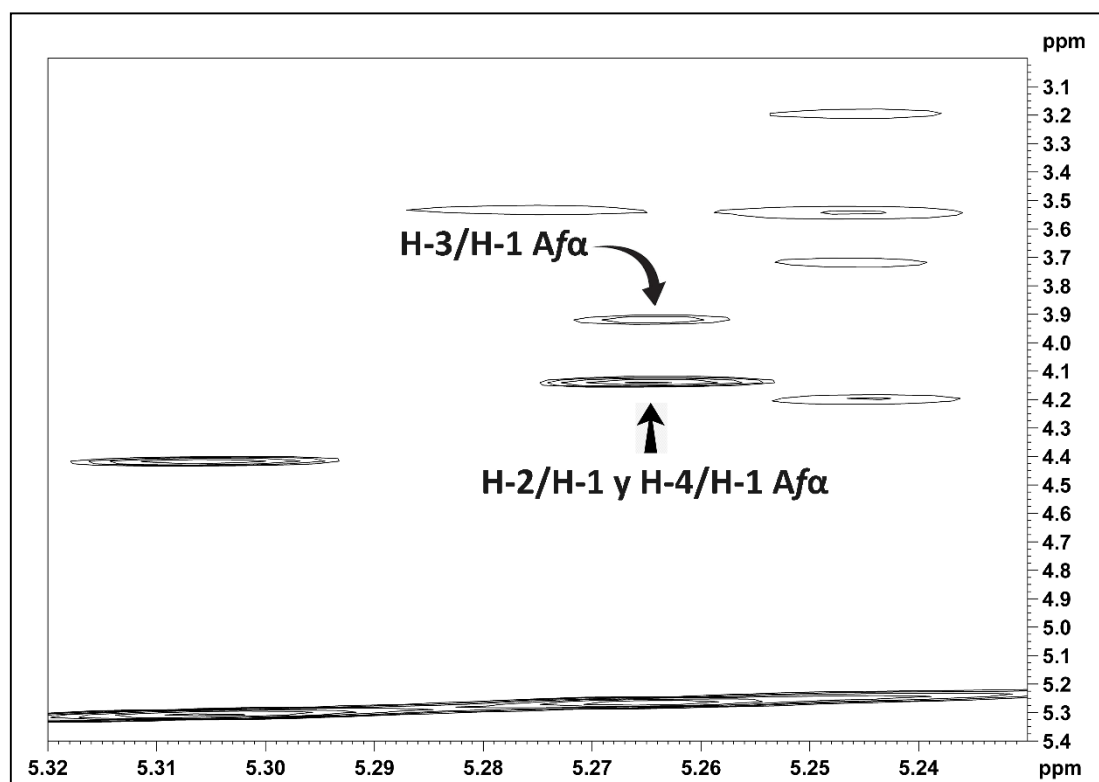


Figura 2.31. Ampliación de los espectros TOCSY de los productos a) **GBD** y b) **GBHD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con la correlación del H-2 con el resto de los protones del residuo arabinofuranósico **Afa3R**.





**Figura 2.32.** Ampliación del espectro TOCSY del producto desacetilado **GBD** donde se observan señales de correlación entre el H-1 de la unidad **Afa** y los H2-4.

Asimismo se compararon los espectros HSQC de las fracciones **GB** y **GBH** (ver **Figura 2.33** a) **GB** y b) **GBH**), corroborando que las señales asignadas a las unidades **Afa** y **Afa3R** desaparecían luego del proceso de hidrólisis selectivo para residuos furanósicos.

Como se discutió en el análisis por metilación (ver **secciones 2.1.6** y **2.1.9**) se encontró evidencia de la presencia de unidades de  $\rightarrow 5$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ) (derivado 2,3-di-O-metilarabinosa). Si bien se buscaron señales en los espectros de RMN de **GB** y sus derivados para confirmar la presencia de dicho residuo, no se pudieron encontrar señales compatibles con residuos de  $\rightarrow 5$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ), probablemente debido a su baja proporción y a que las mismas se superponen parcialmente con las originadas en otras unidades.

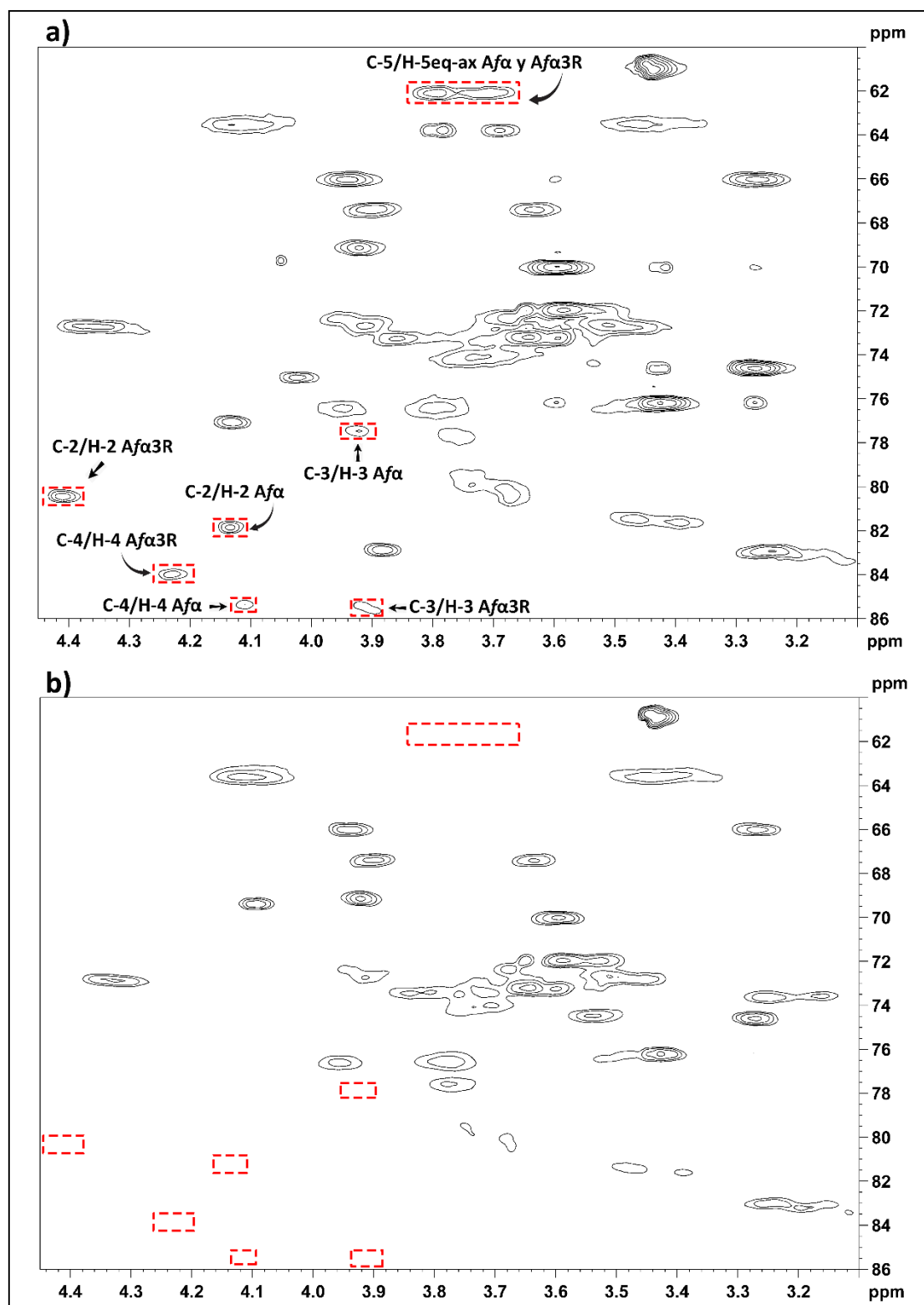


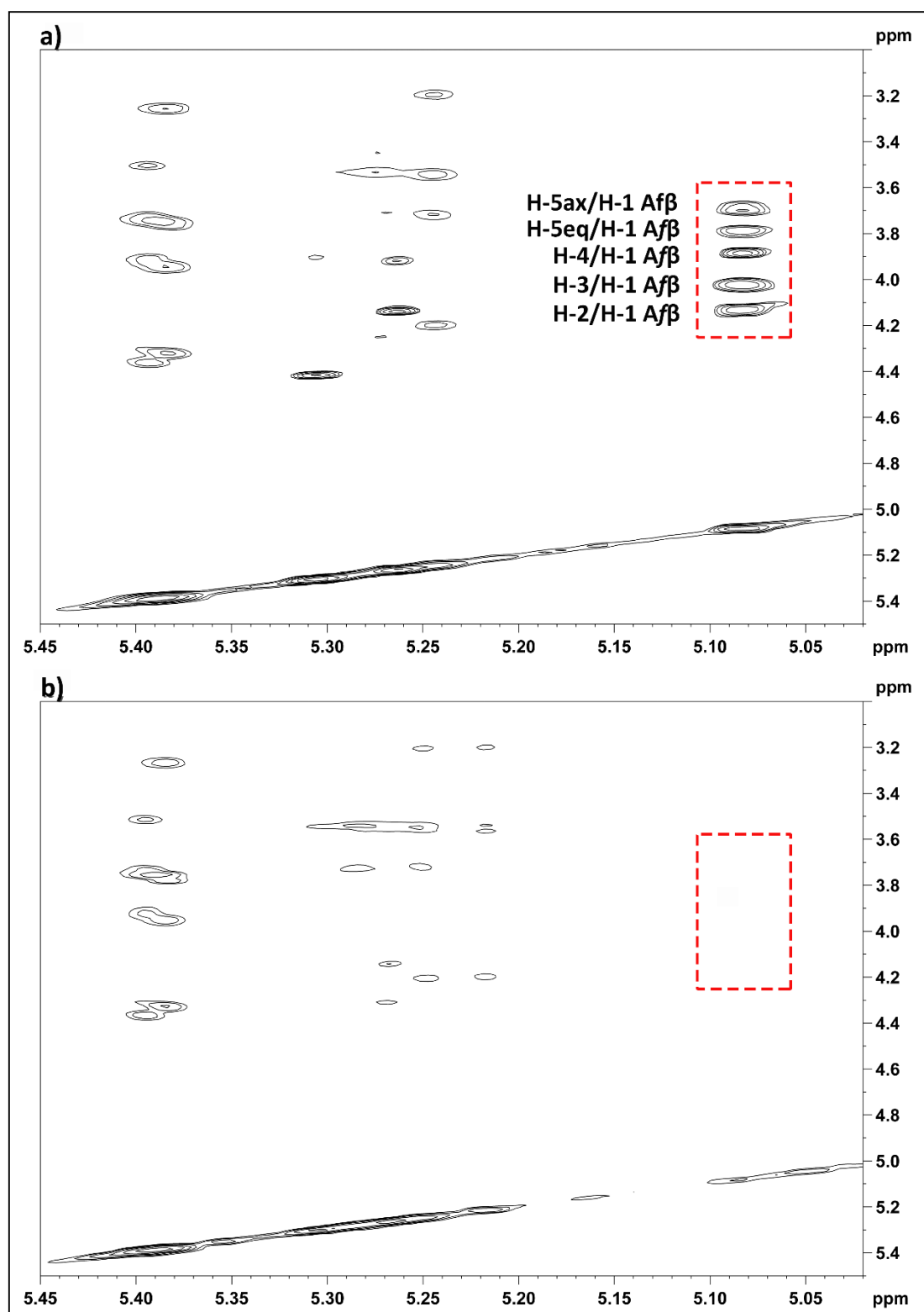
Figura 2.33. Ampliaciones de espectros HSQC de los productos a) GB y b) GBH. Las señales marcadas en rojo se corresponden con los C2-5/H2-5 de los residuos arabinofuranósicos *Afa* y *Afa3R*.

Al continuar analizando los espectros de los productos hidrolizados parcialmente, se observó en la zona anomérica una señal a 102,6/5,08 ppm que también desaparecía (ver **Figura 2.30** a) y b)). Este resultado indicaba que en la goma brea existen otras unidades furanósicas plausibles de ser hidrolizadas en condiciones suaves. En coincidencia con lo reportado en la bibliografía<sup>62,108,109</sup> dicha señal fue asignada a la correlación C-1/H-1 de una unidad terminal de  $\beta$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ) (unidad **Af $\beta$** , ver **Figura 2.82**).

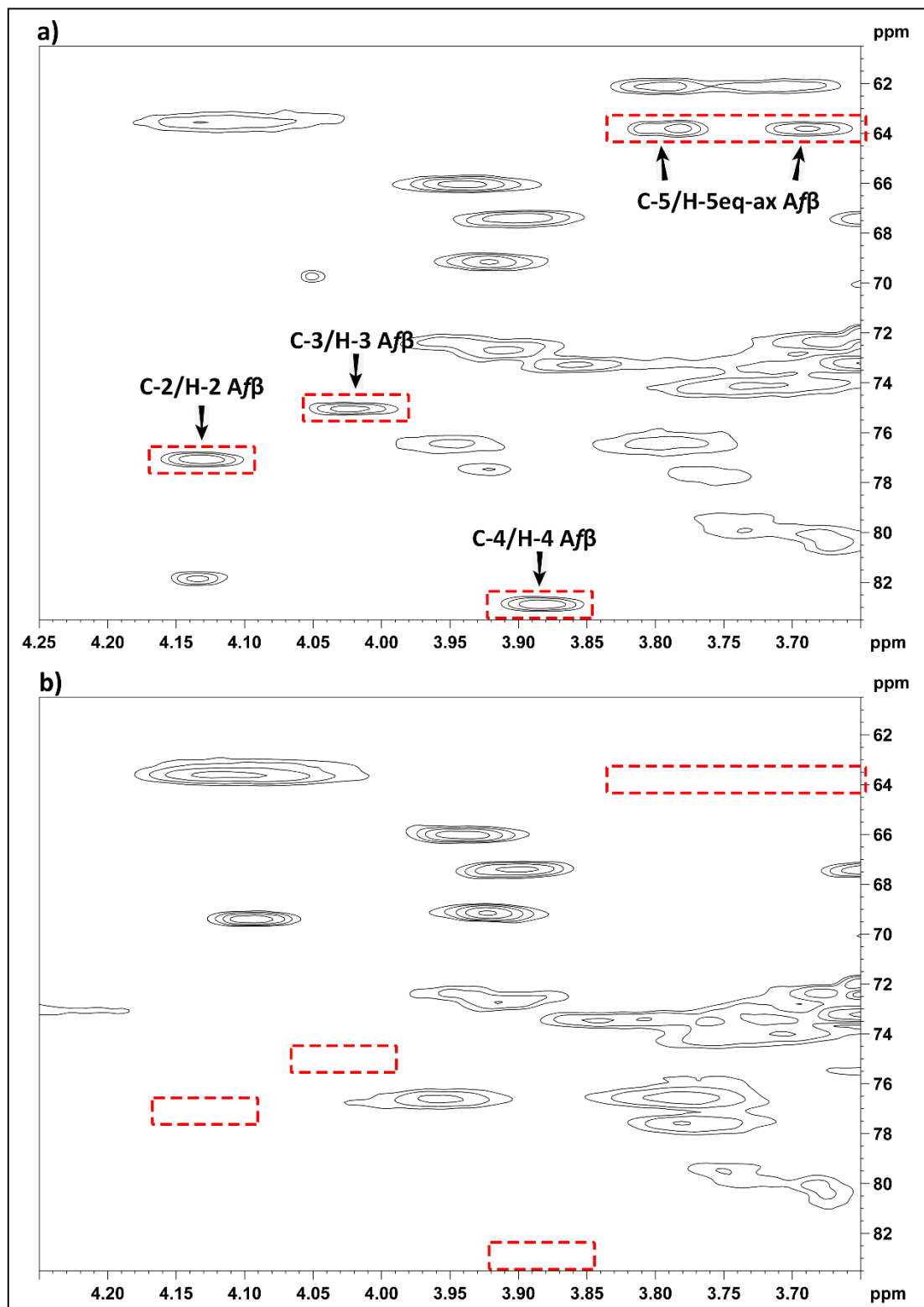
La asignación completa de dicha unidad fue realizada con el mismo procedimiento utilizado para los residuos **Afa** y **Afa3R**. Con la utilización de espectros TOCSY de fracciones desacetiladas se pudieron asignar las señales de los átomos de hidrógeno restantes de dicha unidad. En la **Figura 2.34** se muestra una ampliación de la región de los protones anoméricos de los espectros TOCSY de las fracciones a) **GBD** y b) **GBHD**. En el espectro del producto **GBD** están marcadas todas las señales de acoplamiento H-H entre el protón anomérico y el resto de los protones del residuo **Af $\beta$** . Con dicha información en el espectro RMN HSQC de la fracción **GB** se pudieron asignar las señales pertenecientes a los carbonos correspondientes (ver **Figura 2.35** a)). La asignación completa de todas las señales de C/H se puede observar en la **Tabla 2.19**.

**Tabla 2.19.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales originadas en la unidad terminal de  $\beta$ -L-arabinofuranosas (**Af $\beta$** ).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5 eq/H-5 ax
$\beta$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ) ( <b>Af<math>\beta</math></b> )	102,6	77,0	75,0	82,8	63,8
	5,08	4,13	4,01	3,88	3,69;3,78



**Figura 2.34.** Ampliaciones de los espectros TOCSY de los productos a) **GBD** y b) **GBHD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con las correlaciones del H-1 con el resto de los protones del residuo arabinofuranósico **Afβ**.



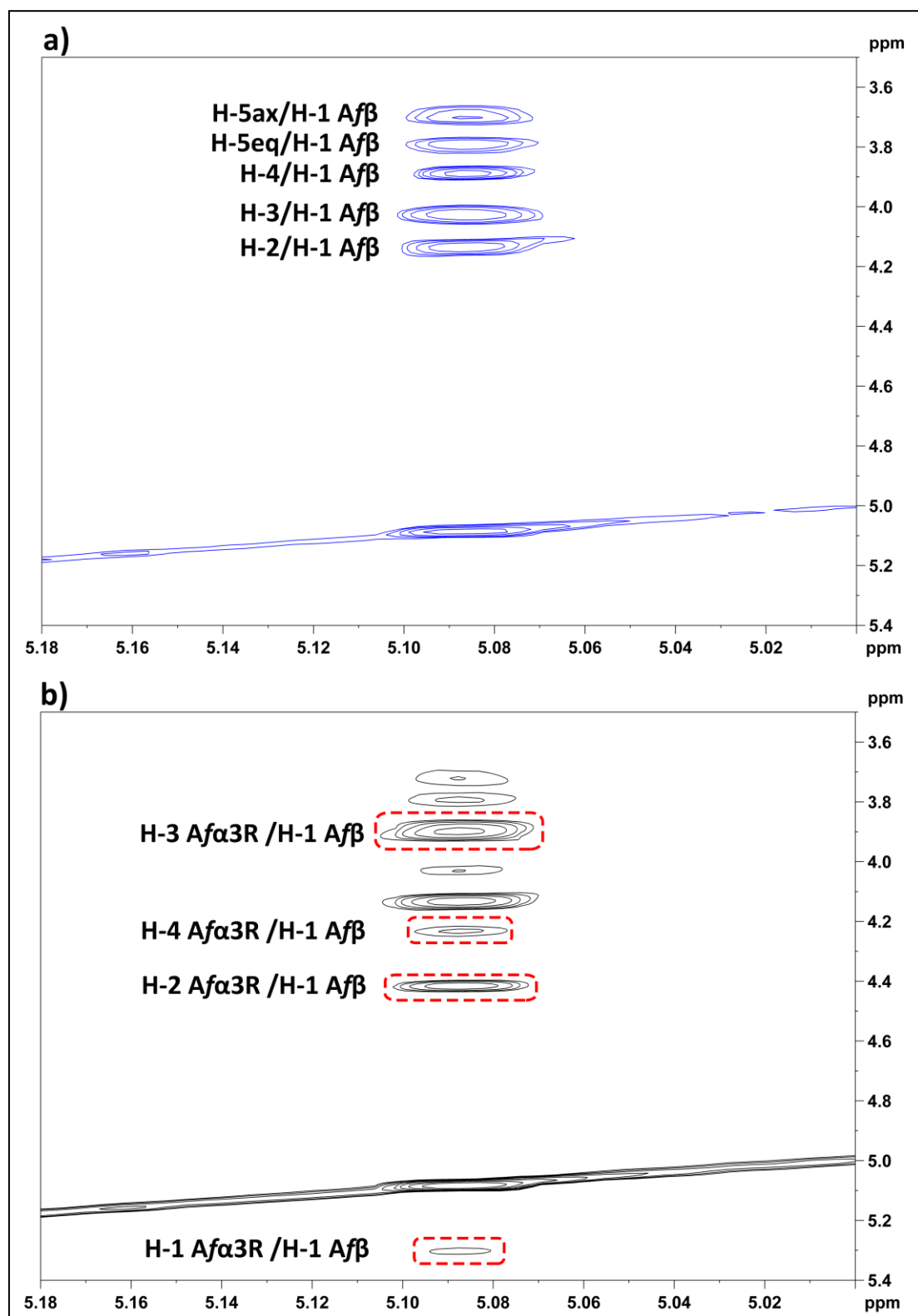
**Figura 2.35.** Ampliaciones de los espectros de RMN HSQC de las fracciones a) GB y b) GBH. Las señales marcadas en rojo se corresponden con los C2-5/H2-5 de los residuos arabinofuranósicos  $Af\beta$ .

En las **Figuras 2.34** y **2.35** se muestran en la parte inferior b) ampliaciones de los espectros de RMN TOCSY de **GBHD** y HSQC del producto **GBH** respectivamente. En ambos casos se aprecia que las señales asignadas al residuo arabinofuranósico **Afβ** desaparecen en los productos que fueron sometidos a la hidrólisis suave.

Si se comparan los desplazamientos químicos de los residuos arabinofuranósicos asignados **Afα**, **Afα3R** y **Afβ** (**Tablas 2.18** y **2.19**) se observa que a excepción de los valores correspondientes a los carbonos y protones anoméricos y al asociado al C-3 de la unidad **Afα3R**, el resto de los átomos de esas unidades presentan desplazamientos químicos similares.

La conectividad de los distintos residuos de arabinofuranosas se estudió utilizando el experimento de RMN NOESY, el cual brinda información sobre la proximidad de dos protones en el espacio. En la **Figura 2.36** se muestran ampliaciones centradas en 5,08 del espectro TOCSY (**azul**) y NOESY (**negro**) del producto **GBD**. En el espectro NOESY se pueden observar numerosas señales de correlación entre el H-1 de la unidad de **Afβ** con un  $\delta$  de 5,08 y protones que presentan desplazamientos químicos de 5,29, 4,40, 4,23 y 3,91 ppm, que se corresponden al H-1, H-2, H-3 y H-4 de la unidad **Afα3R**. Estas correlaciones, en conjunto con los resultados obtenidos del estudio por metilación, sugieren que las unidades de  $\beta$ -L-arabinofuranosa están enlazadas a las unidades de  $\alpha$ -L-arabinosa en la posición C-3 formando disacáridos **Afβ-(1→3)-Afα3R**. Las señales de las correlaciones con los H-2 y H-3 lógicamente son más intensas ya que los átomos involucrados se encuentran más próximos en el espacio.

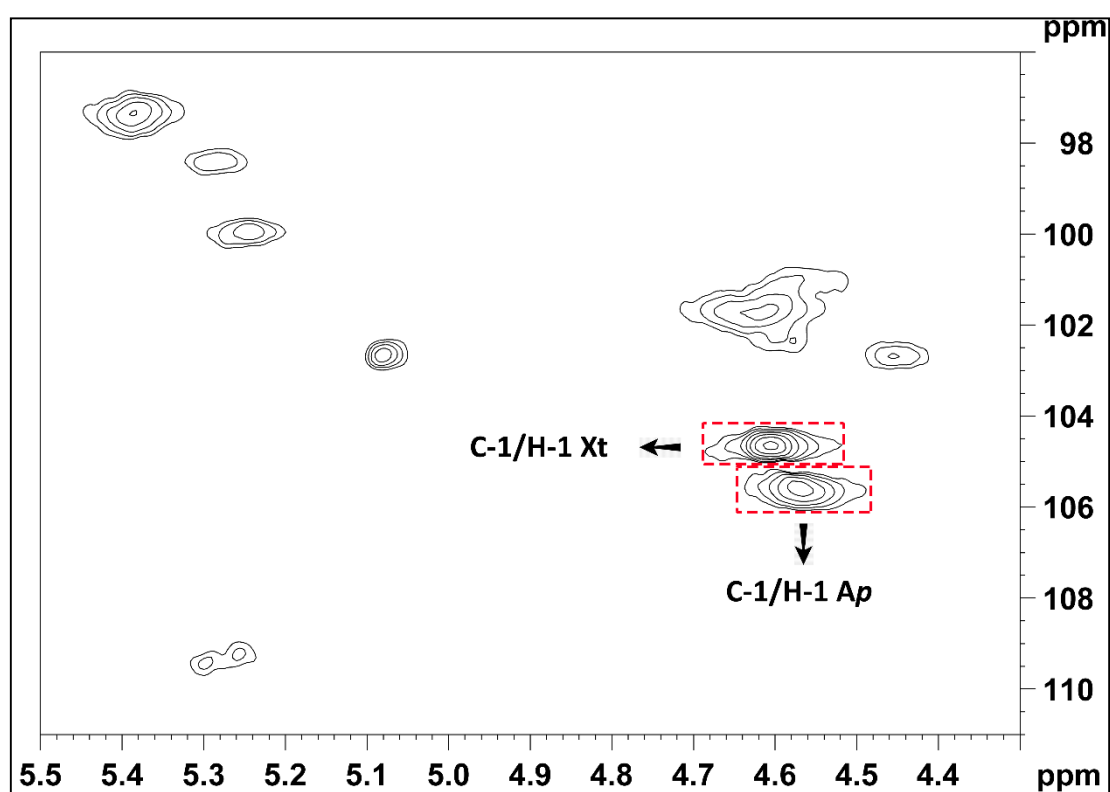
En este punto cabe destacar que la identificación de señales de correlación en los espectros de RMN NOESY entre unidades cuyos protones originan señales con valores muy similares de desplazamiento químico, como **Afα** y **Afα3R**, es muy difícil. En el espectro NOESY del producto **GBD** se puede observar una señal de correlación ancha entre el H-1 de la unidad **Afα3R** con desplazamiento químico de 5,29 ppm y un protón con  $\delta$  de 4,11 ppm. Esta señal podría pertenecer al H-4 y/o H-2 de la unidad **Afα**. Sin embargo, estos hidrógenos generan señales con valores de desplazamientos químicos muy similares al H-2 de la unidad **Afβ**, por lo que también podría pertenecer a dicha unidad. No obstante, no se pudieron encontrar otras señales de correlación entre protones de la unidad **Afα** con otros residuos. Esta información, en conjunto con el análisis por metilación sugiere que la unidad **Afα** se encuentra como unidad terminal de un disacárido **Afα-(1→3)-Afα3R**.



**Figura 2.36.** Comparación de espectros TOCSY (azul) y NOESY (negro) del producto **GBD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con correlaciones entre el H-1 de la unidad **Afβ** y distintos protones de la unidad **Afα3R**.

### 2.2.4.3 Asignación de señales de RMN de unidades de xilopiranososa y arabinopiranososa terminales

En la **Figura 2.37** se muestra una ampliación de la zona anomérica del espectro de RMN HSQC del producto desacetilado **GBD** donde se marcan dos señales con desplazamiento químico de 105,6/4,57 ppm y 104,7/4,61 ppm. Estas señales anoméricas se encontraron en la fracción original **GB** (ver **Figura 2.15**) y en todos los productos obtenidos a partir de la misma a excepción del producto obtenido por el tratamiento de Smith **GBS**.



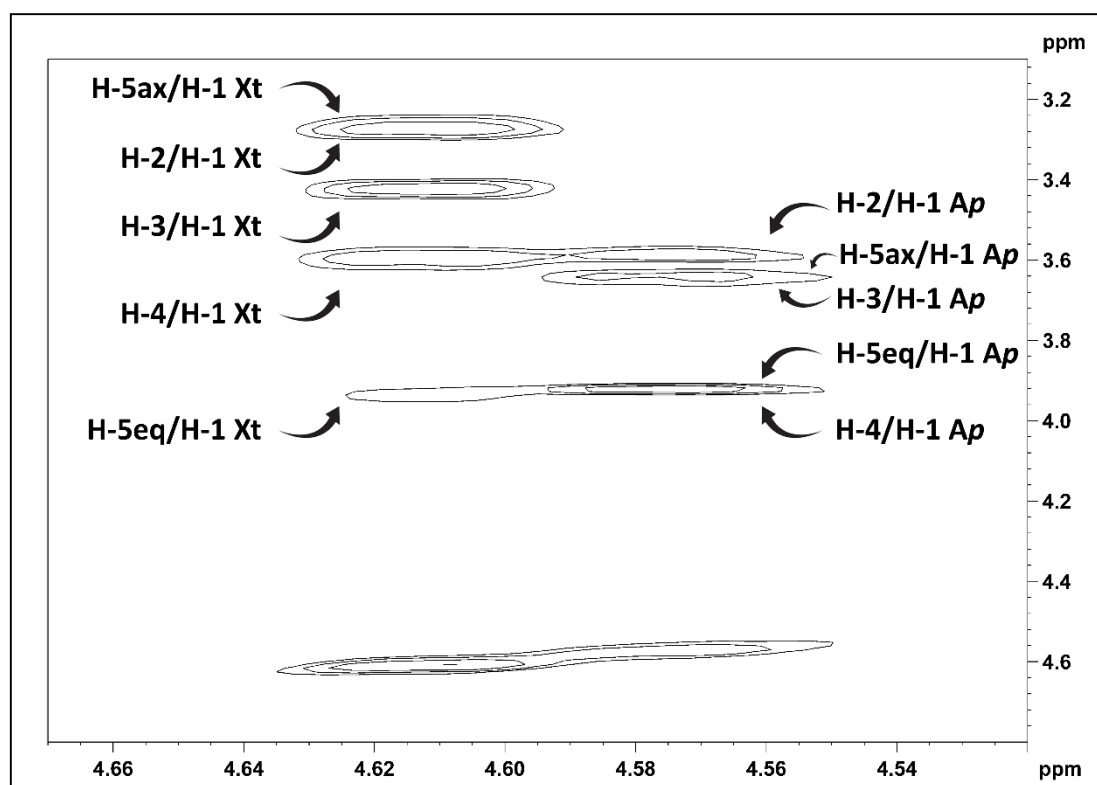
**Figura 2.37.** Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC del producto desacetilado **GBD**. Las señales marcadas en rojo se corresponden con las correlaciones C-1/H-1 de los residuos de xilopiranososa y arabinopiranososa terminales (**Xt** y **Ap**).

Por el análisis de los espectros HSQC y TOCSY, en conjuntos con los antecedentes publicados y el análisis por metilación, dichas señales anoméricas con  $\delta$  de 104,7/4,61 ppm y 105,6/4,57 ppm fueron asignadas a unidades terminales de  $\beta$ -D-xilopiranososa<sup>100,110,111</sup> y  $\alpha$ -L-arabinopiranososa<sup>64,112</sup> respectivamente (**Figura 2.82**, unidades **Xt** y **Ap**).

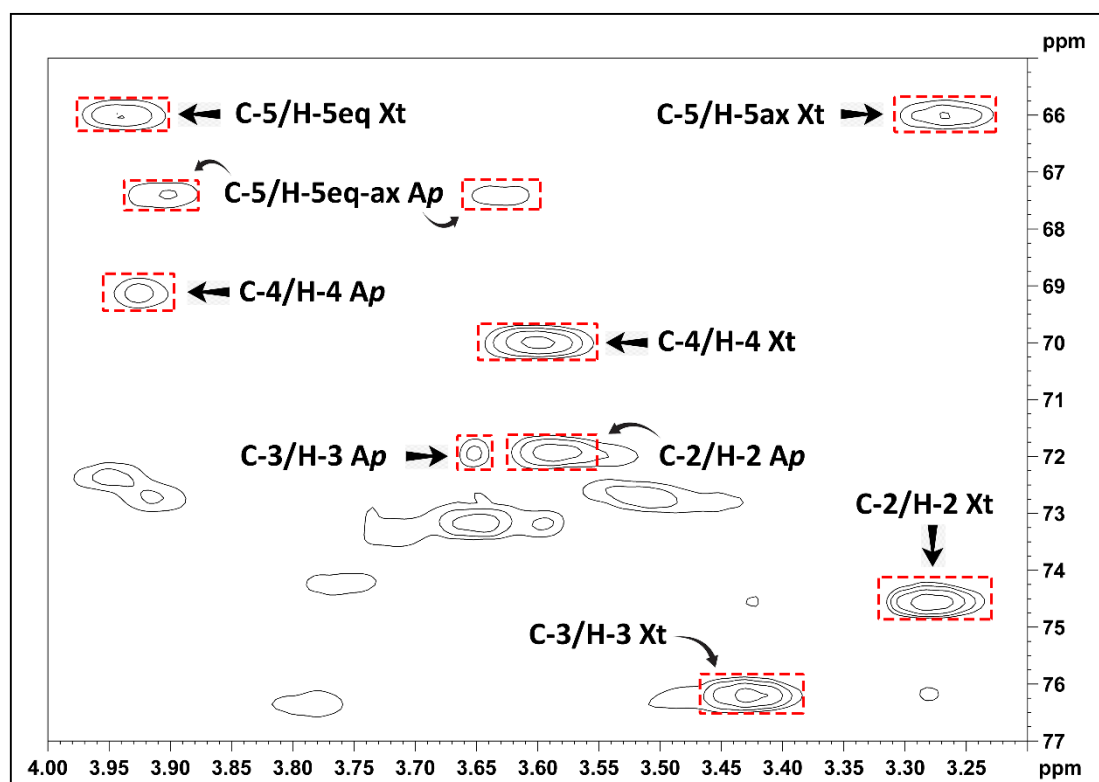


La asignación completa de las señales originadas en las unidades **Xt** y **Ap** se realizó analizando los espectros TOCSY (**Figura 2.38**) y HSQC (**Figura 2.39**) de la fracción **GBD**. En la **Figura 2.38** se muestran todas las señales de correlación entre los protones anoméricos de los residuos **Xt** y **Ap** y el resto de los protones de dichas unidades. Se puede apreciar que el H-1 de la unidad de  $\alpha$ -L-arabinopiranososa terminal (**Ap**) acopla con únicamente tres señales. Sin embargo, al continuar el análisis se determinó con el empleo del espectros HSQC y en coincidencia con los antecedentes encontrados en bibliografía<sup>64,112</sup>, que existen dos pares de señales cuyos valores de desplazamiento químico son coincidentes (H-3 y H-5ax; H-4 y H-5eq).

En la **Tabla 2.20** se muestra la asignación completa de las señales de estas unidades. Es importante destacar que todas las señales informadas se encuentran en los correspondientes espectros de la fracción original **GB**. Sin embargo, como puede apreciarse en la zona anomérica del espectro HSQC de esta fracción (ver **Figura 2.15**), las señales correspondientes a estas unidades terminales se encuentran duplicadas. Este efecto de duplicación será abordado posteriormente y está relacionado con los grupos acetilos presentes en otras unidades cercanas.



**Figura 2.38.** Ampliación del espectro TOCSY del producto desacetilado **GBD** donde se muestran las correlaciones entre los H-1 de las unidades **Xt** y **Ap** y el resto de los protones de los residuos.



**Figura 2.39.** Ampliación del espectro HSQC del producto **GBD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con los C2-5/H2-5 de los residuos de xilopiranososa y arabinopiranososa terminales (**Xt** y **Ap**).

**Tabla 2.20.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales correspondientes a las unidades terminales de  $\beta$ -D-xilopiranososa y  $\alpha$ -L-arabinopiranososa (**Xt** y **Ap**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
$\beta$ -D-Xilp-(1→) ( <b>Xt</b> )	104,7	74,6	76,2	70,0	66
$\alpha$ -L-Arap-(1→) ( <b>Ap</b> )	4,61	3,28	3,43	3,60	3,94; 3,27
	105,6	71,9	72,0	69,1	67,4
	4,57	3,58	3,65	3,92	3,90; 3,64

Posteriormente en el presente trabajo se mostrarán los resultados obtenidos por el análisis de RMN que permitieron determinar sobre que unidades se encuentran unidos estos residuos terminales.

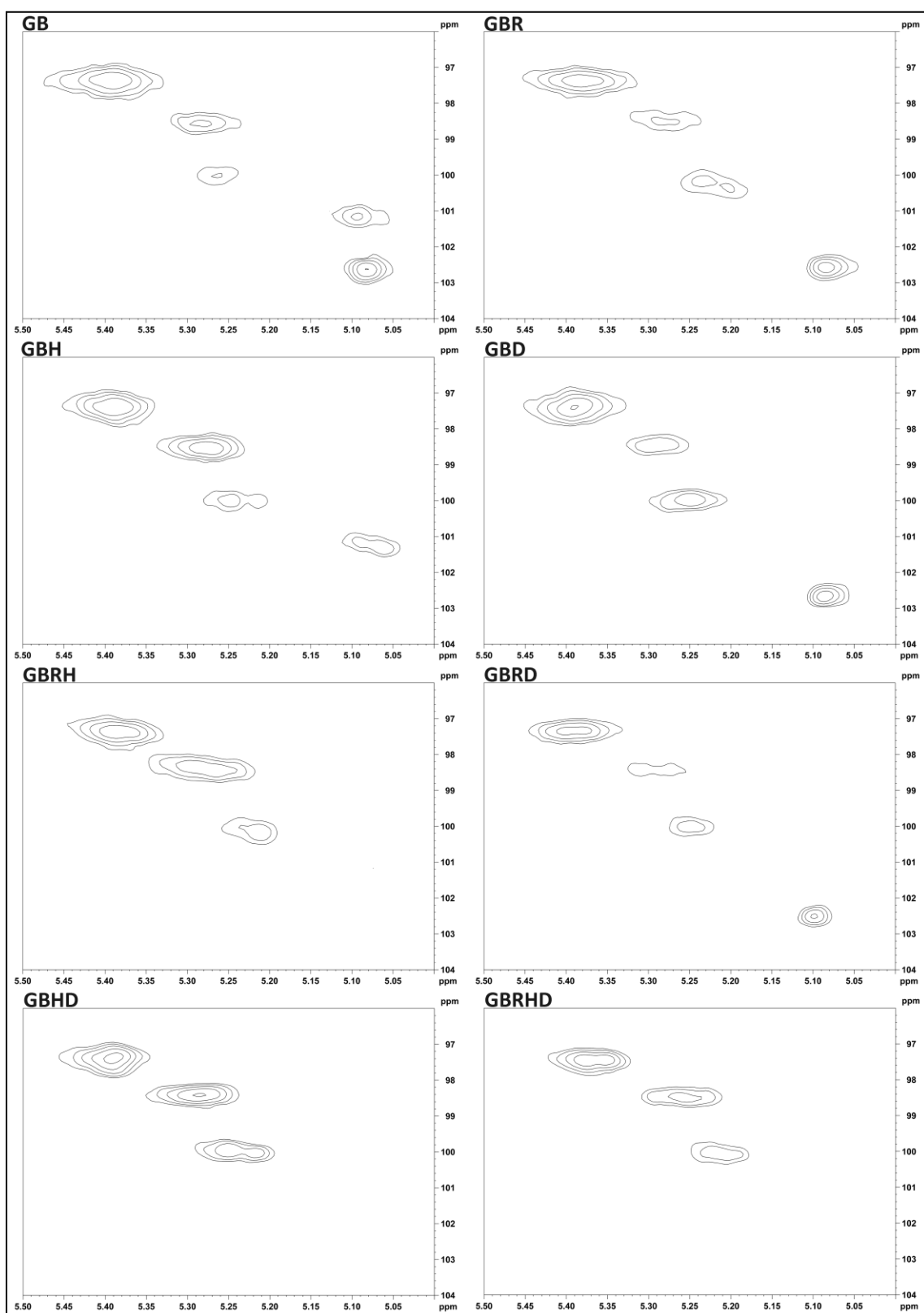
#### 2.2.4.4 Asignación de señales de RMN del ácido $\alpha$ -D-glucurónico y del ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales enlazados en posición C-2

En la **Figura 2.40** se muestran ampliaciones de los espectros HSQC de la fracción **GB** y todos los productos obtenidos a partir de la misma (a excepción de **GBS**) en la zona de  $\delta$  de 96-104/5,0-5,5 ppm. Como se mencionó en la **sección 2.2.3**, en esta zona de desplazamientos químicos se encuentran las señales anoméricas provenientes de unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico en distintos entornos químicos.

Teniendo en cuenta que la señal anomérica con  $\delta$  de 102,6/5,08 ppm se corresponde a la unidad **Af $\beta$**  descrita en la **sección 2.2.4.2**, en el espectro de la fracción **GB** de la **Figura 2.40** se pueden observar 4 señales que fueron asignadas a unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico. Una de ellas, con desplazamiento químico de 101,3/5,09 ppm, desaparece luego del proceso de desacetilación de los polisacáridos de goma brea, y como se analizará posteriormente en detalle, está asociada a la presencia de grupos acetilo en las cercanías.

Como se puede apreciar en todos los espectros de la **Figura 2.40**, las 3 señales con desplazamientos químicos de 97,4/5,38-5,40 ppm, 98,5/5,28-2,29 ppm y 100,0/5,24 ppm no se ven afectadas en los espectros correspondientes a los productos reducidos, hidrolizados y/o desacetilados. Además, el desplazamiento químico observado de los carbonos y protones anoméricos de los ácidos urónicos en los espectros HSQC depende casi exclusivamente de su entorno, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre el ácido glucurónico y el ácido 4-O-metilglucurónico. Ante esta dificultad de poder diferenciar estos residuos, otros experimentos de RMN resultaron fundamentales para el análisis estructural, especialmente los espectros de correlación H-H TOCSY.

La presencia de unidades de ácido glucurónico o su derivado 4-O-metilado es común de encontrar en xilanos aislados de diversas fuentes<sup>65,101,113-117</sup>. Esto ayudó a identificar las señales anoméricas con desplazamiento químico 98,5/5,28 ppm y 98,5/5,29 ppm que se encuentran en todos los espectros HSQC mostrados en la **Figura 2.40**, las cuales se corresponden a los C-1 y H-1 de unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazadas a la posición C-2 de unidades de xilosa que conforman la cadena principal (unidades **AG** y **AG4M** respectivamente, ver **Figura 2.82**).



**Figura 2.40.** Ampliación de la zona anomérica de los espectros HSQC de la fracción **GB** y sus productos modificados.

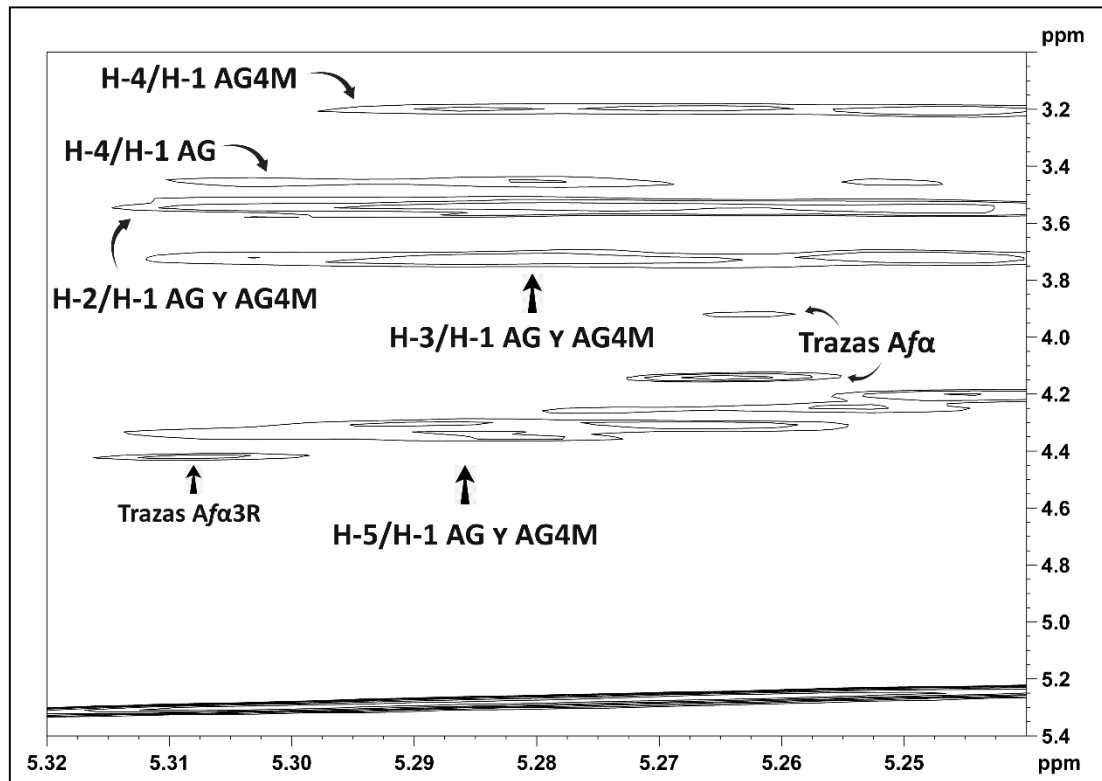
La asignación completa de las unidades **AG** y **AG4M** se pudo realizar empleando distintos espectros TOCSY, en particular el correspondiente al producto **GBHD** que presenta la ventaja de una menor superposición de señales en la zona anomérica debido a la ausencia de las unidades de arabinofuranosa y los grupos acetilo, facilitando la identificación de las señales de correlación. Se destaca nuevamente que estas modificaciones químicas no afectan los desplazamientos químicos de las señales analizadas pero disminuyen la gran superposición existente en los espectros de **GB**.

En la ampliación del espectro TOCSY de la **Figura 2.41** se puede apreciar que el desplazamiento químico de la mayoría de las señales originadas por los distintos hidrógenos de las unidades terminales de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico son prácticamente iguales, lo cual dificultó su asignación. No obstante, la presencia del grupo metilo en la posición O-4 produce un corrimiento de la señal del protón a campos más altos, y al mismo tiempo se produce el efecto inverso en la señal del carbono correspondiente. Este corrimiento del H-4 perteneciente al ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico fue lo que permitió que ambos residuos (**AG** y **AG4M**) pudieran ser identificados.

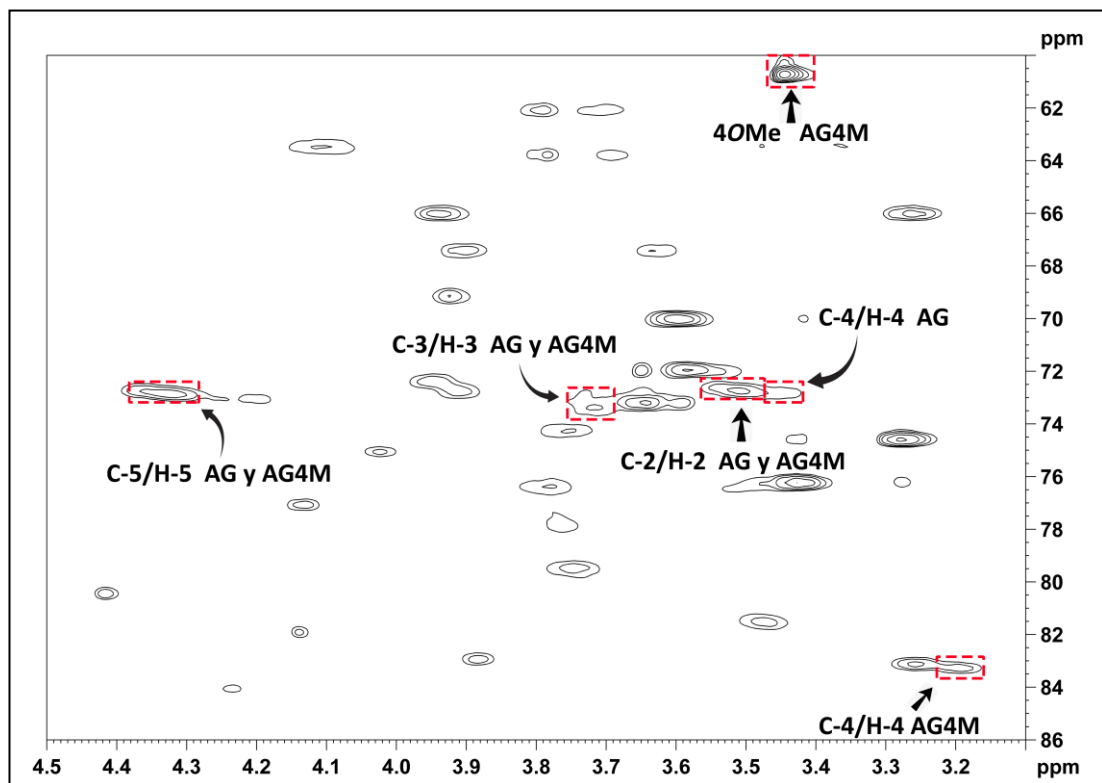
Con la información obtenida de los espectros TOCSY se pudieron identificar y asignar el resto de las señales en el espectro HSQC de **GBD (Figura 2.42)**, donde se muestran todas las señales originadas en los C2-5/H2-5 de las unidades **AG** y **AG4M**. La señal correspondiente al carbono y los protones del grupo metilo en posición O-4 de la unidad **AG4M** fue asignada en concordancia con los antecedentes bibliográficos<sup>65,101,113,115</sup>. La asignación completa de los residuos **AG** y **AG4M** se encuentra en la **Tabla 2.21**.

**Tabla 2.21.** Desplazamiento químico (ppm) de las señales correspondientes a las unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico unidas en posición C-2 a unidades de xilosa de la cadena principal (unidades **AG** y **AG4M** respectivamente).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	4-O-Me
$\alpha$ -D-GlcpA-(1→) ( <b>AG</b> )	98,5	72,7	73,4	72,8	72,8	
	5,29	3,54	3,72	3,45	4,34	
4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→) ( <b>AG4M</b> )	98,5	72,7	73,0	83,2	72,8	60,8
	5,28	3,55	3,73	3,19	4,32	3,45

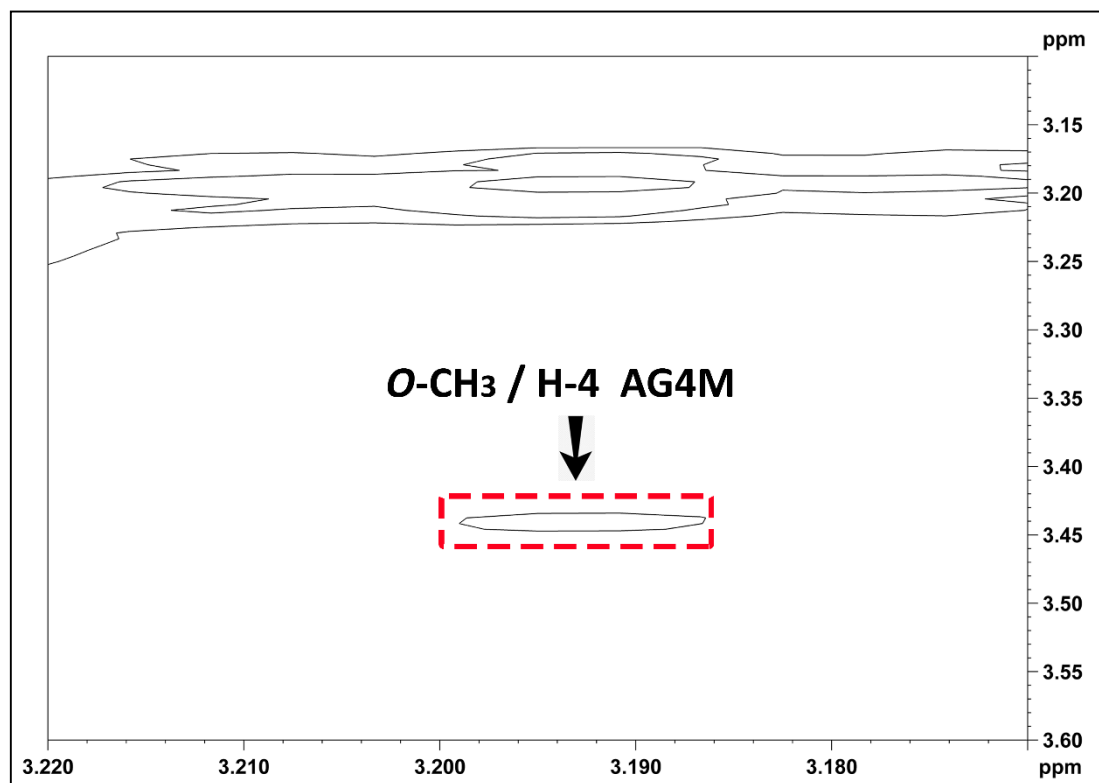


**Figura 2.41.** Ampliación de la zona anomérica del espectro TOCSY del producto **GBHD** donde se muestran las correlaciones entre el H-1 y el resto de los protones de las unidades **AG** y **AG4M**.



**Figura 2.42.** Ampliación del espectro HSQC del producto **GBD**. Señales marcadas en **rojo** son originadas por las unidades de ácidos glucurónicos terminales **AG** y **AG4M**.

Analizando el espectro NOESY de la fracción **GBHD** se encontró una correlación a 3,19 y 3,45 ppm originada en la cercanía entre el H-4 de la unidad **AG4M** y los protones del grupo metilo (ver **Figura 2.43**), lo que confirma las asignaciones realizadas.



**Figura 2.43.** Ampliación del espectro NOESY del producto **GBHD**. La señal marcada en rojo se corresponde con el acoplamiento entre H-4 de la unidad **AG4M** y los protones del grupo metilo.

#### 2.2.4.5 Asignación de señales de RMN del ácido $\alpha$ -D-glucurónico y del ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico con un sustituyente en posición C-2

En la **Figura 2.40** puede observarse una señal muy intensa con desplazamiento químico de 97,4/5,40-5,38 ppm que se encuentra en todos los espectros HSQC mostrados y que como se verá luego, surge del solapamiento de dos señales originadas en la presencia de distintas unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-Me- $\alpha$ -D-glucurónico. Estas señales presentan un desplazamiento químico inusual, no encontrándose en la mayoría de los glucuronoxilanos.

La presencia de dos señales superpuestas en los espectros HSQC en torno a los 97,4 y 5,40-5,38 ppm fue descubierta indirectamente por el análisis de espectros TOCSY. En la **Figura**

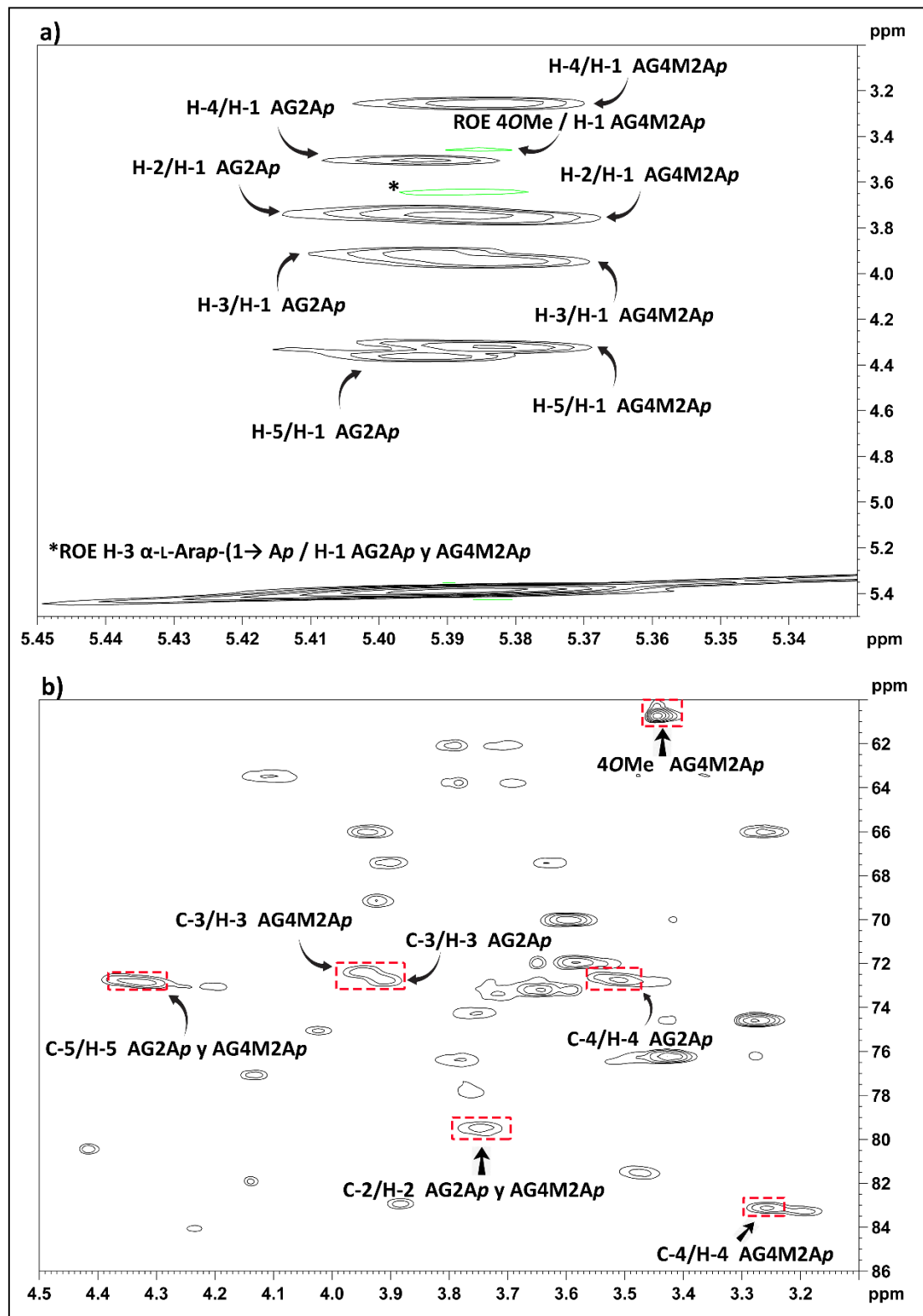
**2.44 a)** se puede observar una ampliación del espectro TOCSY del producto desacetilado **GBD** donde se asignaron todas las correlaciones entre los hidrogenos de cada una de las dos unidades identificadas. Esto fue posible nuevamente por la diferencia que se puede apreciar en los desplazamientos químicos de los H-4 de cada una de las unidades. Al igual que con las unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales **AG** y **AG4M** estudiadas en la sección anterior, la señal originada en el H-4 de una unidad que presenta un grupo metilo en la posición O-4 se encuentra desplazada hacia campos más altos, lo que permite diferenciar qué unidad se encuentra O-metilada (3,51 ppm vs. 3,26 ppm).

En conjunto con esta asignación, se debe tener en cuenta que en el análisis por metilación, se determinó que alrededor de 66% de las unidades de ácidos urónicos presentes en los polisacáridos de la goma brea se encontraban sustituidas en la posición 2. Basados en este análisis y en el análisis del espectro HSQC de **GBD** (**Figura 2.44 b**)), junto con antecedentes bibliográficos<sup>55,64,106,117</sup>, se asignaron las dos señales a 97,4/5,40 ppm y 97,4/5,38 ppm a los C-1/H-1 de unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico con un sustituyente en la posición C-2 (**AG2Ap** y **AG4M2Ap**, ver **Figura 2.82**). Como se verá posteriormente en detalle, las unidades fueron nombradas como **AG2Ap** y **AG4M2Ap** ya que tanto en el análisis por metilación como en los resultados que se mostrarán luego sobre el análisis por RMN, el sustituyente principal de estas unidades eran residuos de arabinosa piranósica terminales.

La asignación completa de todas las señales pertenecientes a estas unidades se muestra en la **Tabla 2.22**. Se aprecia claramente que excepto las señales correspondientes a la correlación C-4/H-4, el resto de las señales asignadas a las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap** son muy similares.

Como se verá posteriormente, dichas señales se encuentran presentes también en el espectro HSQC de **GB**, aunque en dicho espectro se originan de la superposición de cuatro señales debido a la presencia de los grupos acetilo que desdoblan a las señales presentes en **GBD**.





**Figura 2.44.**a) Ampliación del espectro TOCSY del producto **GBD** donde se muestra las señales de correlación entre los H-1 y el resto de los protones de los residuos. Las señales de color **verde** se corresponden a correlaciones vía ROE. b) Ampliación espectro HSQC del mismo producto. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden a las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap**.

**Tabla 2.22.** Desplazamiento químico (ppm) de las señales correspondientes a las unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico sustituidas en posición C-2 (**AG2Ap** y **AG4M2Ap**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	4OMe
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	
→2)- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→ <b>(AG2Ap)</b>	97,4	79,4	72,7	72,7	72,7	
	5,40	3,73	3,92	3,51	4,36	
→2)- $\alpha$ -D-4-O-Me-GlcpA-(1→ <b>(AG4M2Ap)</b>	97,4	79,4	72,3	83,1	72,8	60,8
	5,38	3,75	3,95	3,26	4,32	3,45

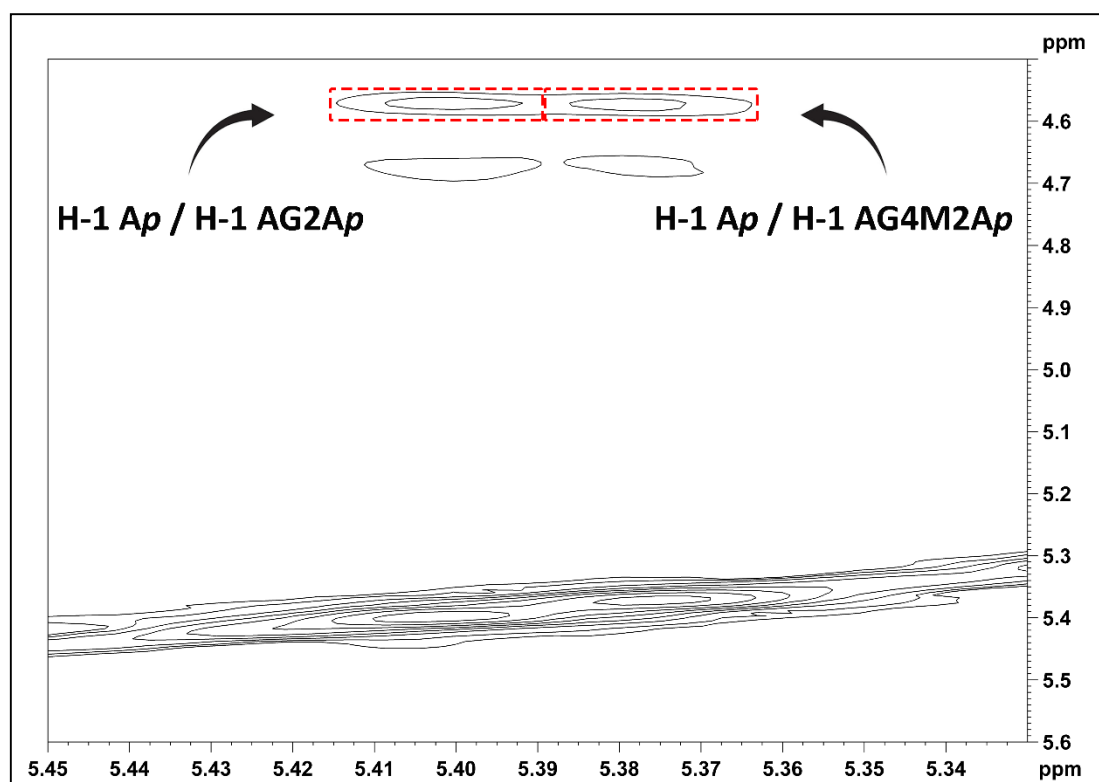
La sustitución en posición C-2 de los ácidos urónicos fue confirmada al comparar los desplazamientos químicos de estas unidades con las unidades terminales descritas en la sección anterior. Se observó que las mayores diferencias se encuentran lógicamente en el par C-2/H-2 (79,4/3,73-3,75 ppm unidades **AG2Ap/AG4M2Ap** vs 72,7/3,54-3,55 ppm unidades **AG/AG4M**) y en el desplazamiento químico del H-3 (3,92-3,95 ppm vs. 3,72-3,73 ppm, mismos pares de unidades). La presencia del sustituyente en posición C-2 afecta los desplazamientos de C-1/H-1, C-2/H-2 y C-3/H-3, pero no influye apreciablemente en el  $\delta$  de los átomos más alejados como C-4/H-4 y C-5/H-5, ni el desplazamiento del grupo metilo.

En el espectro presentado en la **Figura 2.44 a)** se pueden apreciar dos señales de correlación con la fase negativa que se muestran en color verde, con valores de desplazamiento químico de 3,45 ppm/5,38 ppm y 3,65 ppm/5,38-5,40 ppm. Estos acoplamientos se produjeron vía ROE (Rotating-frame Overhauser Effect), el cual es un efecto espacial por cercanía similar al NOE. La secuencia de pulsos de un espectro ROESY, diseñado para observar ese tipo de correlaciones, y la de un experimento TOCSY son similares. Por ese motivo, es común que en los espectros TOCSY aparezcan señales de correlación propias de un experimento ROESY y viceversa, pero con la fase opuesta. En los experimentos TOCSY realizados a los distintos productos de la goma brea se pudieron observar algunas señales de este tipo, las cuales resultaron muchas veces de gran utilidad ya que no necesariamente las mismas se observaron en los espectros NOESY. Al igual que las señales que se obtienen por efecto NOE, estas señales de correlación indican que dos protones se encuentran cercanos en el espacio.

En particular, la señal con desplazamiento químico de 3,45 ppm/5,38 ppm fue asignada a la correlación entre los hidrógenos del grupo metilo enlazado al O-4 y el H-1 del ácido 4-O-

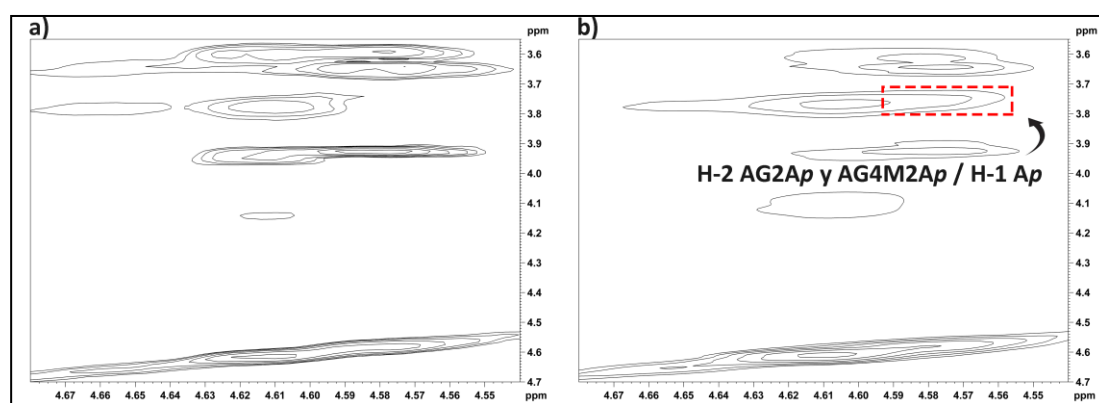
metil- $\alpha$ -D-glucurónico (unidad **AG4M2Ap**). Es importante destacar que dicha correlación se observa únicamente con el protón a 5,38 ppm, lo cual confirma que el mismo se corresponde al residuo de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico metilado en posición O-4.

La segunda señal de correlación vía ROE de 3,65 ppm/5,38-5,40 ppm se encuentra también en el espectro NOESY del mismo producto. Esta señal correlaciona con ambos protones anoméricos correspondientes a las unidades **AG2Ap** y **AG4M2A**, y con el H-3 del sustituyente que se encuentra en la posición C-2 de estas unidades, la unidad de  $\alpha$ -L-arabinopiranos terminal **Ap**. Además de la señal de correlación vía ROE encontrada en el espectro TOCSY mostrado, en el espectro de RMN NOESY del producto **GBHD** se pueden observar otras señales de correlación entre protones pertenecientes a las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap** y a la unidad de arabinosa piranósica terminal **Ap**. En la **Figura 2.45** se muestra una ampliación de dicho espectro NOESY donde se aprecian dos señales de correlación con  $\delta$  de 5,40/4,57 ppm y 5,38/4,57 ppm entre los H-1 de las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap** y de la unidad **Ap** respectivamente.



**Figura 2.45.** Ampliación del espectro NOESY de la fracción **GBHD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con las correlaciones H-1/H-1 de los residuos de **Ap** y **AG2Ap/AG4M2Ap**.

Además de las correlaciones descritas, en la **Figura 2.46 b)** se muestra una señal de correlación en el mismo espectro NOESY correspondiente al H-1 de la unidad **Ap** y el H-2 de las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap** con desplazamiento químico 3,75 ppm/4,57 ppm. En el espectro a) de la misma figura, correspondiente a un experimento TOCSY del mismo producto **GBHD** se observa que dicha señal de correlación no está presente. Cabe destacar que todas las señales mencionadas se encontraron en el espectro de NOESY de la fracción **GB** aunque con un alto grado de superposición con otras señales. Por este motivo la obtención de derivados más sencillos pero que conservan las características estructurales de los polisacáridos de la goma brea fue indispensable para poder hacer un análisis estructural completo.



**Figura 2.46.** Ampliaciones de los espectros de RMN del producto **GBHD** a) TOCSY y b) NOESY. En el espectro NOESY b) se encuentra marcada en **rojo** la señal de correlación entre el H-1 de la unidad **Ap** y el H-2 de las unidades **AGAp** y **AG4MAp**.

En el análisis realizado por metilación del producto **GBR** (ver **Tabla 2.8, sección 2.1.6**) se determinó que la cantidad de unidades terminales de arabinosa piranósica (derivado 2,3,4-tri-O-metilarabinosa) coincide con el de las unidades de glucosa sustituidas en posición C-2 (3,4,6-tri-O-metilglucosa). Toda esta información, en conjunto con reportes previos provenientes de otras fuentes vegetales<sup>64,106</sup>, indica que las unidades de arabinosa piranósica terminal **Ap** se encuentran enlazadas a residuos de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico en posición C-2 (unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap**) formando pequeñas ramificaciones de la cadena central de xilosas. Cabe señalar aquí que no se encontraron evidencias espectroscópicas de que las unidades de xilosa piranósicas terminales **Xt** se encuentren enlazadas a los ácidos urónicos.

#### 2.2.4.6 Asignación de señales de RMN de las unidades de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales enlazadas en posición C-3

En la zona anomérica de los espectros HSQC de la fracción **GB** y los distintos productos obtenidos a partir de la misma (**Figura 2.40**) puede observarse una tercera señal con desplazamiento químico de 100,0/5,24 ppm. Teniendo en cuenta que por el análisis realizado en la sección 2.1, los únicos monosacáridos presentes en los polisacáridos de goma brea son la D-xilosa, L-arabinosa, D-ácido glucurónico y ácido 4-O-metil-D-glucurónico, en principio esta señal resultó atípica ya que dicho valor de  $\delta$  no es común para señales originadas por estos residuos.

En bibliografía no se han encontrado antecedentes de señales de unidades de D-xilosa ni de L-arabinosa piranósicas con desplazamientos químicos similares a la mencionada señal. Luego de un análisis detallado, se consideró la posibilidad de que esta señal se originara en un residuo de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico, aunque los valores de desplazamiento químico de dicha señal anomérica eran diferentes a los otros encontrados en este trabajo de Tesis y a los informados comúnmente en bibliografía para arabinoglucuronoxilanos. En comparación con los valores encontrados para unidades de los ácidos  $\alpha$ -D-glucurónicos terminales enlazadas en posición C-2, el desplazamiento químico del átomo de carbono es mayor (100 ppm vs. 98,5 ppm), mientras que el valor correspondiente al protón es menor (5,24 ppm vs. 5,28-5,29 ppm).

A partir de unos pocos antecedentes bibliográficos<sup>104,118,119</sup> y un análisis detallado de los espectros de RMN, se determinó la posibilidad de que dicha señal anomérica se originara en unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico unidas en la posición C-3 de las unidades de xilosa que conforman la cadena principal. Jaseja *et al.*<sup>118</sup> pudieron aislar un ácido aldobiurónico del tipo 3-O-(ácido  $\alpha$ -D-glucopiranosil)- $\beta$ -L-galactopiranososa e informaron los desplazamientos químicos encontrados. Los valores reportados se pueden observar en la **Tabla 2.23**.

**Tabla 2.23.** Desplazamientos químicos (ppm) informados por Jaseja *et al.*<sup>118</sup> y Yin. *et al.*<sup>119</sup> para las señales originadas por unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico unidas en C-3.

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
$\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -L-Galp <sup>118</sup>	101,29	72,49	73,65	72,81	73,40
	5,24	3,63	3,79	3,47	4,06
$\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) <sup>119</sup>	98,88	71,02	72,05	76,98	71,60
	5,06	3,61	3,76	3,97	4,21

En la **Tabla 2.23** se aprecia que el desplazamiento químico del C-1 se corre hacia campos más bajos respecto de una unidad de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico enlazada en posición C-2 (101,29 ppm vs. 98,5 ppm). Además se observa el efecto inverso para los H-1 y H-5 (5,24 ppm vs. 5,28-5,29 ppm H-1; 4,06 ppm vs. 4,32-4,34 ppm H-5), obteniéndose un desplazamiento químico del protón anomérico muy similar al hallado en los espectros HSQC de la goma brea.

Yin *et al.*<sup>119</sup>. describieron la presencia de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico enlazado en la posición C-3 de xilosa piranósica o arabinosa furanósica en arabinoxilanos provenientes de semillas de *Plantago asiática L.* Si bien en este caso se encuentra una diferencia mayor entre los desplazamientos químicos informados y los encontrados en los espectros HSQC, también se observa un corrimiento de los desplazamientos químicos del H-1 y H-5 a campos más altos respecto de las unidades enlazadas en posición C-2 de la xilosa.

Por otro lado, como se detalló en la **sección 2.1.6**, se desprende del análisis por metilación de **GB** y el producto **GBR** la presencia de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-3 (2-*O*-metilxilosa, ver **Tabla 2.8**). Como se analizó previamente, comparando la disminución de todas las unidades metiladas de arabinosa y xilosa se observó que tanto la 2-*O*-metilxilosa como la 3-*O*-metilxilosa disminuían entre la fracción **GB** y el producto **GBR** en una proporción mucho menor al resto de las unidades, sugiriendo que los residuos de ácidos urónicos se encontraban enlazados en las posiciones C-2 y C-3 de unidades de xilosa que conforman la cadena central (ver **sección 2.1.6**).

Con toda esta información, los antecedentes bibliográficos encontrados<sup>104,118,119</sup>, y el análisis de los espectros de RMN HSQC y TOCSY del producto **GBD**, la señal con desplazamiento químico de 100,0/5,24 ppm fue asignada a la correlación C-1/H-1 de un residuo de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazado en posición C-3 de las unidades de xilosa

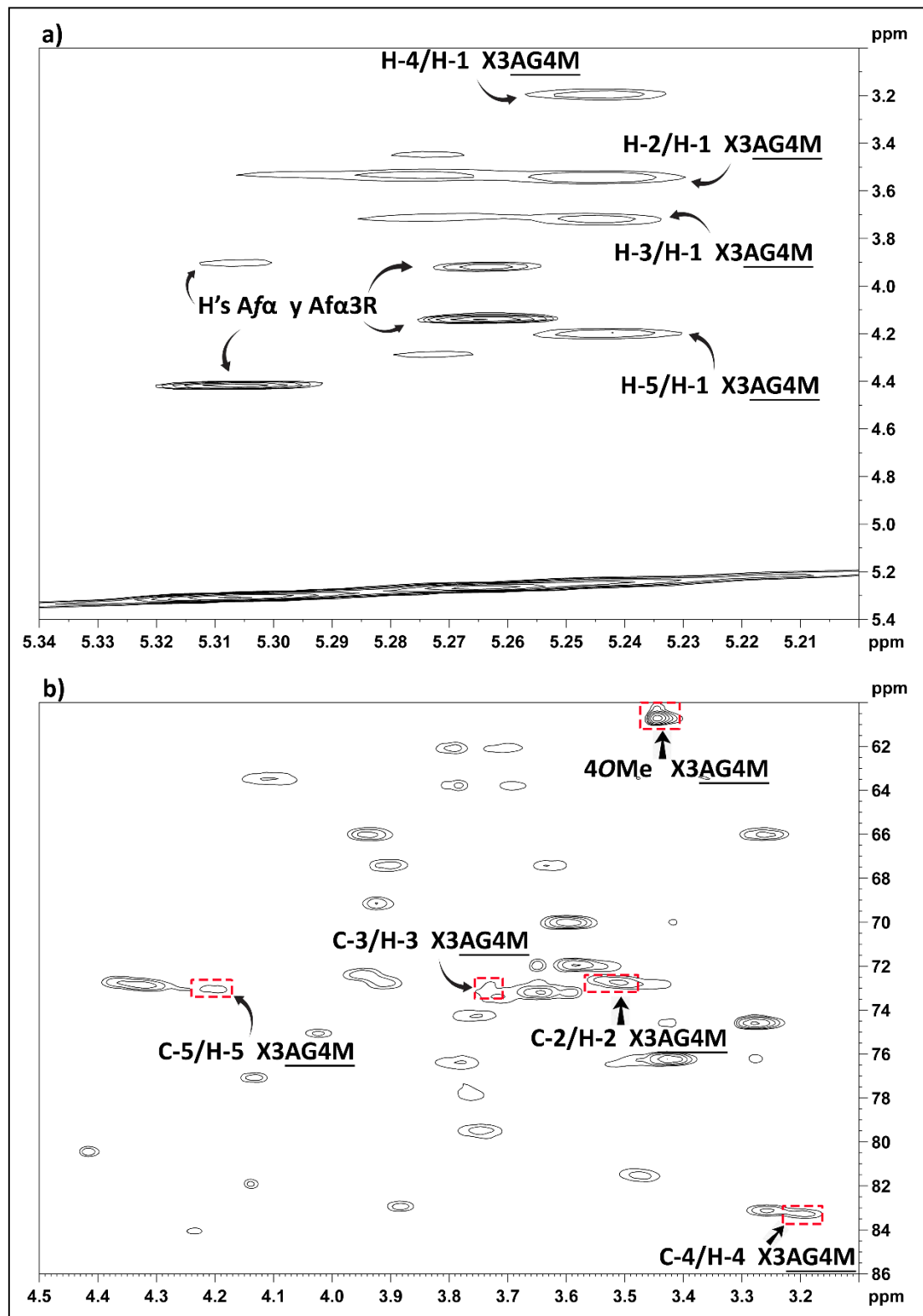
de la cadena principal (ver **Figura 2.83**, unidad **X3AG4M**). La asignación completa de todos los átomos del residuo **X3AG4M** no fue sencilla. En primer lugar, luego de un análisis exhaustivo de distintos espectros TOCSY se pudieron identificar todos los protones de la unidad **X3AG4M**, para luego identificar las señales de los carbonos correspondientes.

En la **Figura 2.47** se puede apreciar en a) una ampliación del espectro de RMN TOCSY del producto **GBD** donde se muestran las correlaciones del protón anomérico con el resto de los hidrógenos del de la unidad. En la imagen b) se muestra una ampliación del espectro de HSQC de **GBD** donde se pueden ver todas las señales originadas en los C2-5/H2-5 de la unidad **X3AG4M**. La asignación completa se muestra en la **Tabla 2.24**.

Cabe señalar que en ningún espectro TOCSY analizado se encontraron señales de correlación entre el H-1 y otro protón compatibles con la presencia de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico unido en posición C-3. Solamente se pudo identificar un residuo de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico, producto de una señal de correlación entre el H-1 y un hidrógeno con desplazamiento químico de 3,19 ppm indicativa de la presencia del grupo metilo en posición O-4. Teniendo en cuenta que la proporción de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-3 es pequeña, es posible que exista un residuo de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico enlazado en dicha posición pero que se encuentre en tan baja proporción que no haya podido ser identificado en los espectros de RMN obtenidos.

**Tabla 2.24.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales correspondientes al ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazado en posición C-3 de las unidades de xilosa de la cadena principal (unidad **X3AG4M**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	4-O-Me
4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→ ( <b>X3AG4M</b> ))	100,0	72,7	73,0	83,2	73,1	60,8
	5,24	3,55	3,72	3,19	4,20	3,45



**Figura 2.47.** a) Ampliación del espectro TOCSY del producto **GBD** donde se marcan las señales de correlación entre los H-1 y el resto de los protones de la unidad **X3AG4M**. b) Ampliación del espectro HSQC del mismo producto. Las señales marcadas en rojo se corresponden a las correlaciones C2-5/H2-5 de la misma unidad.



Comparando el desplazamiento químico de los residuos de ácidos 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónicos enlazados en posición 2 y 3 de unidades de xilosas de cadena (**Tabla 2.21** y **Tabla 2.24**; **Figura 2.42** y **Figura 2.47**) se puede ver que las señales correspondientes a los C2-5/H2-5 de estas unidades son muy similares. En particular, la única señal que cambia apreciablemente es la correspondiente al H-5, en concordancia con lo informado en los antecedentes bibliográficos.

#### **2.2.4.7 Generación de oligosacáridos**

En paralelo al estudio y análisis de las señales observadas en los espectros de RMN HSQC y TOCSY de los polisacáridos de **GB** y de los distintos productos, se buscó generar pequeños oligosacáridos que facilitaran el análisis por métodos espectroscópicos. Del análisis de los mismos se planificaba obtener información adicional sobre la ubicación de los sustituyentes y posición de sustitución realizando análisis espectroscópicos y por alquilación. A continuación se muestran los resultados de los experimentos realizados para las depolimerizaciones.

##### **2.2.4.7.1 Tratamiento enzimático de los polisacáridos de goma brea**

En primera instancia se intentó realizar una degradación enzimática de los polisacáridos de la goma brea, para lo cual fueron utilizadas dos enzimas distintas con actividad de  $\beta$ -endoxilanasas. Con este procedimiento se buscaba romper las uniones de la cadena central de residuos de xilosa y obtener pequeños fragmentos que posteriormente serían separados por cromatografía de permeación de geles y/o de intercambio aniónico en caso de que los mismos poseyeran ácidos urónicos.

Se utilizaron dos enzimas con actividad de endo (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -xilanasas, en las condiciones recomendadas en la bibliografía consultada<sup>120,121</sup> (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.9.2**)

Al finalizar cada proceso enzimático, la solución resultante se centrifugó separándose el precipitado del sobrenadante. La eficacia del tratamiento enzimático se verificó de dos formas

distintas en cada fracción por separado. Sobre el sobrenadante se intentó verificar la liberación de monosacáridos de xilosa por cromatografía en placa delgada en sílica gel. El precipitado obtenido fue sometido a una hidrólisis y posterior derivatización para la obtención de alditos peracetilados para ser analizados por cromatografía gaseosa. En ninguna de las dos fracciones se encontró evidencia de que el tratamiento enzimático fuese exitoso ya que por un lado no se pudieron detectar cantidades apreciables de xilosa liberada en el sobrenadante y además el perfil de azúcares neutros obtenido luego del tratamiento enzimático y posterior diálisis no presentaba diferencias con el producto de partida **GB**.

Se realizó el mismo tratamiento enzimático a distintas fracciones obtenidas a partir de **GB** que presentan un menor grado de sustitución como **GBD** o **GBHD** pero al igual que para el producto de partida no se encontraron evidencias significativas de degradación de los polisacáridos. Estos resultados, si bien no fueron los esperados, eran consistentes con el hecho de que los polisacáridos de la goma brea son altamente ramificados y en consecuencia se dificulta fuertemente la actividad de las enzimas empleadas.

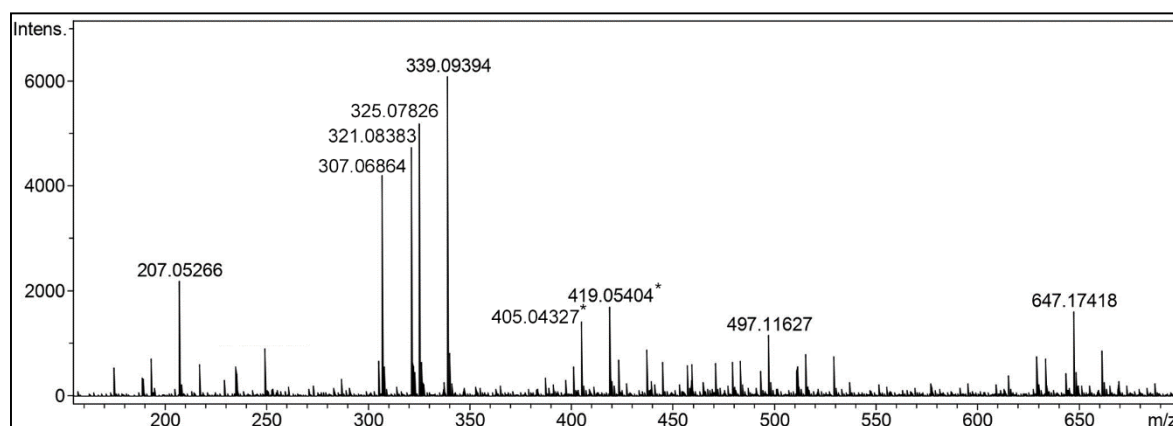
#### **2.2.4.7.2 Estudio de ácidos aldobiurónicos obtenidos por hidrólisis ácida**

Debido a la imposibilidad de obtener fragmentos pequeños por tratamiento enzimático, se decidió realizar un tratamiento de hidrólisis ácida, mediante el cual se hidrolizaran los enlaces glicosídicos de los azúcares neutros y no se afectarían mayoritariamente los correspondientes a los ácidos urónicos (ver **sección 2.1.4**). De esta manera se generaron disacáridos constituidos por ácidos urónicos y xilosa.

Para poder obtener los ácidos aldobiurónicos correspondientes se realizó una hidrólisis en condiciones similares<sup>122</sup> para la preparación de alditos empleando TFA 2M por 90 min a 120°C (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.9.1**). Luego de evaporar el TFA remanente, los productos se separaron en dos fracciones. La primer fracción fue purificada empleando una columna de intercambio aniónico fuerte (en forma  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) y eluida con HCl 1M. Luego se eliminó el HCl y se obtuvo el producto **GBA** (goma brea aldobiurónicos). La segunda fracción, que fue designada **GBAR** (goma brea aldobiurónicos reducidos) fue purificada con el mismo procedimiento pero previo al pasaje por columna de intercambio

aniónico la fracción fue tratada con  $\text{NaBH}_4$  para reducir las unidades terminales reductoras a alditoles. De esta manera se buscó obtener disacáridos de la forma ácido (4-*O*-metil)- $\alpha$ -D-glucurónico-(1 $\rightarrow$ 2/3)-xilitol evitando la división de las señales en los espectros de RMN que surgen de las distintas unidades con configuración  $\alpha$  y  $\beta$ .

El producto **GBA** fue analizado por espectrometría de masas por inyección directa empleando un analizador de tiempo de vuelo con una fuente de ionización de electrospray en modo negativo (ESI-QTOF). El espectro de masas obtenido se puede observar en la **Figura 2.48**, donde se muestran los valores de masa exacta obtenidos para los picos mayoritarios. En la **Tabla 2.25** se aprecian los valores obtenidos de masa exacta de los picos mayoritarios y su asignación correspondiente.



**Figura 2.48.** Espectro de masas ESI en modo negativo de la fracción **GBA**. Los picos mayoritarios se corresponden con los ácidos aldobiuónicos descriptos. \*: No asignado.

**Tabla 2.25.** Valores de masa exacta de los picos más intensos del espectro de masa ESI-QTOF en modo negativo del producto **GBA**.

Masa exacta (g/mol)	Residuo
207,05266	[4- <i>O</i> -Me-GlcA - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup>
307,06864	[GlcA-Xil-H <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
321,08383	[4- <i>O</i> -Me-GlcA-Xil - H <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
325,07826	[GlcA-Xil - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup>
339,09394	[4- <i>O</i> -Me-GlcA-Xil - H <sup>+</sup> ]
405,04327	NA <sup>a</sup>
419,05404	NA <sup>a</sup>
497,11627	[4- <i>O</i> -Me-GlcA-GlcA-Xil - H <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
647,17418	[4- <i>O</i> -Me-GlcA-GlcA-Xil-Xil - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup>

<sup>a</sup> NA = No asignado

Los picos mayoritarios con valores de masa de 307,06864, 321,08383, 325,07826, 325,07826 g/mol obtenidos en el análisis por espectrometría de masas del producto **GBA** se corresponden con disacáridos compuestos por ácido (4-*O*-metil)-glucurónico y xilosa. El resto de los picos observados se corresponden con monosacáridos de ácidos urónicos y con oligosacáridos de mayor peso molecular de ácidos urónicos y xilosa. Estos picos de masas 497,11627 y 647,17418 Da se corresponderían con oligosacáridos que contienen dos unidades de ácidos urónicos, ya sea unidos entre sí o a un mismo residuo de xilosa. En ningún espectro de RMN obtenido de **GB** y sus derivados se encontraron señales compatibles con este tipo de estructuras. Una explicación para la presencia de estos fragmentos podría estar en que el producto **GBA** representa sólo una porción del producto original **GB**, por lo que la proporción de un fragmento minoritario como este tipo de oligosacáridos en la goma brea original sería de trazas, no pudiéndose observar en los espectros de RMN.

Las fracciones **GBA** y **GBAR** fueron también analizadas por espectroscopía de resonancia magnética nuclear. En la **Figura 2.49** se pueden observar ampliaciones de la zona anomérica de los espectros HSQC para ambas fracciones, donde todas las señales se encuentran asignadas. En la **Tabla 2.26** se encuentra la asignación e identificación de todas las señales anoméricas en concordancia con los antecedentes bibliográficos<sup>97-99,123,124</sup>.

Como se puede observar en la **Figura 2.49 a)**, en la zona anomérica del producto **GBA** hay señales que se corresponden a monosacáridos de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y de xilosa, y además disacáridos conformados por ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y xilosa. En concreto, se encontraron 10 señales anoméricas: 2 corresponden a D-xilopiranososa en configuraciones  $\alpha$  y  $\beta$ ; 2 señales pertenecen a ácido (4-*O*-Me)- $\alpha$ -D-glucurónico en configuraciones  $\alpha$  y  $\beta$ ; 5 señales corresponden a unidades de xilosa o de ácidos glucurónicos que constituyen los distintos disacáridos. Por último se determinó la presencia de una señal compatible con la presencia de glucuronolactona.

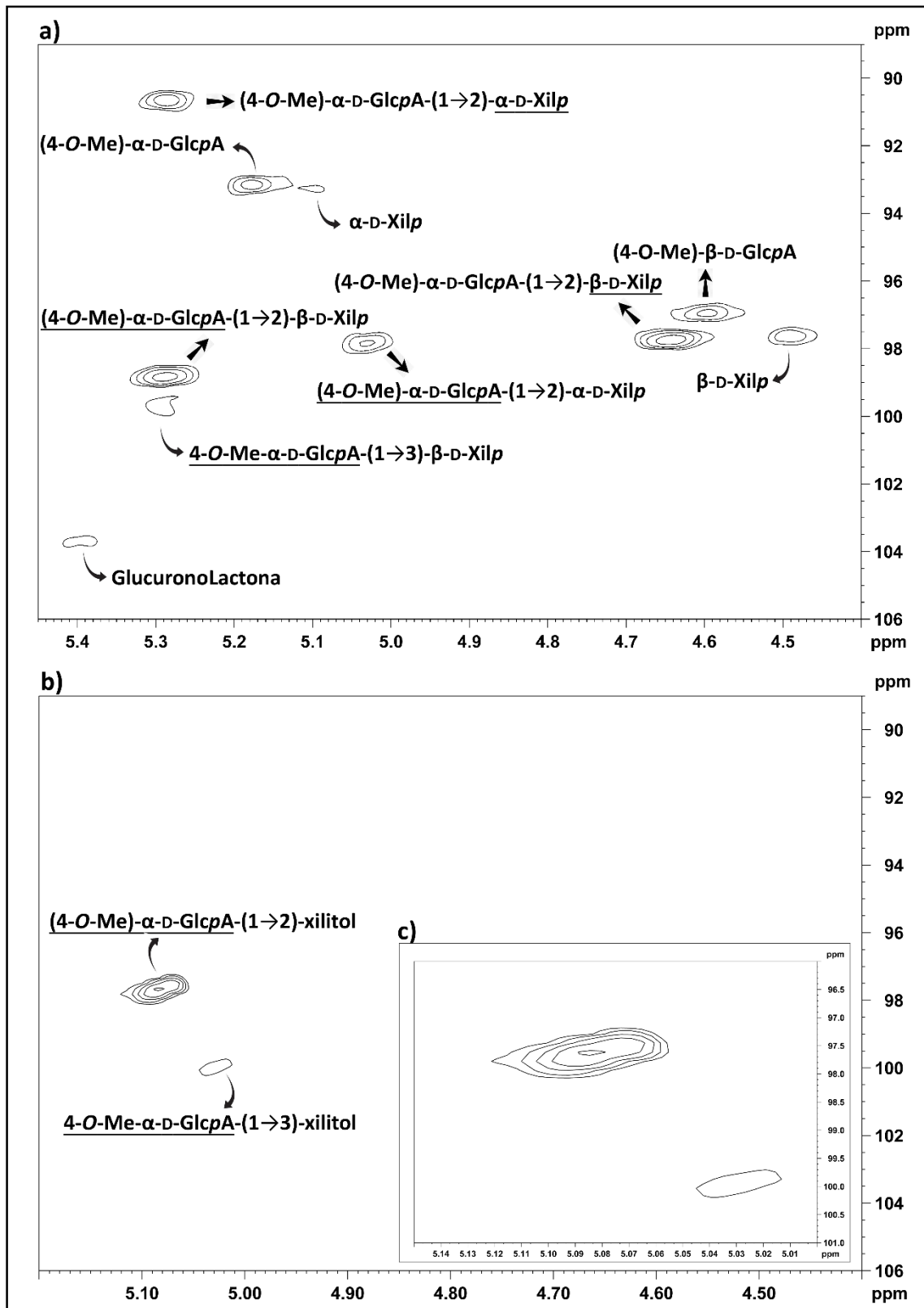


Figura 2.49. a) Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC **GBA**. b) y c) Ampliaciones de la zona anomérica del espectro HSQC de **GBAR**.

**Tabla 2.26.** Desplazamientos químicos (ppm) y asignación de las señales anoméricas observadas en el espectro de RMN HSQC de **GBA**.

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
(4-O-Me)- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→2)- <u><math>\alpha</math>-D-Xilp</u>	90,6	5,28
(4-O-Me)- $\alpha$ -D-GlcpA	93,1	5,17
$\alpha$ -D-Xilp	93,2	5,09
(4-O-Me)- $\beta$ -D-GlcpA	96,9	4,59
$\beta$ -D-Xilp	97,6	4,49
(4-O-Me)- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→2)- <u><math>\beta</math>-D-Xilp</u>	97,7	4,64
<u>(4-O-Me)-<math>\alpha</math>-D-GlcpA</u> -(1→2)- $\alpha$ -D-Xilp	97,8	5,03
<u>(4-O-Me)-<math>\alpha</math>-D-GlcpA</u> -(1→2)- $\beta$ -D-Xilp	98,8	5,29
<u>(4-O-Me)-<math>\alpha</math>-D-GlcpA</u> -(1→3)- $\beta$ -D-Xilp	99,7	5,29
D-Glucuronolactona	103,7	5,38

La presencia de xilosa libre puede resultar llamativa teniendo en cuenta el paso de purificación realizado para eliminar azúcares neutros mediante columna de intercambio aniónico. No obstante, debido a la gran abundancia de este azúcar en los polisacáridos de goma brea, es posible que una pequeña fracción de las unidades de xilosa que se liberaron luego del paso inicial de hidrólisis haya coeluido con la muestra luego del paso por la columna de intercambio aniónico.

Por otro lado, si bien el enlace glicosídico de los ácidos urónicos es muy resistente a la hidrólisis ácida, es esperable que una pequeña parte de los mismos se hidrolice y por lo tanto se liberen como monosacáridos. Estos fueron separados del resto de los azúcares neutros mediante la columna de intercambio aniónico y posterior elución con ácido clorhídrico. Por lo tanto, es consistente la lactonización parcial de los ácidos urónicos como consecuencia de este proceso y la presencia de glucuronolactona en la mezcla analizada. La asignación de esta señal fue realizada según antecedentes bibliográficos<sup>125</sup>.

En el espectro de la fracción **GBA**, se observan señales anoméricas que se originan en los ácidos aldobiurónicos: tres son originadas por ácidos urónicos y las dos restantes por unidades de xilosas. La asignación de estas se presenta en la **Tabla 2.26**. La presencia de numerosas señales se origina en que el ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y su par 4-O-metilado están enlazados a la posición C-2 de la xilosa, la cual puede encontrarse tanto en la configuración  $\alpha$

como  $\beta$  ya que la misma se encuentra como extremo reductor. Por lo tanto estos disacáridos generan entonces cuatro señales en total en la zona anomérica.

La quinta señal, con desplazamiento químico 99,7/5,29 ppm se corresponde a una unidad de ácido (4-*O*-Me)-glucurónico en un entorno distinto que aquellos que están enlazados al C-2 de la xilosa y presenta un corrimiento a campos más bajos para el átomo de carbono en comparación a aquellas que ya fueron asignadas. Con esta información y el análisis de un espectro TOCSY de esta fracción, esta señal fue asignada a una unidad de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazada en posición C-3 a un residuo de xilosa. Si bien se deberían poder identificar 3 originadas en el disacárido del tipo (4-*O*-Me)- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ / $\beta$ -D-Xilp es probable que al tratarse de un fragmento minoritario la intensidad del resto de las señales sea muy pequeña. Además puede existir superposición entre dichas señales y el resto de las señales anoméricas descritas previamente, dificultando la identificación de ese tipo de residuos. En consecuencia, en el espectro HSQC (**Figura 2.49 a**) están presentes las señales de los distintos aldobiurónicos con configuración  $\alpha$  y  $\beta$ . De esta manera se observan 5 señales en la zona anomérica que se originan de estos disacáridos (ver **Tabla 2.26**).

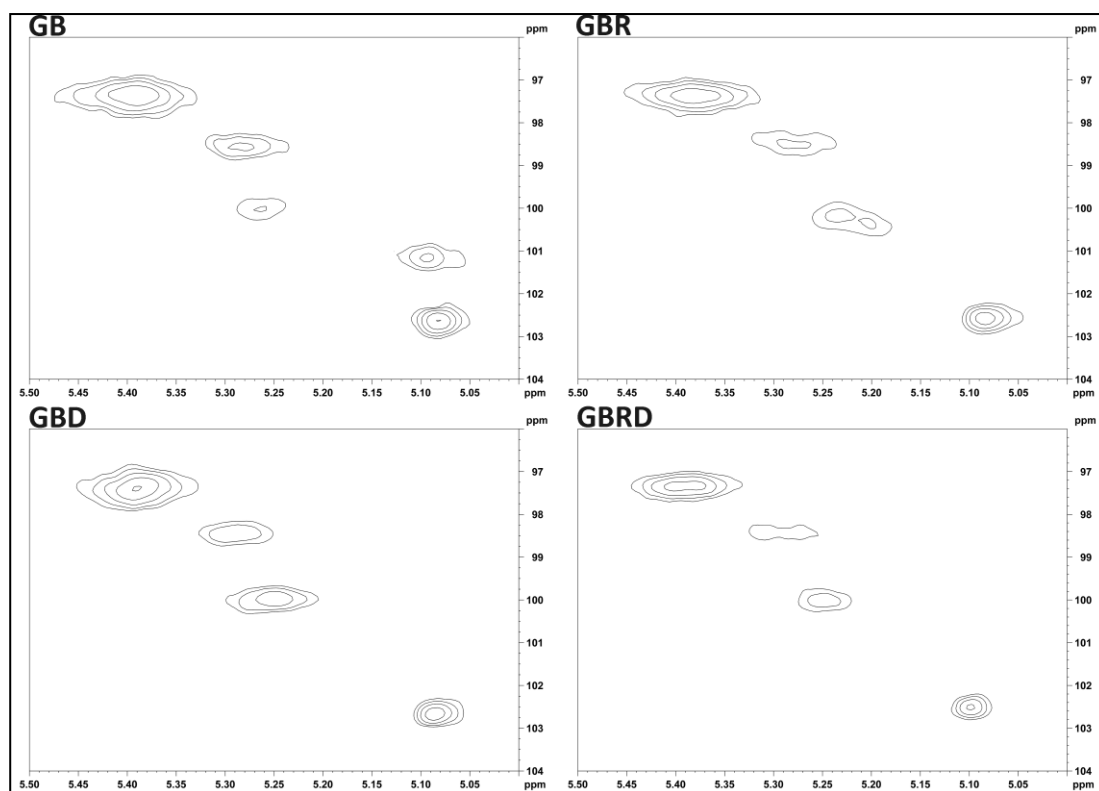
En la **Figura 2.49 b** se puede apreciar el espectro de RMN HSQC del producto reducido **GBAR**. En la zona anomérica se observan solamente dos señales con desplazamientos químicos de 97,6/5,08 ppm y 99,9/5,03 ppm. En este caso, como las unidades de xilosa se encuentran reducidas, las señales correspondientes al C-1/H-1 del xilitol están desplazadas a campos más altos y poseen desplazamientos químicos similares a las señales de los C2-5/H2-5<sup>126</sup>. La existencia de dos señales, una de las cuales se encuentra en mucho mayor proporción y otra minoritaria corrida a campos bajos para carbono y campos más altos para protón es consistente con la presencia de dos disacáridos del tipo ácido (4-*O*-metil)- $\alpha$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-xilitol) y ácido (4-*O*-metil)- $\alpha$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-xilitol). Los valores de desplazamiento químico de ambas señales anoméricas son levemente distintos de lo observado en los polisacáridos de goma brea, lo cual es esperable debido a que se encuentran en entornos químicos diferentes.

En resumen, los resultados encontrados del análisis espectroscópico y por espectrometría de masas realizado a las fracciones **GBA** y **GBAR** confirman la asignación y caracterización estructural realizada anteriormente, en relación a las unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazados en posición 2 y 3 de las unidades de

xilosa que conforman la cadena principal de los polisacáridos de goma brea. La confirmación de la existencia del disacárido 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Xilp fue muy importante para respaldar las asignaciones realizadas en la sección anterior.

### 2.2.4.8 Asignación de señales de RMN de unidades de glucosa en espectros de goma brea reducida

Como se describió anteriormente en la **sección 2.2.4.4**, al realizar modificaciones químicas sobre los polisacáridos de la goma brea se observó que la mayoría de las señales anoméricas originadas en las unidades de ácidos urónicos no se afectaban. En la **Figura 2.50** se muestran ampliaciones de la zona anomérica de espectros HSQC de la fracción **GB** y los productos **GBR**, **GBD** y **GBRD** donde se aprecia que las señales anoméricas originadas en estos residuos presentan los mismos valores de  $\delta$  en los espectros correspondientes a la fracción original y los productos reducidos y/o desacetilados, a excepción de una señal con  $\delta$  de 101,3/5,09 ppm que al reducir la goma brea se desplaza a 100,5/5,21 ppm y que al desacetilarla desaparece.

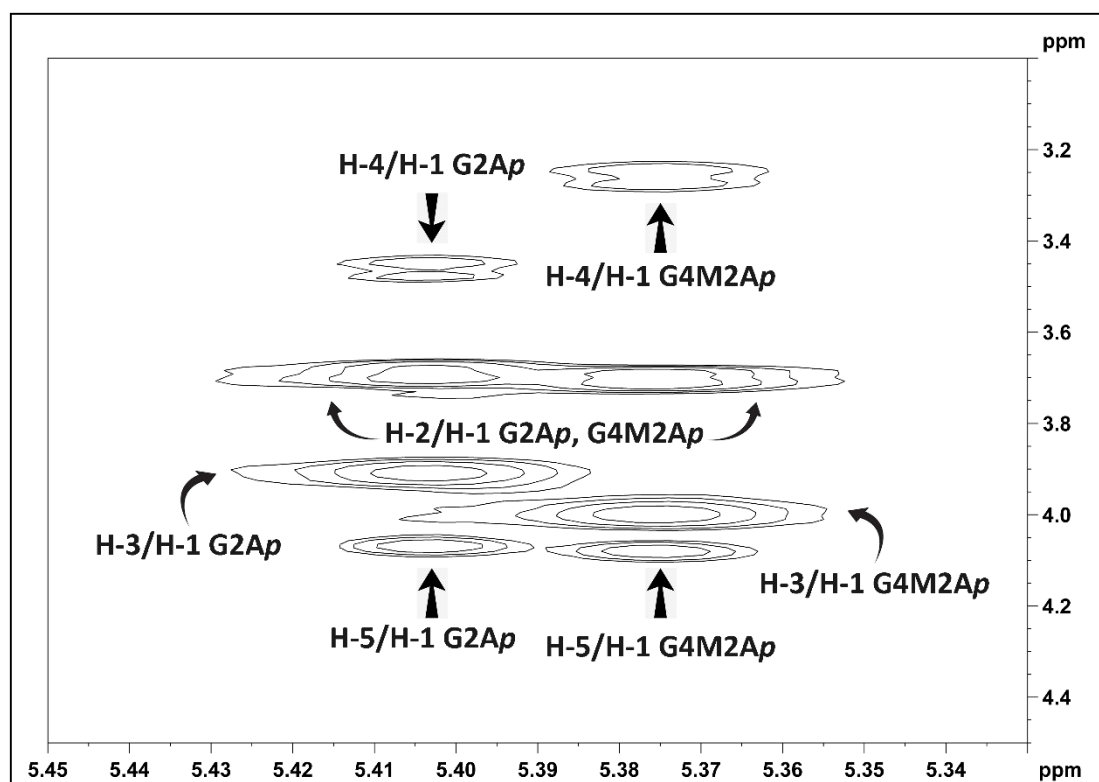


**Figura 2.50.** Ampliaciones de la zona anomérica de espectros HSQC de **GB** y los productos **GBR**, **GBD** y **GBRD**.



A diferencia de las señales anoméricas, se observa en los espectros de RMN obtenidos de los productos reducidos, que el resto de las señales originadas en los residuos de glucosa obtenidos de la reducción de los ácidos urónicos presentan efectivamente corrimientos.

Aprovechando que los valores de  $\delta$  de los protones anoméricos son idénticos a los residuos de ácidos urónicos ya asignados, se emplearon espectros TOCSY de los productos reducidos y mediante la comparación con los espectros TOCSY análogos de los productos no reducidos se pudieron identificar todos los hidrógenos de las unidades de glucosa. A modo de ejemplo en la **Figura 2.51** se muestra una ampliación del espectro TOCSY del producto **GBRD** donde se identificaron todas las señales de correlación entre los protones anoméricos y los hidrógenos de los residuos de  $\alpha$ -D-glucosa y 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucosa que presentan un sustituyente en la posición C-2, a excepción de los H-6 que no pudieron observarse en este espectro, probablemente por tener una constante de acoplamiento J con el H-5 muy pequeña. Sin embargo, estas señales pudieron ser fácilmente asignadas en los espectros HSQC.



**Figura 2.51.** Ampliación del espectro TOCSY del producto **GBRD** donde se muestran todas las señales de correlación entre los protones anoméricos y todos los hidrógenos de las unidades **G2Ap** y **G4M2Ap** a excepción de los H-6.

Con el empleo de espectros HSQC y realizando el mismo procedimiento comparativo, en conjunto con algunos antecedentes bibliográficos encontrados de glucosas en distintos entornos<sup>126-128</sup>, se pudieron asignar completamente todos los residuos de glucosas en los entornos anteriormente descritos. En la **Figura 2.52** se muestran los espectros HSQC de los productos a) **GBRD** y b) **GBD** donde se identificaron todas las señales de los C2-6/H2-6 de estos residuos y se puede apreciar que dichas señales sólo se encuentran presentes en el espectro correspondiente al producto reducido.

En la **Tabla 2.27** se muestran las asignaciones completas. Las unidades se nombraron de forma análoga a las respectivas unidades de ácidos urónicos pero omitiendo la letra **A**.

**Tabla 2.27.** Desplazamientos químicos (en ppm) de las señales originadas en las unidades de glucosa y 4-*O*-metilglucosa presentes en los espectros de la goma brea reducida (**GBR**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6eq/H-6ax
$\alpha$ -D-Glcp-(1→2 <b>(G)</b>	98,4 5,30	72,0 3,51	73,4 3,77	70,0 3,42	72,6 4,05	60,9 3,80 ; 3,72
4- <i>O</i> -Me- $\alpha$ -D-Glcp-(1→2 <sup>a</sup> <b>(G4M)</b>	98,4 5,28	72,0 3,51	73,4 3,77	79,6 3,22	71,3 4,05	60,9 3,80 ; 3,72
4- <i>O</i> -Me- $\alpha$ -D-Glcp-(1→3 <sup>a</sup> <b>(X3G4M)</b>	100,0 5,22	72,1 3,51	73,5 3,76	79,7 3,24	71,5 3,93	60,9 3,80; 3,75
→2)- $\alpha$ -D-Glcp-(1→2 <b>(G2Ap)</b>	97,4 5,40	79,8 3,70	72,8 3,91	70,0 3,46	72,4 4,07	60,9 3,81; 3,75
→2)-4- <i>O</i> -Me- $\alpha$ -D-Glcp-(1→2 <sup>a</sup> <b>(G4M2Ap)</b>	97,4 5,38	79,8 3,70	72,6 4,00	79,7 3,26	71,3 4,08	60,9 3,81; 3,75

<sup>a</sup> Desplazamiento químico de *O*-Me de 60,7 y 3,54 ppm.

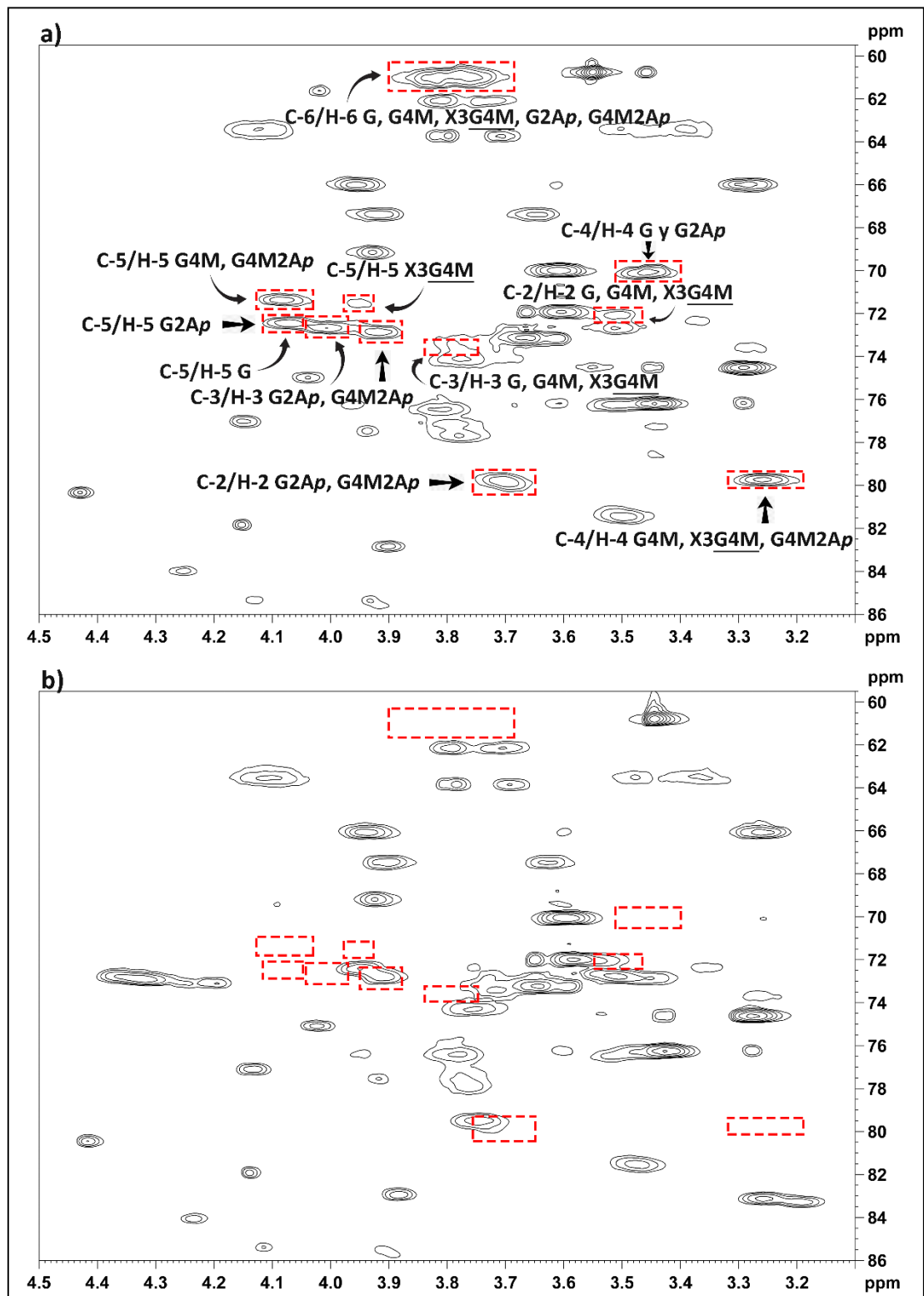
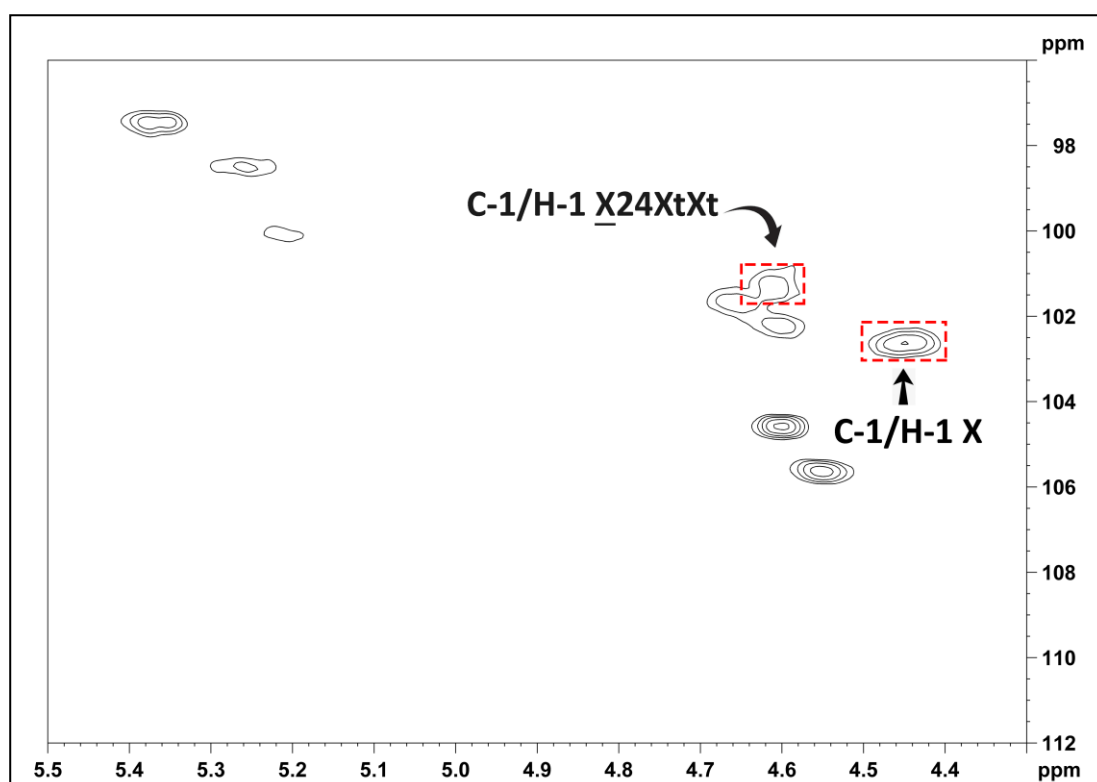


Figura 2.52. Ampliaciones de los espectros HSQC de a) GBRD y b) GBD. Las señales marcadas en rojo se corresponden con los C2-6/H2-6 de las unidades de glucosa G, G4M, X3G4M, G2Ap y G4M2Ap.

### 2.2.4.9 Asignación de señales de RMN de unidades de xilosa de cadena lateral disustituida con xilasas terminales

En la región anomérica de los espectros HSQC obtenidos de **GB** y sus productos reducidos, desacetilados o hidrolizados se observa una señal con desplazamiento químico de 101,5/4,62 ppm, la cual está junto a otras dos señales anoméricas con  $\delta$  muy similares. Por este motivo la identificación y asignación empleando espectros TOCSY fue más compleja que para otras señales debido al alto grado de superposición. No obstante, con la utilización del espectro TOCSY del producto **GBRHD** se pudieron identificar todos los hidrógenos que acoplan con la señal anomérica de 4,62 ppm y por lo tanto pertenecen a la misma unidad (ver **Figura 2.53**). Como se verá posteriormente en detalle, dicho valor de desplazamiento químico de los C-1/H-1 es compatible con el de unidades de xilosa de cadena sustituidas, aunque en este caso la identidad del fragmento estructural que genera dicha señal es levemente distinta a las unidades de la cadena central.



**Figura 2.53.** Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC del producto **GBRHD**. La señal marcada en **rojo** se corresponde con el C-1/H-1 de la unidad **X24XtXt**.

En la **Figura 2.54 a)** se presenta una ampliación del espectro TOCSY de **GBRHD**, donde se pueden apreciar únicamente tres señales de correlación entre el H-1 de la unidad **X24XtXt** y el resto de los protones del residuo con  $\delta$  de 4,15 ppm, 3,77-3,78 ppm, 3,48-3,49 ppm. La señal con desplazamiento químico de 4,62/3,77-3,78 ppm se encuentra superpuesta con otra señal. Sin embargo, en el mismo espectro de TOCSY, en la región de desplazamientos químicos de 3,77 ppm se aprecian señales de correlación con desplazamientos químicos de 3,48-3,49 ppm, 4,15 ppm y 4,62 ppm indicando la validez de la asignación realizada.

En el espectro b) se muestra una ampliación del espectro de RMN HSQC de la misma fracción donde se pudieron identificar y asignar todas las señales originadas por los C2-5/H2-5 del residuo que se denominó **X24XtXt** y que se corresponde con una unidad de  $\beta$ -D-xilopiranososa sustituida en posición C-2 y C-4 por unidades terminales de xilosa. En la **Tabla 2.28** se muestra la asignación completa de esta unidad.

Estas asignaciones se realizaron teniendo en cuenta los resultados de Kovač *et al.*<sup>129</sup> publicados en un trabajo de 1980. Los autores realizaron la síntesis y caracterización espectroscópica por RMN de un trisacárido formado por el metilglicósido de una unidad de  $\beta$ -xilosa sustituida en posiciones 2 y 4 por residuos terminales de  $\beta$ -xilosa. Si bien sólo informaron los valores de desplazamientos químicos de los carbonos, esta unidad disustituida presentaba un valor de desplazamiento químico correspondiente al C-2 peculiarmente alto (81,9 ppm) en comparación con los valores típicos de unidades de  $\beta$ -xilosa enlazadas (1 $\rightarrow$ 4) y sustituidas en posición C-2.

**Tabla 2.28.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales correspondientes a unidades de  $\beta$ -D-xilosa sustituidas en posición C-2 y C-4 con residuos terminales de  $\beta$ -D-xilopiranososa (**X24XtXt**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
$\rightarrow$ 2,4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ( <b>X24XtXt</b> )	101,5	81,4	74,2	77,6	63,6
	4,62	3,49	3,77	3,78	4,15;3,48

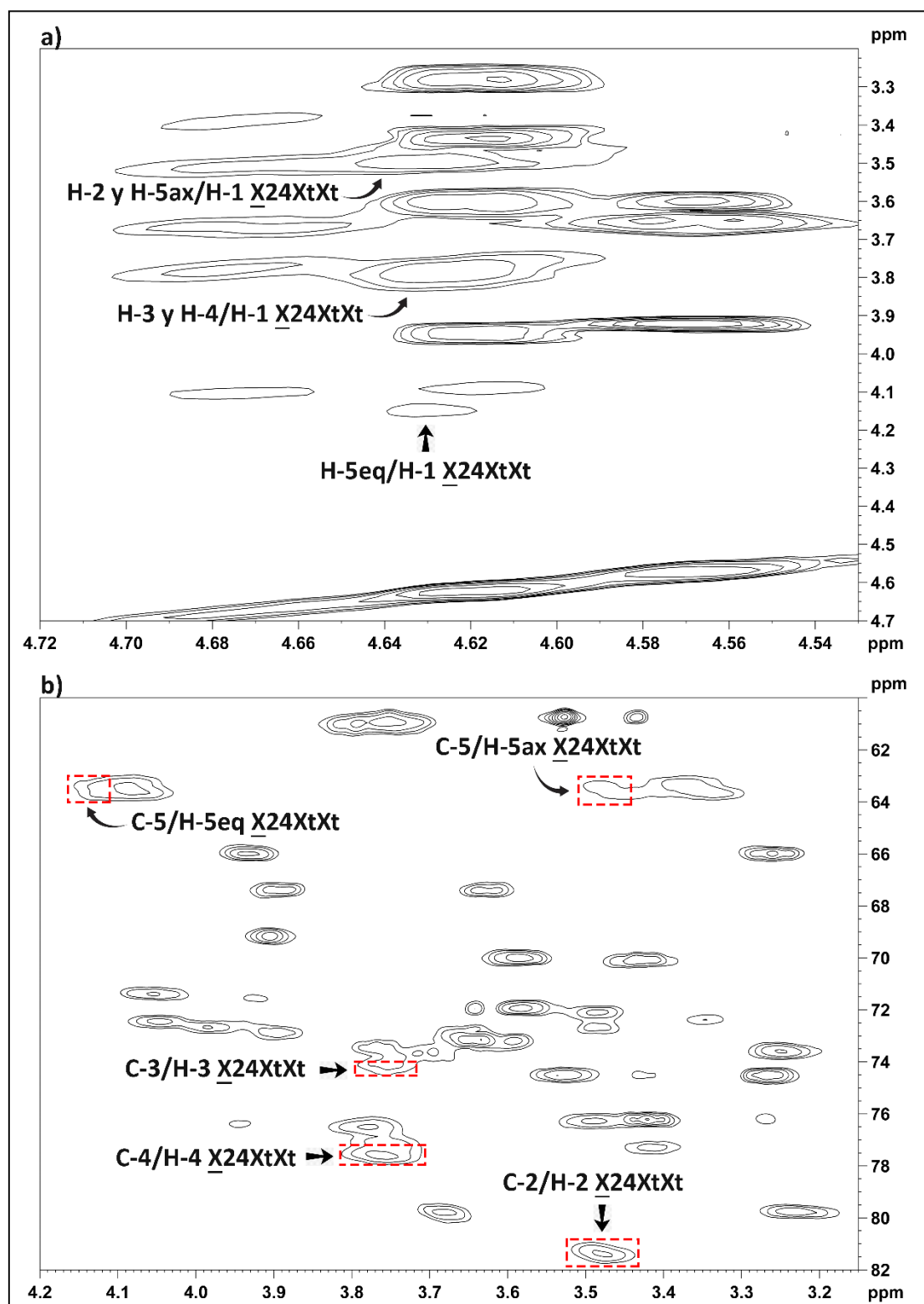


Figura 2.54. Ampliaciones de los espectros del producto **GBRHD** a) TOCSY y b) HSQC. Las señales maracas en **rojo** se corresponden con los C2-5/H2-5 de la unidad  $\underline{X24XtXt}$ .

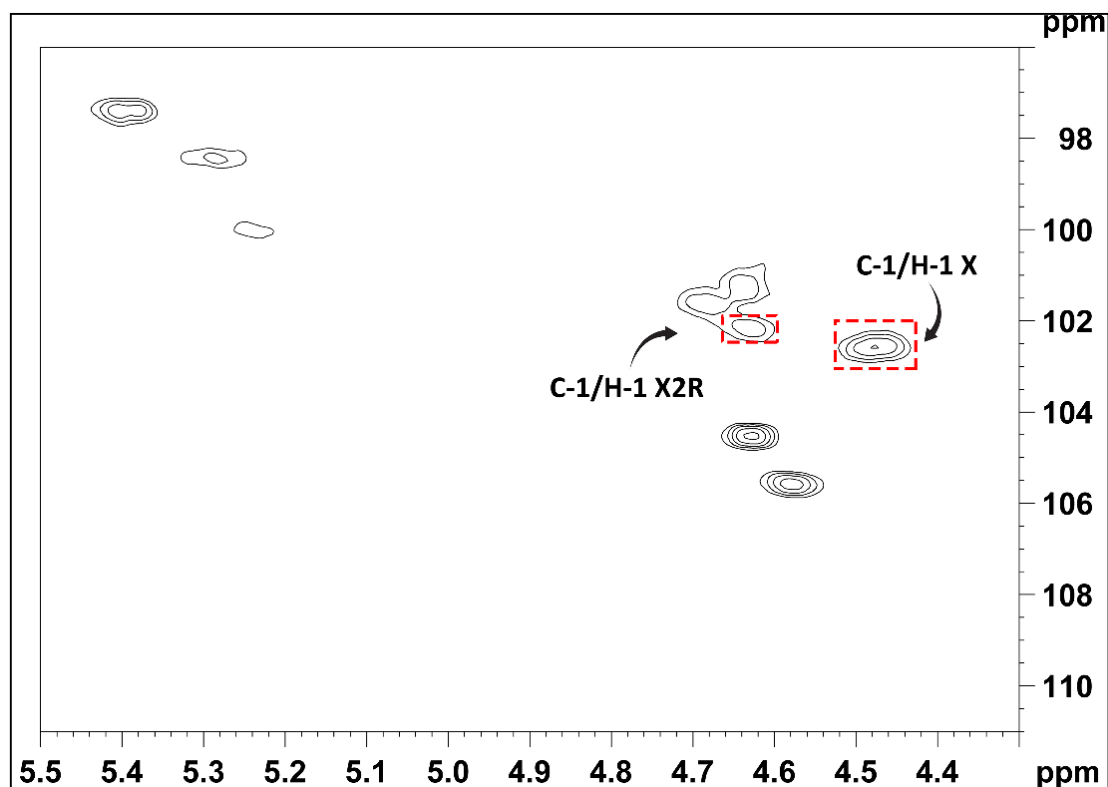
Observando los valores de desplazamientos químicos mostrados en la **Tabla 2.28**, se aprecia que además del valor inusualmente alto del desplazamiento químico del C-2, tanto el H-3 como el H-5ax presentan valores corridos hacia campos más bajos respecto de la unidad terminal **X** y de cualquier otra unidad de xilosa sustituida que se detallará posteriormente.

En cuanto a las unidades terminales de xilosa enlazadas a este residuo, la unidad que se encuentra enlazada en posición C-2 muy probablemente sea indistinguible de la unidad asignada como **Xt** por lo que se las considera espectroscópicamente idénticas. No obstante, la unidad de xilosa terminal que se encuentra enlazada en posición C-4 se espera que presente valores de desplazamientos químicos distintos de las unidades **X** y **Xt** y no pudo ser asignada debido a la gran superposición de señales en la zona de desplazamientos químicos compatibles con residuos de  $\beta$ -D-xilosa.

#### **2.2.4.10 Asignación de señales de RMN de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2**

En las secciones anteriores se describieron, a excepción de los grupos acetilo, todas las señales pertenecientes a los sustituyentes de la cadena principal de xilosas. Por lo tanto, lo que resta es identificar la posición de unión de cada una de estas ramificaciones y describir las señales correspondientes a los residuos de xilosa donde están enlazados. Como se verá en detalle a continuación no sólo la posición del sustituyente sino que también la identidad del mismo generan unidades de xilosa de cadena en distintos entornos químicos con señales diferenciadas en los espectros de RMN.

Continuando con el análisis de las señales correspondientes a los distintos residuos de xilosa, en los espectros HSQC de los productos **GBHD** y **GBRHD** (ver **Figuras 2.26** y **2.55**) se observa claramente una señal con desplazamiento químico 102,2/4,61 ppm, la cual está muy cerca de la señal asignada en la sección anterior. Dicha señal se encuentra presente en **GB** y todos los espectros obtenidos de los productos modificados aunque superpuesta con otras señales.



**Figura 2.55.** Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC del producto **GBRHD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con los C-1/H-1 de las unidades de xilosa **X** y **X2R**.

La asignación completa de este residuo pudo realizarse principalmente mediante el empleo del espectro TOCSY del producto **GBRHD**. En la **Figura 2.56 a)** se puede observar la ampliación del espectro TOCSY de dicho derivado donde se pueden apreciar todas las señales de correlación entre el H-1 con  $\delta$  de 4,61 ppm y el resto de los hidrógenos de la unidad. Las señales de correlación que se encuentran parcialmente superpuestas se corresponden mayormente al residuo de xilosa terminal **Xt**. La **Figura 2.56 b)** se corresponde a una ampliación del espectro HSQC del mismo producto donde se identificaron las correlaciones C2-5/H2-5 originadas por esta unidad. Cabe destacar que aún en un producto desacetilado e hidrolizado se puede ver en los distintos espectros de RMN una gran superposición y cercanía de señales, lo cual es indicativo de la complejidad de la estructura de los polisacáridos de goma brea.

Por lo tanto, las señales asignadas para esta unidad se corresponden con unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xilopiranosas sustituidas en posición C-2 (unidad **X2R**, ver **Figura 2.82**), en



concordancia con los antecedentes bibliográficos consultados<sup>55,101,102,106,111,113,114,130,131</sup>. En la **Tabla 2.29** se muestra la asignación completa de la unidad **X2R**.

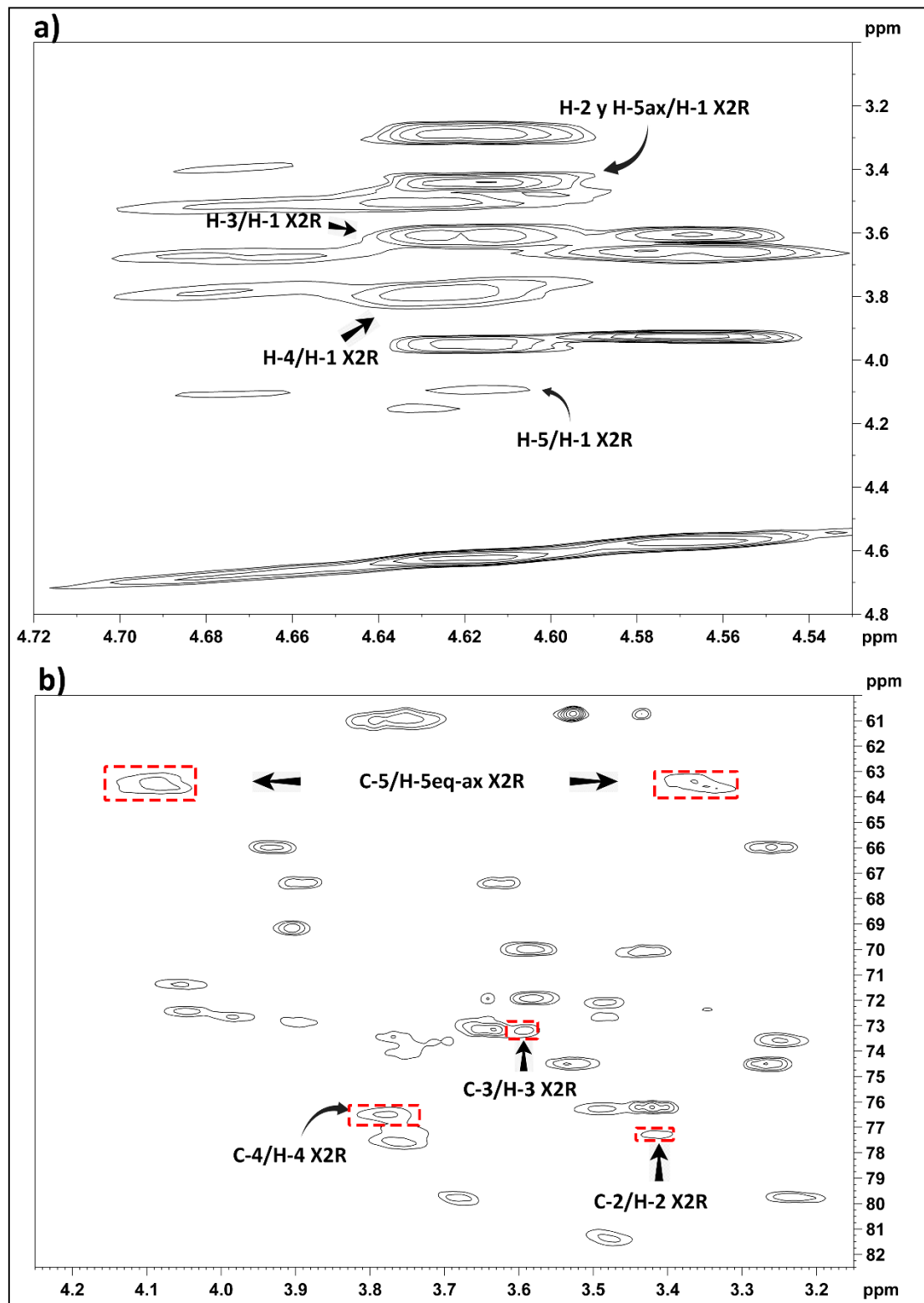
Todas las señales de C/H originadas en la unidad **X2R** se encuentran en los espectros HSQC de todos los productos de la goma brea, lo cual coincide con el análisis por metilación que indica que las unidades xilopiranosas de cadena sustituidas en posición C-2 son los residuos mayoritarios en todos los casos (ver **Tabla 2.8**).

**Tabla 2.29.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2 (**X2R**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
→2,4)-β-D-Xilp-(1→ ( <b>X2R</b> )	102,2 4,61	77,2 3,41	73,2 3,59	76,4 3,78	63,5 4,11;3,37

Si se observan los desplazamientos químicos tanto de los carbonos como de los hidrógenos de las unidades de cadena β-(1→4)-D-xilopiranosas no sustituidas y con un sustituyente en posición 2 (**X** y **X2R**, ver **Tabla 2.16** vs **Tabla 2.29**) se aprecia que la diferencia entre los valores encontrados es pequeña. Únicamente se observan diferencias significativas en los desplazamientos químicos de los H-1 (unidad **X** 4,46 ppm vs. unidad **X2R** 4,61 ppm) y del par C/H de la posición del sustituyente (C-2/H-2 unidad **X** 73,6/3,26 ppm vs. 77,2/3,41 ppm unidad **X2R**). Por este motivo, la identificación de este residuo fue compleja, siendo sumamente importante los espectros TOCSY de productos modificados con menor superposición de señales para poder identificarla correctamente.

En cuanto a la identidad de los sustituyentes que se encuentran enlazados en la posición C-2 de la unidad **X2R**, por el análisis por metilación realizado en las **secciones 2.1.6** y **2.1.9** se sabe que es probable que los residuos de arabinofuranosas y al menos parte de los ácidos urónicos se encuentren enlazados a la cadena principal de xilosas en dicha posición.



**Figura 2.56.** Ampliaciones de los espectros de RMN del producto **GBRHD** a) TOCSY y b) HSQC. Las señales marcadas en **rojo** en el espectro b) se corresponden con las correlaciones C-1/H-1 de la unidad **X2R**.

En el espectro NOESY del producto **GBRD** (ver **Figura 2.57** y **Figura 2.58**) se encontró una señal de correlación con desplazamiento químico de 5,29/3,41 ppm que se corresponde al H-1 de la unidad **Af $\alpha$ 3R** y al H-2 de la unidad **X2R** respectivamente (ver **Tabla 2.29**). Además, se pudieron observar otras señales de correlación entre dicho protón anomérico y señales con desplazamiento químico de 4,11 ppm y 3,78 ppm, correspondientes al H-5eq y al H-4 de la unidad **X2R**. Esta información, en conjunto con el análisis por metilación y en concordancia con antecedentes bibliográficos<sup>52,64,91</sup> encontrados, indican que las unidades de arabinofuranosas se encuentran formando disacáridos del tipo  $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$  (**Af $\alpha$ -Af $\alpha$ 3R**) y  $\beta$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$  (**Af $\beta$ -Af $\alpha$ 3R**) enlazados a la posición 2 de los residuos de xilosa de la cadena principal **X2R**.

En este punto cabe reiterar que los espectros NOESY fueron utilizados con precaución para determinar conectividades, aun cuando en este tipo de experimentos los resultados obtenidos se relacionan con correlaciones espaciales entre distintos átomos de hidrógeno. En ese sentido, si se logran identificar correlaciones entre el H-1 de una unidad con el H de otra, junto con análisis complementarios, se puede verificar la existencia de una unión entre esas unidades.

Por otro lado, en la ampliación del espectro NOESY del producto **GBHD** (ver **Figura 2.58**) se puede ver una señal a 5,28/5,29 y 4,61 ppm que surge de la correlación entre los H-1 de las unidades **AG** y **AG4M** y el H-1 de la unidad **X2R**. Además de dicha señal, se puede apreciar en el mismo espectro la intensificación y ensanchamiento de una señal originada en la interacción entre el H-1 de las unidades **AG** y **AG4M** y otra con desplazamiento químico de 3,41 ppm que podría pertenecer al H-2 de la unidad **X2R**. Sin embargo, debido a la presencia de otras señales con valores de desplazamiento químico muy similares que podrían correlacionar con el H-1 de estas unidades (como el grupo metilo que se encuentra en posición O-4 o el H-4 de la unidad **AG**) no puede afirmarse que dicha señal de correlación pertenezca al H-2 de la unidad de xilosa sustituida en esa posición. Cabe destacar que la señal de correlación mostrada en la **Figura 2.58** se encuentra en el espectro NOESY de **GB** así como en los espectros NOESY realizados a los productos obtenidos a partir de dicha fracción.

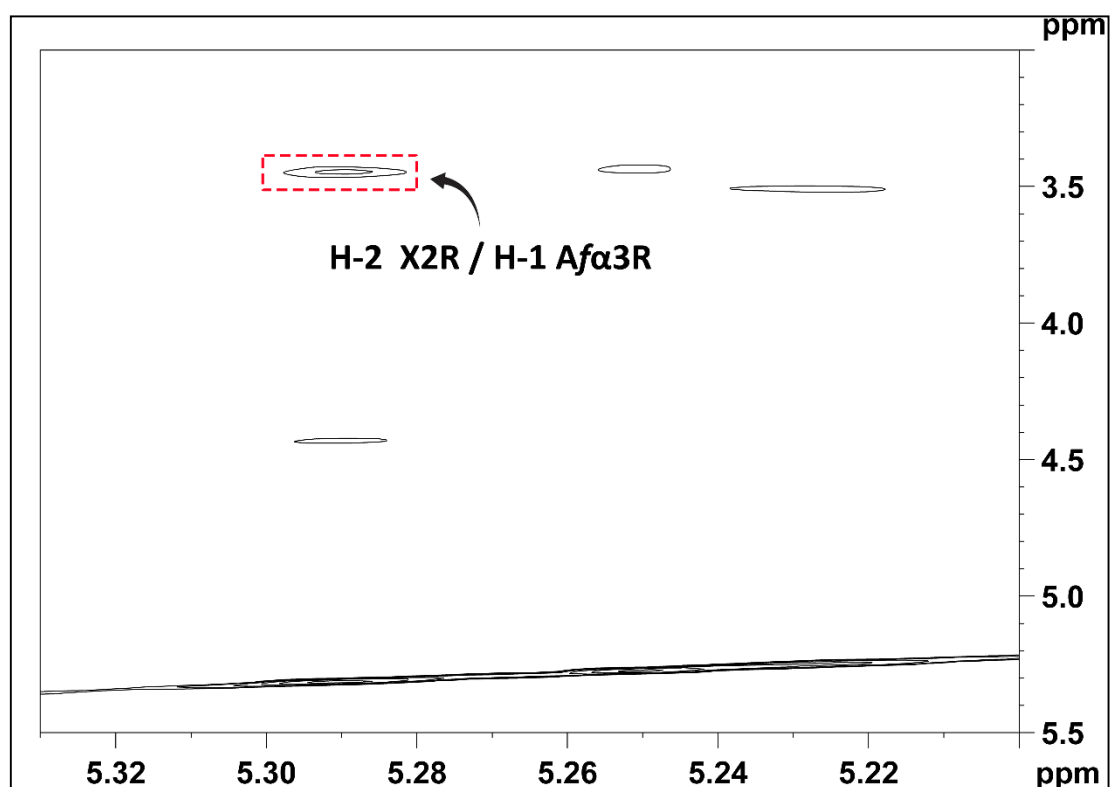


Figura 2.57. Ampliación del espectro NOESY del producto **GBRD**. La señal de acoplamiento marcada en **rojo** se corresponde al H-2 (**X2R**) / H-1 (**Af $\alpha$ 3R**).

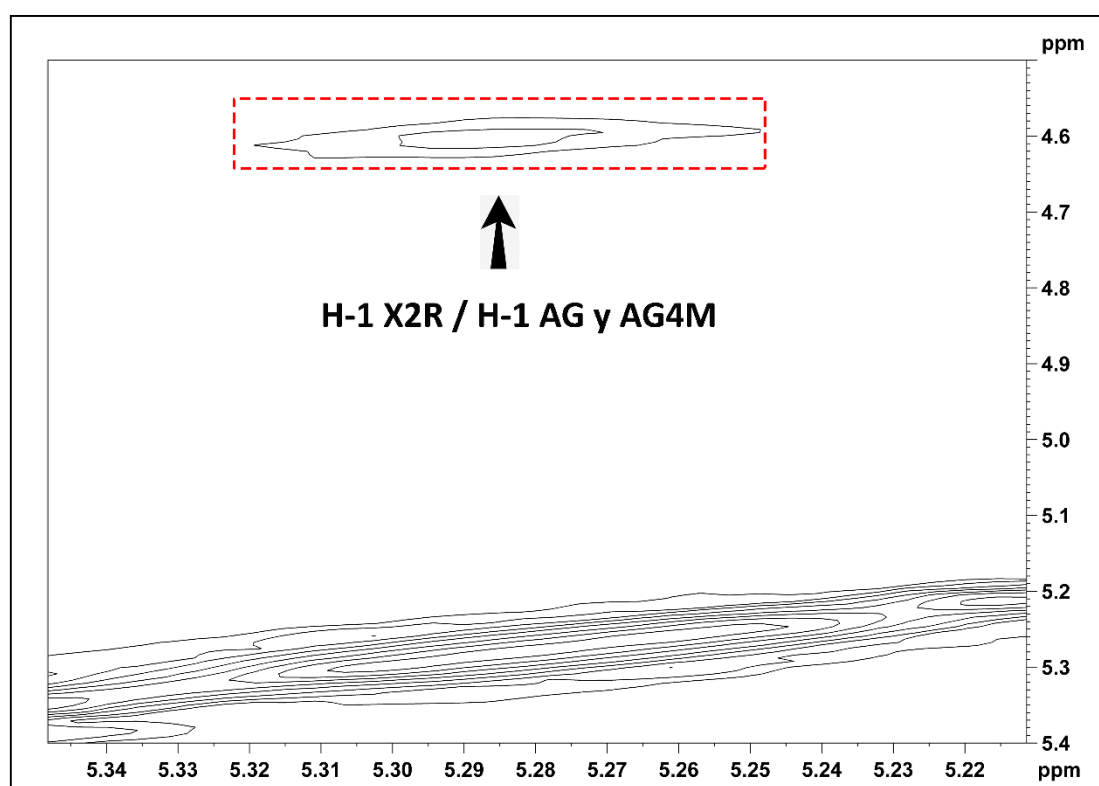


Figura 2.58. Ampliación del espectro NOESY del producto **GBHD**. La señal marcada en **rojo** se corresponde con la correlación entre el H-1 de la unidad **X2R** y el H-1 de las unidades **AG** y **AG4M**.

El análisis realizado por metilación sobre el producto **GBR** y el análisis por resonancia magnética realizado hasta el momento sugiere que las unidades de xilosa terminal (**Xt**) se encontrarían enlazadas al polisacárido en la posición 2 de las unidades de xilosa de la cadena principal (unidad **X2R**) y a las xilosas que componen el trisacárido que se encuentra presente como cadena lateral (**X24XtXt**). Lamentablemente, esta hipótesis no pudo ser corroborada utilizando espectros NOESY como en los casos anteriores, debido a que las correlaciones no pudieron establecerse por la alta superposición de señales. En la **Tabla 2.30** se muestran a modo comparativo los desplazamientos químicos de los protones de las unidades de xilosa terminales **Xt** y de cadena con sustituyente en posición C-2 **X2R**. Como se puede observar, ambas unidades poseen valores similares de desplazamiento químico de sus protones.

**Tabla 2.30.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales originadas en los hidrógenos de las unidades **Xt** y **X2R**.

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5 eq/H-5 ax
$\beta$ -D-Xilp-(1→ <b>(Xt)</b>	4,61	3,28	3,43	3,60	3,94; 3,27
→2,4)- $\beta$ -D-Xilp-(1→ <b>(X2R)</b>	4,61	3,41	3,59	3,78	4,11;3,37

Se puede apreciar que los desplazamientos químicos de los protones anoméricos son idénticos y solo se encuentran diferencias significativas en los valores 3,78 ppm, 3,94 ppm y 4,11 ppm correspondientes al H-4 de la unidad **X2R**, y a los H-5 eq de las unidades **Xt** y **X2R** respectivamente. Estas particularidades hacen muy difícil la identificación de señales de acoplamiento entre estos residuos por experimentos NOESY ya que no se pueden distinguir si los acoplamientos que se observan son entre esas unidades o con sí mismas.

Sin embargo, en ninguno de los espectros NOESY realizados se encontraron señales de correlación entre protones pertenecientes a la unidad **Xt** y otros residuos, sugiriendo así que estos residuos no se encontrarían unidos a otras unidades, particularmente a los ácidos urónicos en la posición 2.

En base a la información recolectada por el análisis de metilación y RMN se considera altamente probable que los residuos de xilopiranosas terminales **Xt** se encuentran principalmente enlazados a la cadena principal de xilosas en la posición C-2 de los residuos **X2R**.

En cuanto a la posición de unión del trisacárido **X24XtXt**, se llegó a una conclusión similar al caso anterior. Debido a que el valor de desplazamiento químico del H-1 entre el residuo **X24XtXt** y la unidad **X2R** es prácticamente idéntico, la identificación de señales de correlación entre estos residuos por experimentos NOESY no es posible. Sin embargo no se encontraron evidencias espectroscópicas de que este trisacárido se encuentre enlazado a una unidad distinta. Por lo tanto se considera que la unidad **X24XtXt** se halla enlazada en posición C-2 a la cadena principal de xilosas (unidad **X2R**).

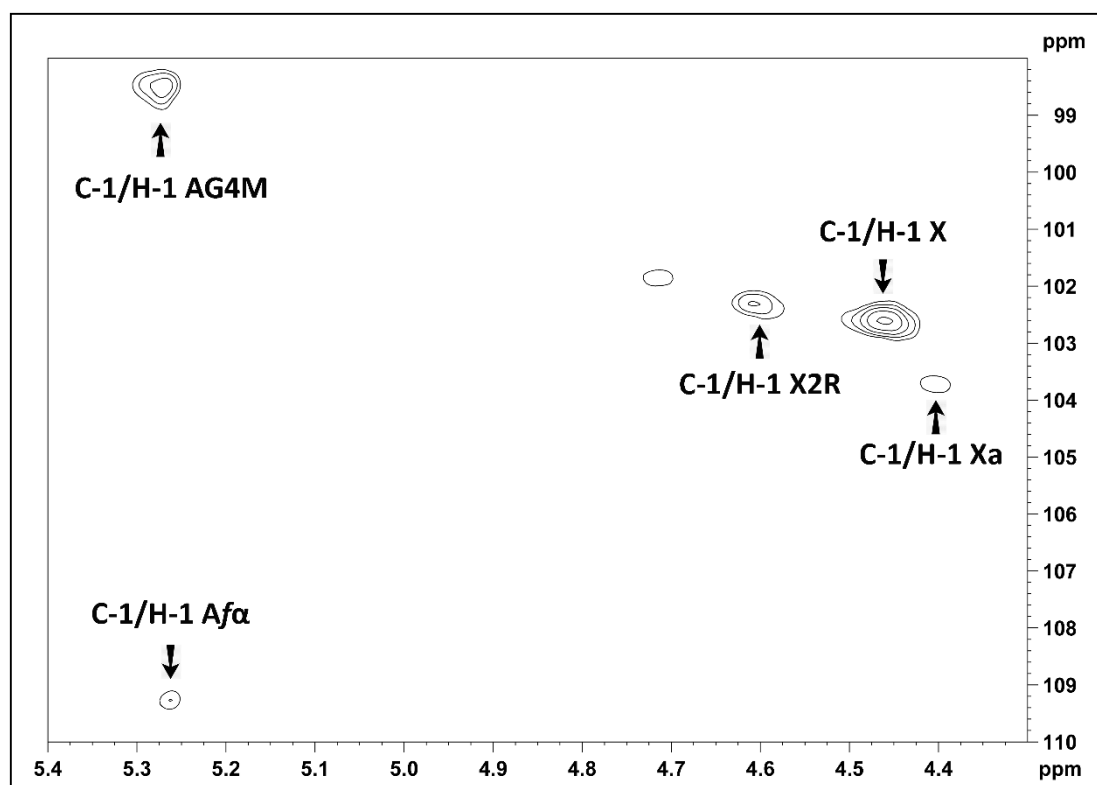
Además de las correlaciones descritas en los espectros NOESY, el análisis espectroscópico realizado sobre el producto obtenido mediante la degradación de Smith **GBS** permitió obtener más información de interés.

Del análisis teórico de los fragmentos que pueden haber resistido el tratamiento de Smith y de los resultados obtenidos del análisis por metilación (**sección 2.1.11**) se determinó que los únicos sustituyentes que quedaron en el producto degradado en proporciones relevantes son los residuos terminales de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico y de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa.

En la **Figura 2.59** se muestra la zona anomérica del espectro HSQC del producto **GBS** donde se encuentran las señales asignadas (a excepción de una señal con desplazamiento químico de 101,8 y 4,71 ppm la cual será asignada en secciones posteriores, ver página 167). En la **Tabla 2.31** se muestra el desplazamiento químico de las señales anoméricas del espectro HSQC de **GBS** y su asignación correspondiente.

**Tabla 2.31.** Desplazamientos químicos y asignación de señales anoméricas del espectro HSQC de **GBS**.

Residuo		Desplazamiento químico (ppm)	
		<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
C-1/H-1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$	<b>(Xa)</b>	103,6	4,41
C-1/H-1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$	<b>(X)</b>	102,6	4,46
C-1/H-1 $\rightarrow$ 2,4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$	<b>(X2R)</b>	102,2	4,61
C-1/H-1 $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$	<b>(A<math>\alpha</math>)</b>	109,3	5,25
C-1/H-1 4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$	<b>(AG4M)</b>	98,5	5,28



**Figura 2.59.** Ampliación de la zona anomérica del espectro de RMN HSQC de la fracción tratada según Smith **GBS**.

Como se puede observar en la **Figura 2.59** y en la **Tabla 2.31**, el producto **GBS** contiene unidades terminales de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico que presentan un desplazamiento químico del par anomérico C-1/H-1 idéntico al descrito anteriormente (unidad **AG4M**), el cual se encuentra enlazado a la cadena principal en posición C-2 de los residuos de xilosa. En conjunto con esta señal observada se puede apreciar que la única señal correspondiente a un residuo de xilosa con un sustituyente en posición 2 tiene un desplazamiento químico idéntico al descrito para la unidad **X2R**. Estos resultados, en conjunto con lo descrito anteriormente, confirman que las unidades de ácidos glucurónicos terminales **AG** y **AG4M** se encuentran enlazados a la posición 2 a los residuos de xilosa de cadena **X2R**. Además, en el espectro de HSQC del producto **GBS** se encuentra también una señal anomérica perteneciente a la unidad terminal de arabinofuranosa **Afa**, la cual se encuentra enlazada también en posición 2 a residuos de xilosa de cadena que presentan valores de desplazamiento químico que se corresponden con el de la unidad **X2R**. Este hecho indica que distintos fragmentos estructurales de xilosa de cadena sustituida en posición C-2 con sustituyentes diferentes dan lugar a señales de RMN indistinguibles.

Cabe destacar en la ampliación del espectro HSQC de **GBS** de la **Figura 2.59** se observa una señal muy intensa a 102,6 y 4,46 ppm correspondiente a las unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xilopiranosas de la cadena central (**X**), en coincidencia con el análisis por metilación realizado en la **sección 2.1.11** al producto reducido de la fracción **GBS**. La presencia de esta señal confirma la asignación realizada previamente.

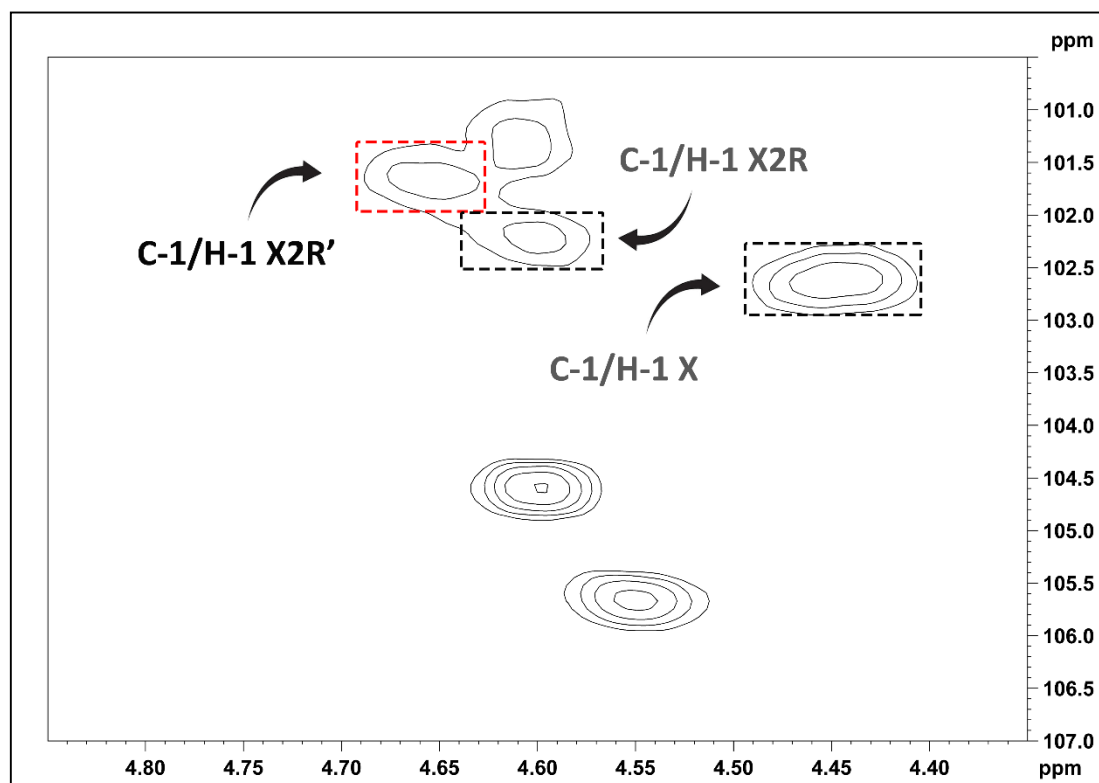
En resumen, las unidades de xilosa de cadena que presentan un sustituyente en posición C-2 (**X2R**) pueden estar sustituidas por unidades terminales de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico (**X2AG**), ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico (**X2AG4M**),  $\beta$ -D-xilopiranosas (**X2Xt**), unidades terminales/disacáridos de arabinofuranosas (**X2Af**) o un trisacárido conformado por 3 unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosas (**X2X24XtXt**).

#### **2.2.4.11 Asignación de señales de RMN de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2 con disacáridos de arabinopiranosas-(1 $\rightarrow$ 2)-ácido (4-O-Me)-glucurónico**

En la sección anterior se demostró que los desplazamientos químicos de las unidades de xilosa unidas por 2 y 4 no se modificaban con un abanico de sustituyentes. Sin embargo, del análisis profundo de los espectros se determinó que otros sustituyentes si podían modificar los desplazamientos químicos de las unidades de xilosa de cadena sustituidas en la posición C-2, dando lugar a señales distintas a las identificadas para la unidad **X2R**.

Observando la ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC del producto **GBRHD** (ver **Figura 2.55** y **2.60**) se aprecia una señal a 101,6 y 4,66 ppm. Al igual que la señal perteneciente a la correlación C-1/H-1 de la unidad **X2R**, esta señal se encuentra presente en el espectro HSQC de **GB** y todos los espectros obtenidos de los productos modificados obtenidos (**Figura 2.26**), a excepción del espectro HSQC correspondiente a **GBS** (**Figura 2.59**).





**Figura 2.60.** Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC del producto **GBRHD**. La señal marcada en **rojo** se corresponde con la correlación C-1/H-1 la unidad **X2R'**.

Además de los sustituyentes de la xilosa de la cadena central descritos anteriormente, en la **sección 2.2.4.5** se describió la existencia de disacáridos compuestos por  $\alpha$ -L-arabinopiranososa enlazada a la posición C-2 de residuos de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico, los cuales se ubicaban según el análisis por metilación como cadenas laterales de la cadena central de xilosas.

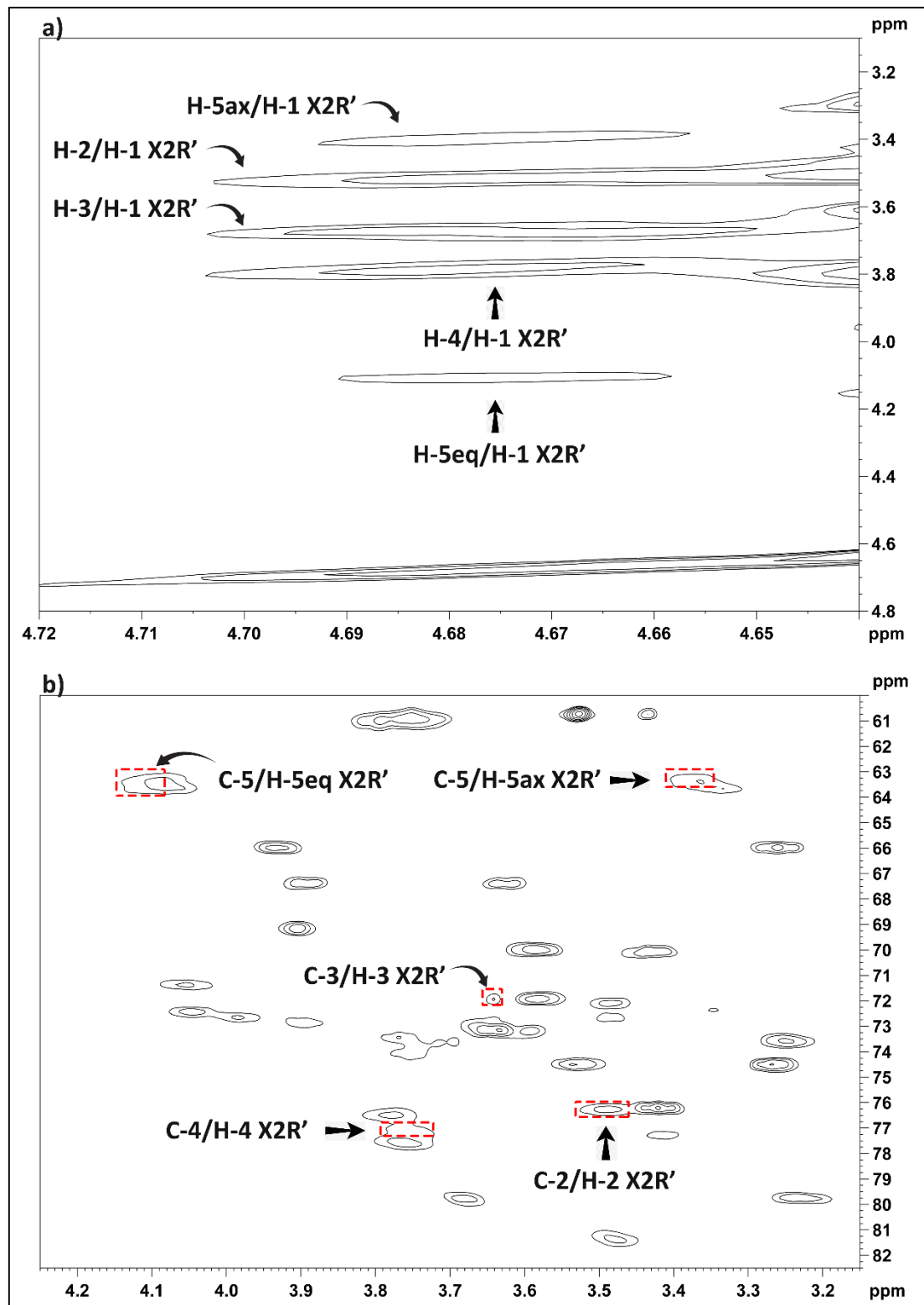
Peña *et al.*<sup>64</sup> realizaron un estudio estructural extenso sobre xilanos extraídos en medio alcalino de las paredes celulares de distintas especies de plantas monocotiledóneas, fundamentalmente del orden Commelinidae. En dicho estudio describieron que estos polisacáridos presentan una cadena central de unidades de (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-xilopiranososa, algunas de las cuales se encontraban sustituidas en posición C-2 por disacáridos de  $\alpha$ -L-arabinopiranososa-(1 $\rightarrow$ 2)-ácido (4-O-metil)- $\alpha$ -D-glucurónico. Dichas unidades de xilosa daban origen a una señal anomérica con un desplazamiento químico de 101,3 y 4,69 ppm. Con esta información y los datos recolectados del análisis de los espectros de RMN, la señal observada a 101,6 y 4,66 ppm en el espectro de la **Figura 2.60** se asignó a unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-

xilopiranososa sustituida en posición 2 con los disacáridos **Ap-AG2Ap/ Ap-AG4M2Ap**. Esta unidad de xilosa fue identificada como **X2R'** ya que claramente sus señales anoméricas difieren de las unidades **X2R** presentadas en la sección anterior (ver **Figura 2.82**).

En la **Figura 2.61 a)** se muestra una ampliación del espectro TOCSY del producto **GBRHD** donde se indican todas las señales de correlación entre el H-1 de la unidad **X2R'** y el resto de los hidrógenos. Con esa información, en conjunto con lo reportado por Peña *et al.*<sup>64</sup>, se pudieron asignar los carbonos correspondientes a dichos hidrógenos. En la imagen b) de la **Figura 2.61** se muestra una ampliación del espectro de RMN del mismo producto con todas las correlaciones originadas por los C2-5/H2-5. La asignación completa de la unidad **X2R'** se encuentra en la **Tabla 2.32** donde se muestran también a modo comparativo los valores de desplazamientos químicos encontrados para las unidades de xilosa de cadena **X2R** y **X**. Todas la señales observadas en los espectros de RMN del producto reducido **GBRHD** se encuentran en los espectros correspondientes de los productos no reducidos **GBHD** y **GBD** y en los espectros de la fracción original **GB**, aunque en este último caso con un mayor grado de superposición con otras señales.

**Tabla 2.32.** Desplazamientos químicos (en ppm) de las señales correspondientes a la unidad de xilosa de cadena sustituida en posición C-2 con los disacáridos **Ap-AG2Ap / Ap-AG4M2Ap** (unidad **X2R'**) y de las unidades **X2R** y **X**.

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
→2,4)-β-D-Xilp-(1→ <b>(X2R')</b>	101,6 4,66	76,5 3,52	72,0 3,65	77,2 3,78	63,5 4,11;3,37
→2,4)-β-D-Xilp-(1→ <b>(X2R)</b>	102,2 4,61	77,2 3,41	73,2 3,59	76,4 3,78	63,5 4,11;3,37
→4)-β-D-Xilp-(1→ <b>(X)</b>	102,6 4,46	73,6 3,26	74,5 3,55	77,1 3,77	63,5 4,11; 3,36

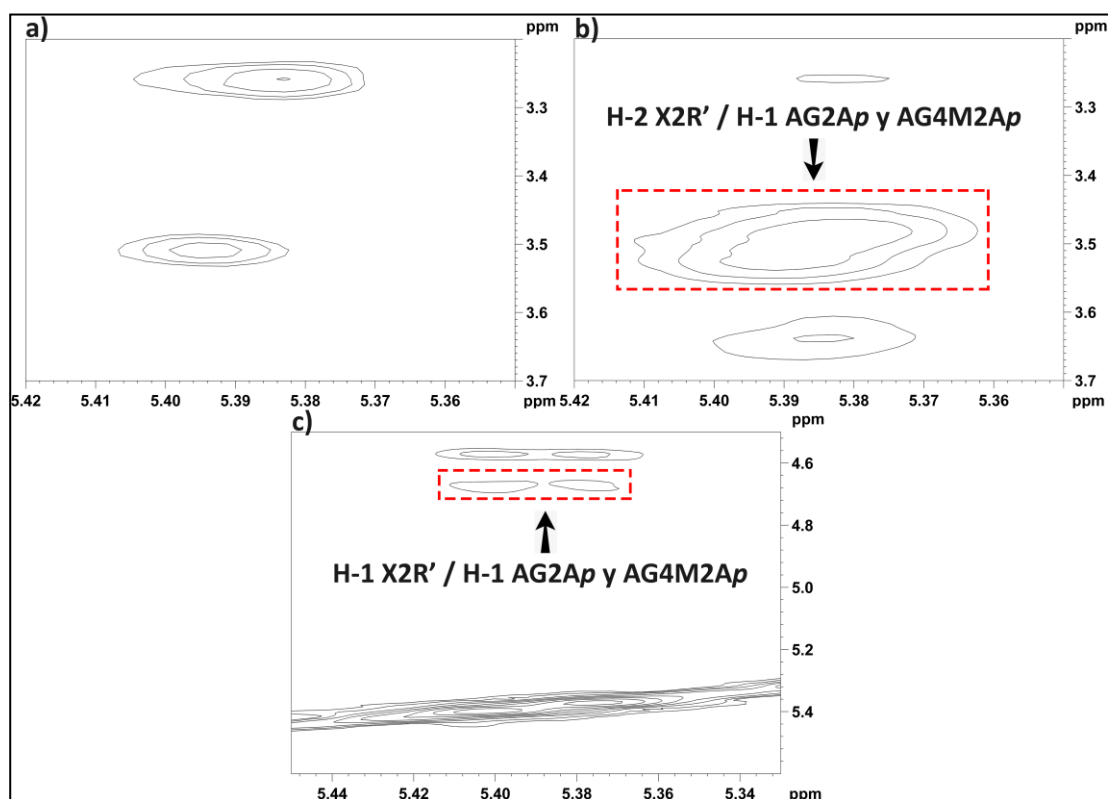


**Figura 2.61.** Ampliaciones de los espectros de RMN del producto **GBRHD** a) TOCSY y b) HSQC. Las señales marcadas en **rojo** en el espectro b) se corresponden con las correlaciones C2-5/H2-5 de la unidad de xilosa de cadena sustituida en posición 2 X2R'.

Si se comparan los valores de desplazamientos químicos correspondientes a las unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xilopiranosas de la cadena central se observa que la presencia de un sustituyente en posición C-2 afecta especialmente a los desplazamientos del C-2 y H-2. Específicamente, la diferencia que se observa en el valor correspondiente al H-2 (3,26 ppm unidad **X**; 3,41 ppm unidad **X2R**; 3,52 ppm unidad **X2R'**), fue fundamental para poder identificar y asignar las señales en los espectros TOCSY.

Analizando las unidades **X2R** y **X2R'** se desprende que la identidad de la ramificación enlazada en la posición 2 puede afectar los valores de los desplazamientos químicos de las señales originadas en estas unidades. Como fue analizado previamente, los  $\delta$  de las señales de las unidades de xilas sustituidas en posición 2 eran indistinguibles si el sustituyente **R** presente en la unidad **X2R** eran residuos terminales de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico, ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico, disacáridos de L-arabinofuranosas, unidades terminales de xilosa y trisacáridos de xilosa. Sin embargo, si la cadena lateral enlazada a esta posición son disacáridos de  $\alpha$ -L-arabinopiranosas-(1 $\rightarrow$ 2)-ácido (4-O-metil)- $\alpha$ -D-glucurónico, los desplazamientos químicos son lo suficientemente diferentes como para poder identificar un conjunto de señales distintas asociadas a ese fragmento estructural.

En los espectros NOESY de los distintos productos, incluyendo **GB**, se encontraron señales de correlación entre protones pertenecientes a los ácidos urónicos **AG2Ap** y **AG4M2Ap** y la unidad de xilosa de cadena **X2R'**. En la **Figura 2.62** se muestran ampliaciones de los espectros de RMN a) TOCSY y b) y c) NOESY del producto hidrolizado y desacetilado **GBHD**. Comparando las ampliaciones de la parte superior se aprecia que en el espectro de NOESY de dicho producto aparece una señal de correlación entre los H-1 de las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap** con desplazamientos químicos de 5,38-5,40 ppm y un protón con desplazamiento químico de 3,52 ppm que corresponde con el H-2 de la unidad **X2R'**.



**Figura 2.62.** Ampliaciones de los espectros de RMN a) TOCSY y b) y c) NOESY de la fracción hidrolizada y desacetilada **GBHD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden a acoplamiento NOE entre hidrógenos de la unidad **X2R'** y las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap**.

En la ampliación del espectro NOESY de la **Figura 2.62 c)** se pueden apreciar dos señales con desplazamiento químico a 4,66/5,38 ppm y 4,66/5,40 ppm que surgen de la correlación entre el H-1 de la unidad **X2R'** y los H-1 de las unidades **AG2Ap** y **AG4M2Ap** respectivamente. Además de las señales mostradas en la figura anterior se encuentran correlaciones entre el H-1 de estas unidades e hidrógenos que posiblemente sean los H-3 y H-5eq de la unidad **X2R'**, que presentan un desplazamiento químico de 3,65 y 4,11 ppm.

Toda esta información espectral adicional confirma la asignación estructural realizada.

### 2.2.4.12 Asignación de señales de RMN de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-3 con ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico

En el análisis por metilación presentado en la **sección 2.1.6** se determinó que existen residuos de xilosa con un sustituyente en posición C-3 dado que se encontró el derivado de 2-O-metilxilosa en cantidades apreciables. Además, en las **secciones 2.2.4.6** y **2.2.4.7.2** se describió que en los polisacáridos de la goma brea existen unidades de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales cuyos desplazamientos químicos indicaban que se encuentran enlazados a la posición 3 de unidades de xilopiranosas de la cadena central.

En bibliografía<sup>58,59,100,104,111</sup> se encontraron reportes de distintos tipos de xilanos que presentan xilosas de la cadena central con un sustituyente en posición C-3. Simas-Tosin *et al.*<sup>104</sup> caracterizaron glucuronoarabinoxilanos aislados de *Ananas comosus* mediante la obtención de oligosacáridos por hidrólisis ácida e informaron los valores de desplazamientos químicos de residuos de xilopiranosas sustituidas con ácido  $\alpha$ -D-glucurónico en la posición 3. Höjje *et al.*<sup>65</sup> realizaron un estudio de glucuronoarabinoxilanos extraídos de cáscara de cebada y reportaron los desplazamientos químicos de unidades de xilosa de la cadena central sin sustituir (**G**) y sustituidas en la posición 3 con unidades terminales de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (**F**) o disacáridos del tipo  $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ) (**H**). En la **Tabla 2.33** se muestran los desplazamientos químicos que informaron para estas unidades. El resto de los antecedentes encontrados en reportes anteriores son de fragmentos similares a lo informado por Höjje *et al.*<sup>65</sup>.

**Tabla 2.33.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales originadas en distintas unidades de xilosa de cadena reportadas por Höjje *et al.*<sup>65</sup>

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) <b>G</b>	102,9 4,49	74,2 3,34	75,1 3,58	77,4 3,80	64,4 4,13;3,41
$\rightarrow$ 3,4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) <b>F</b>	102,9 4,53	74,4 3,48	78,9 3,75	75,0 3,88	64,4 4,16; ND <sup>a</sup>
$\rightarrow$ 3,4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) <b>H</b>	102,8 4,47	74,2 3,32	ND 3,58	ND 3,77	66,6 4,08; ND

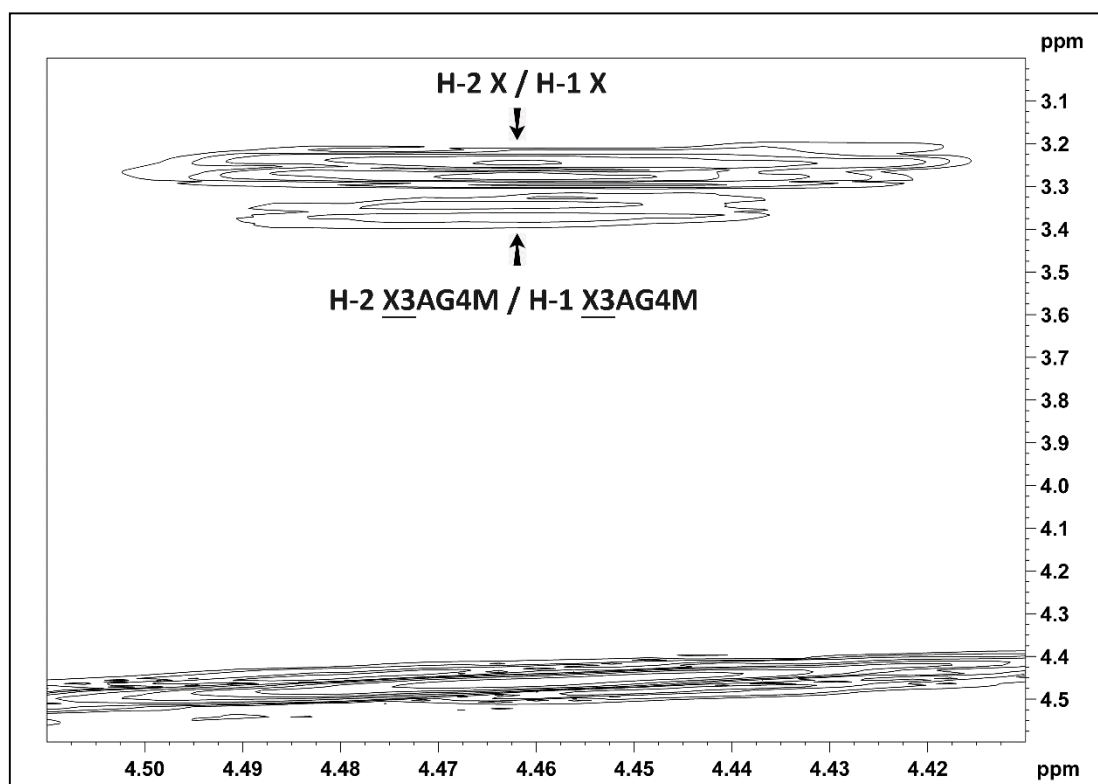
<sup>a</sup>ND: No determinado

En la tabla anterior (al igual que en todos los reportes<sup>58,59,100,104,111</sup> encontrados) se observa que los desplazamientos químicos del par anomérico C-1/H-1 de las unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-3 son muy similares a los  $\delta$  de los residuos de  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  sin sustituir. Sin embargo, las señales originadas por el C-3 y en menor medida por el H-3, se encuentran desplazados hacia campos más bajos respecto de los correspondientes a las unidades de xilosa sin sustituir.

Debido a la coincidencia en los valores de desplazamiento químico de los C-1/H-1 con las unidades de xilosa de cadena sin sustituir **X** y a la alta complejidad de los espectros, la asignación de las señales originada en las unidades  $\rightarrow 3,4$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  resultó muy compleja.

Para realizar dicha asignación de las señales de la mencionada unidad resultaron de especial utilidad los espectros COSY. En la **Figura 2.63** se muestra una ampliación del espectro COSY del producto **GBRHD** donde se observan dos señales a 4,46/3,26 ppm y 4,46/3,36 ppm que surgen de la correlación de protones anoméricos y sus vecinos en posición 2. La presencia de dos señales indica que existen dos H-1 originados en unidades distintas que correlacionan con dos H-2 distintos ya que poseen diferente desplazamiento químico. La señal de correlación 4,46/3,26 ppm se corresponde con los H-1 y H-2 de la unidad X, mientras que como se verá en detalle posteriormente, la señal a 4,46/3,36 ppm es originada por la correlación de los H-1 y H-2 de una unidad de xilosa sustituida en posición 3 con ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico. Esta unidad de xilosa fue identificada como **X3AG4M**, ver **Figura 2.83**.

Debido a la coincidencia en el valor de desplazamiento químico del H-1 entre las unidades de xilosa sustituidas en posición 3 (**X3AG4M**) y de cadena sin sustituir (**X**) y a que éstas últimas se encuentran en una proporción mucho mayor, la identificación y asignación de las señales correspondientes a la unidad sustituida fue muy compleja. Ante esta superposición de señales, se trabajó con los espectros TOCSY buscando las correlaciones correspondientes al H-2 de la unidad **X3AG4M** que posee un  $\delta$  de 3,36 ppm.



**Figura 2.63.** Ampliación del espectro COSY del producto **GBRHD** donde se muestran las señales de correlación entre protones anoméricos y los H-2 de las unidades **X3AG4M** y **X**.

En la **Figura 2.64** se muestra en a) una ampliación del espectro TOCSY del producto **GBRD** donde se marcan todas las señales de correlación entre el H-2 y el resto de los hidrógenos de la unidad **X3AG4M**. Cabe destacar que el desplazamiento químico del H-5ax es idéntico al originado por el H-2, razón por la cual no se observa una señal con dicho protón en la figura. En la imagen b) se muestra una ampliación del espectro HSQC del producto **GBHD** donde se aprecian todas las señales correspondientes a los C2-5/H2-5 del residuo.

Como en todos los casos anteriores, se constató la presencia de estas señales en los espectros de RMN obtenidos de la fracción original **GB**. La asignación completa de la unidad de xilosa sustituida en posición 3 **X3AG4M** se muestra en la **Tabla 2.34** en comparación con los resultados encontrados para la unidad **X**.



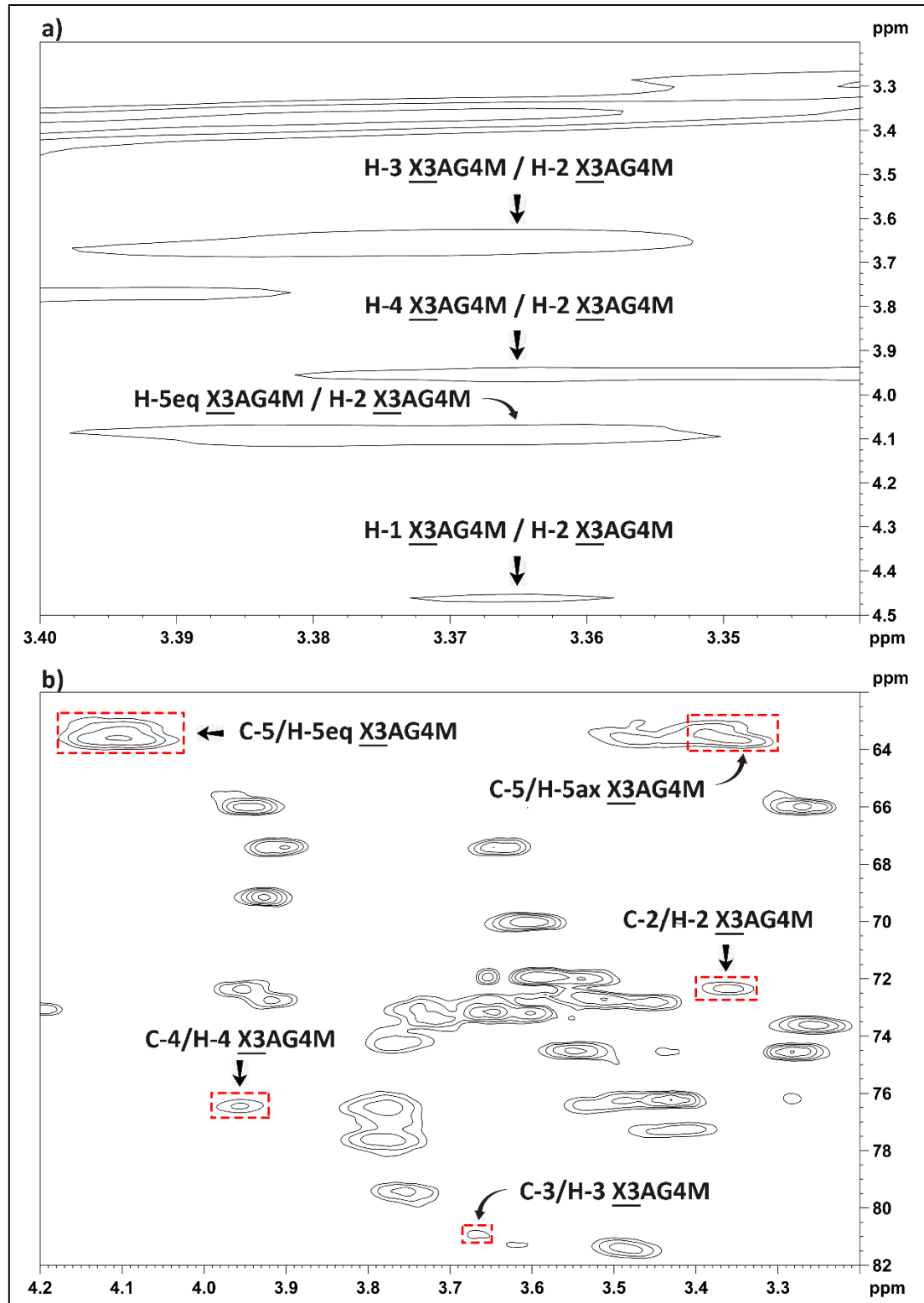


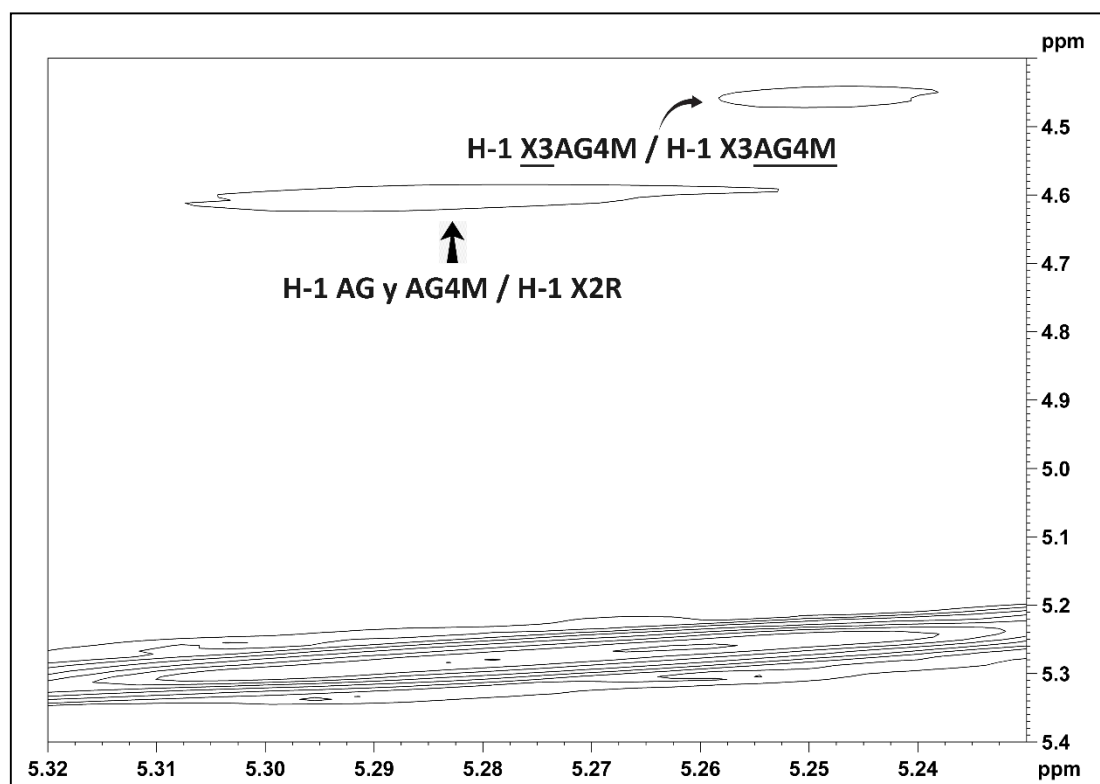
Figura 2.64. a) Ampliación del espectro TOCSY del producto GBRD. b) Ampliación del espectro HSQC del derivado GBHD. Las señales marcadas en rojo se corresponden con las correlaciones C2-5/H2-5 de la unidad X3AG4M.

**Tabla 2.34.** Desplazamiento químico (en ppm) de las señales originadas en las unidades de  $\beta$ -D-xilosa de cadena sustituidas en posición C-3 con ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico (**X3AG4M**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5eq/H-5ax
$\rightarrow$ 3,4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ( <b>X3AG4M</b> )	102,6	72,3	80,8	76,3	63,5
	4,46	3,36	3,65	3,96	4,09; 3,36
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ( <b>X</b> )	102,6	73,6	74,5	77,1	63,5
	4,46	3,26	3,55	3,77	4,11; 3,36

Comparando los valores de desplazamientos químicos entre las unidades **X** y **X3AG4M** se aprecia que los mismos tienen un alto grado de similitud. Sin embargo, existen diferencias puntuales muy importantes como en el desplazamiento químico de la posición sustituida C-3 que está corrido 6,3 ppm a campos más bajos en la unidad sustituida **X3AG4M**, en coincidencia con lo reportado en bibliografía.

Además de lo discutido previamente por los resultados del análisis por metilación y la coincidencia entre los valores de desplazamientos químicos encontrados tanto para las unidades de  $\beta$ -D-xilosa **X3AG4M** y de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico **X3AG4M** con lo informado en los antecedentes bibliográficos, se encontraron evidencias espectrales en experimentos NOESY. En la **Figura 2.65** se muestra una ampliación de la zona anomérica del espectro NOESY del producto **GBHD** donde se aprecia una señal de acoplamiento con desplazamiento químico a 4,46/5,25 ppm originada por los H-1 de las unidades **X3AG4M** y **X3AG4M**. También se encontraron señales de correlación entre el H-1 de la unidad **X3AG4M** y otros hidrógenos con desplazamientos químicos de 4,09, 3,96, 3,65 originadas en los H-5eq, H-4 y H-3 de la unidad de xilosa **X3AG4M** respectivamente. Estas evidencias espectrales confirman las asignaciones previamente realizadas.

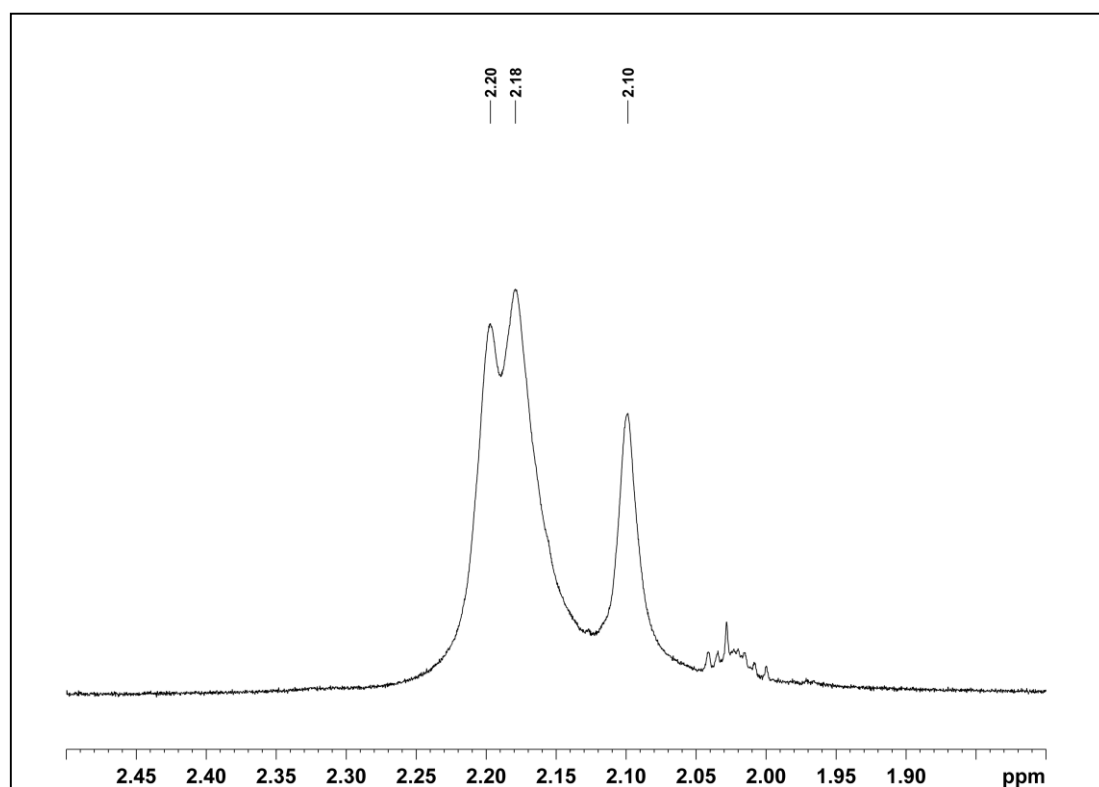


**Figura 2.65.** Ampliación del espectro NOESY del producto **GBHD** donde se muestra una señal de correlación entre el H-1 de los residuos de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazados en posición 3 y el H-1 de unidades de xilosa (**X3AG4M**).

### 2.2.4.13 Señales de RMN correspondientes a los grupos acetilo

Como se introdujo anteriormente en la **sección 2.2.2**, en distintos espectros de RMN de los polisacáridos de la goma brea se pueden apreciar señales que son originadas por los grupos acetilo. En las **Figura 2.66, 2.67 y 2.68** se muestran ampliaciones de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC y HMBC de la fracción **GB** donde se pueden apreciar las señales originadas de estos grupos.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **GB** se pueden apreciar 3 señales con  $\delta = 2,20, 2,18$  y  $2,10$  ppm que son originadas por los hidrógenos metílicos de los grupos acetilo. La presencia de estas tres señales indica que los mismos se encuentran en al menos tres entornos químicos diferentes.



**Figura 2.66.** Ampliación del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de la fracción **GB**, donde se muestran los hidrógenos metílicos de los grupos acetilo.

Por otro lado, en las ampliaciones mostradas en la **Figura 2.67** del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observan dos pares de señales con desplazamientos químicos de 21,5, 21,9, 173,9 y

174,4 ppm que se corresponden con los carbonos de los metilos y de los carbonilos de los grupos acetilo respectivamente.

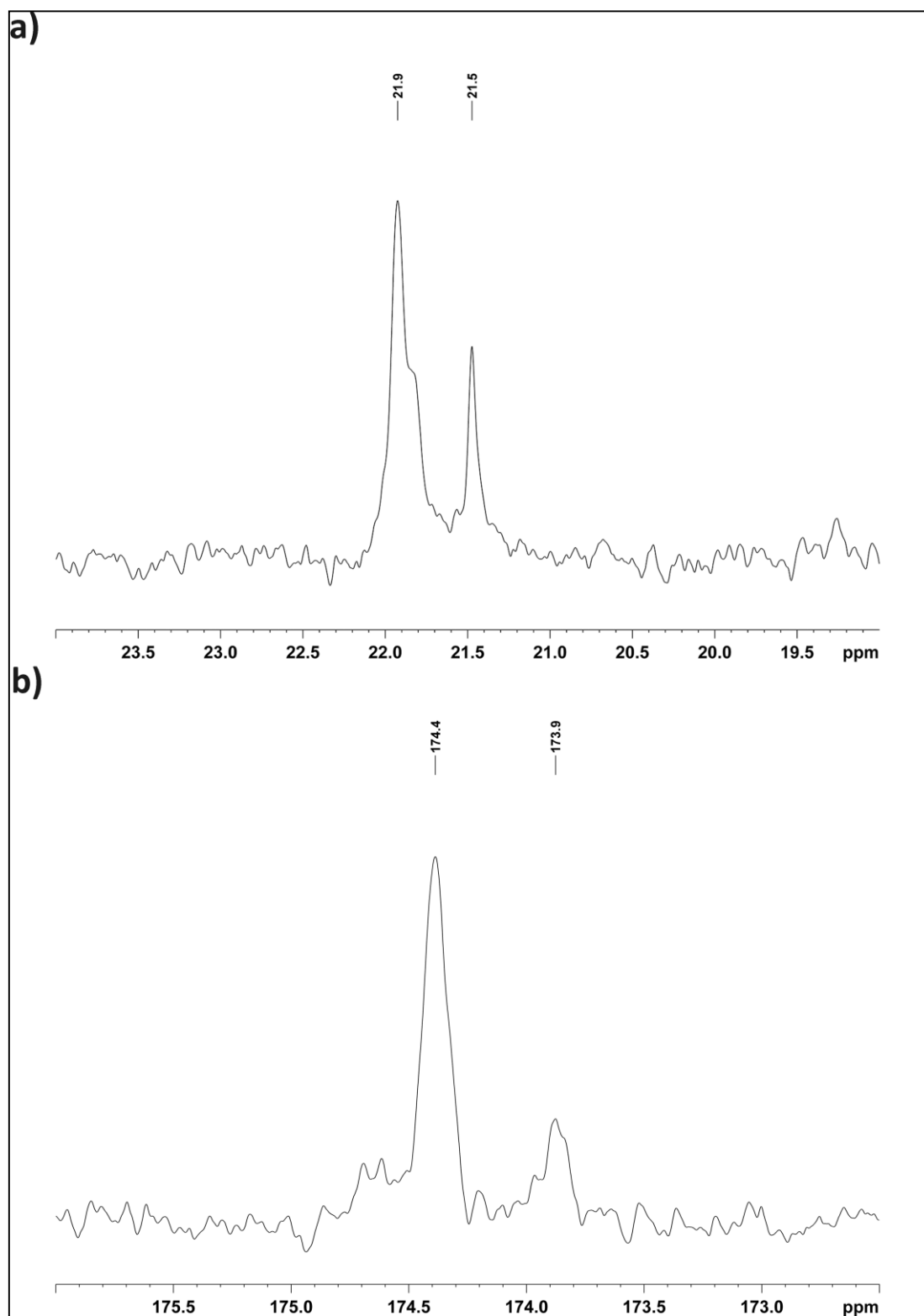
La asociación de los H y C de los grupos metílicos pueden observarse claramente en la ampliación del espectro HSQC correspondiente a la fracción **GB (Figura 2.68)**, donde se aprecia que dos de los grupos de hidrógenos metílicos se encuentran unidos a carbonos cuyas señales aparecen a desplazamiento similares. Como se mencionó anteriormente la utilización de espectros HMBC fue limitada dada la baja calidad de los mismos, sin embargo resultaron de suma utilidad para relacionar las señales originadas en los grupos carbonilos de los acetilos y sus respectivos grupos metilos. La asignación completa de las señales originadas por estos grupos se presenta en la **Tabla 2.35**.

**Tabla 2.35.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales originadas en los grupos acetilo

Desplazamiento químico de los grupos acetilo (ppm)			
	CH <sub>3</sub>		
C		H	C=O
21,5		2,10	173,9
21,9		2,18	174,4
21,9		2,20	174,4

La existencia de tres conjuntos de señales pertenecientes a los hidrógenos metílicos indica que existen al menos tres entornos químicos distintos para los grupos acetilo. Si se incorporan al análisis los desplazamientos químicos de los carbonos de esos metilos y de los carbonos de los carbonilos, se puede apreciar que dos de estos conjuntos de señales presentan valores de  $\delta$  idénticos para los carbonos y muy similares para los protones. Este hecho indicaría que estos dos conjuntos de señales estén originados en grupos acetilo que se encuentran en fragmentos estructurales similares. En cambio el tercer grupo de señales presenta diferencias más marcadas en sus  $\delta$  tanto en los carbonos como en los protones, indicando que se encuentra en un entorno químico distinto.

Como se analizó anteriormente, la fracción **GB** posee un 2,6 % de grupos acetilo. Teniendo en cuenta la cantidad de carbohidratos presentes en dicha fracción (75 %) y la proporción de los mismos que pertenecen a unidades de xilosa de la cadena central, se puede estimar que en los polisacáridos de goma brea se encuentra un grupo acetilo por cada 4 unidades de xilosa de cadena.



**Figura 2.67.** Ampliaciones del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la fracción **GB**. En a) se muestran los carbonos de los metilos de los grupos acetilo. En b) se observan los carbonos de los carbonilos de dichos grupos.

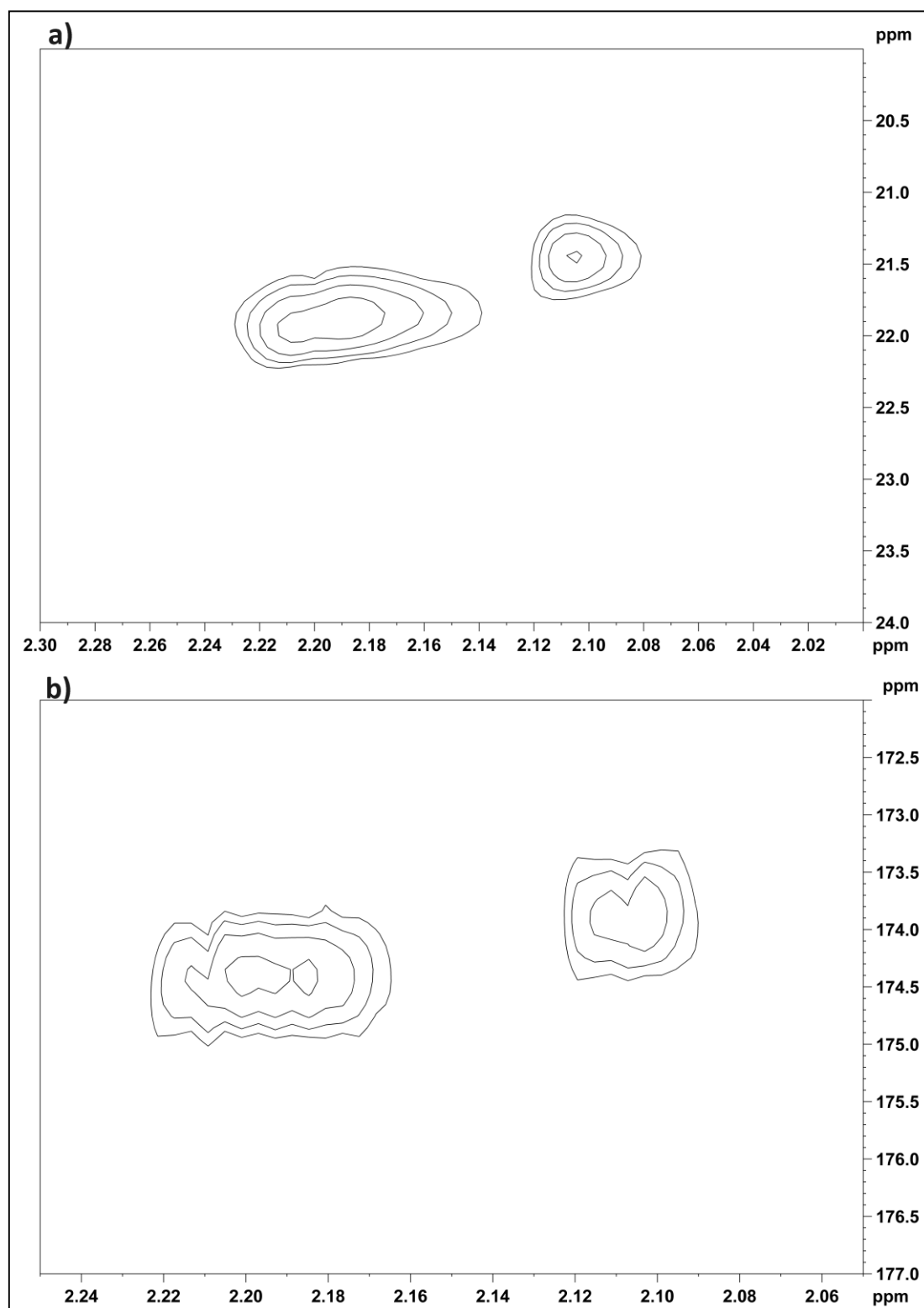


Figura 2.68. Ampliaciones de los espectros a) HSQC y b) HMBC de la fracción GB.

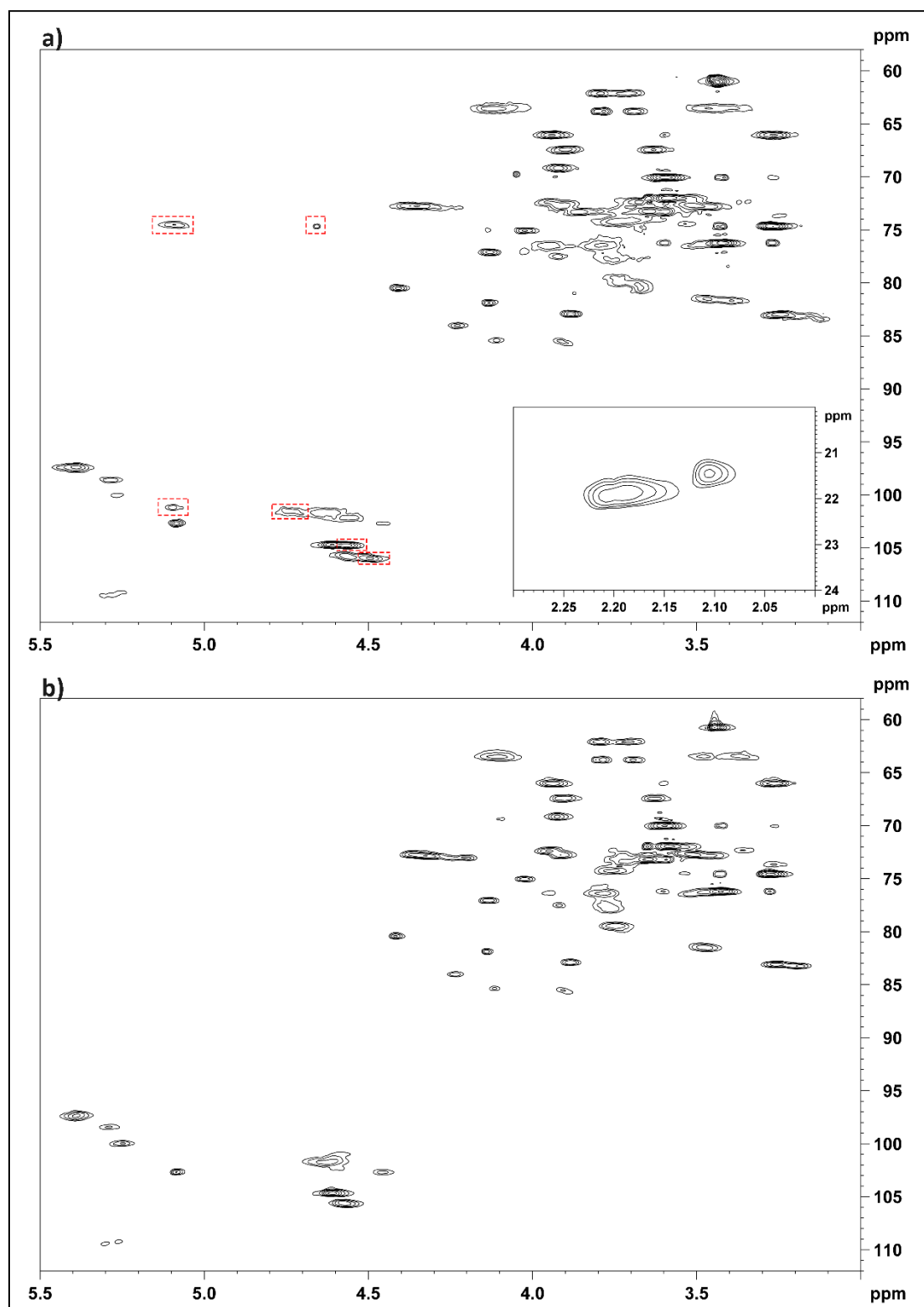
#### 2.2.4.14 Asignación de señales de RMN de unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2 y acetiladas en posición O-3

Como se mencionó anteriormente, la existencia de grupos acetilo en los polisacáridos de la goma brea complejiza sus espectros de RMN ya que su presencia genera diferentes entornos químicos y en consecuencia se observa un número importante de señales originadas en estas unidades y que hasta el momento no han sido analizadas ya que no se encuentran en los espectros de los productos desacetilados. Las características estructurales descritas en las secciones anteriores en cuanto a conectividad y ubicación de los residuos por supuesto se mantienen y de hecho se utilizaron para poder determinar la posición de estos grupos en los polisacáridos originales provenientes de la fracción **GB**.

Las señales de RMN originadas en residuos cuyos desplazamientos químicos son afectados por los grupos acetilo se pueden dividir en dos grupos. Por un lado, se pueden identificar las señales que se corresponden con las unidades a las cuales estos grupos se encuentran directamente unidos, donde se pueden apreciar grandes cambios en los desplazamientos químicos. Un segundo grupo de señales son aquellas pertenecientes a residuos que se encuentran cercanos a estos grupos y por lo tanto algunas de sus señales presentan ligeros corrimientos.

Lógicamente, el primer análisis se realizó comparando los espectros HSQC de la fracción **GB** y el de su producto desacetilado **GBD** (**Figura 2.69**, espectros a) y b) respectivamente). A simple vista se puede apreciar en el espectro HSQC de la fracción **GB** tanto en la zona anomérica como en la región de desplazamientos químicos típica de C2-5/H2-5, un conjunto de señales que no se encuentra en el espectro correspondiente al producto desacetilado. En particular, puede observarse que existen dos señales con desplazamientos químicos altos para protones no anoméricos de 74,5/5,06-5,09 ppm y 74,6/4,66 ppm, siendo la primera de estas señales mucho más intensa que la segunda.





**Figura 2.69.** Espectros HSQC de a) la fracción **GB** y b) del producto **GBD**. Las señales marcadas en **rojo** pertenecen a las unidades cuyos desplazamientos químicos se encuentran influenciados directamente por la presencia de grupos acetilo.

Se han encontrado numerosos antecedentes bibliográficos<sup>56,57,106,107,116,132</sup> de glucuronoxilanos que presentan grupos acetilos enlazados en las posiciones 2, 3 y/o 2,3 de las unidades de xilosa que conforman la cadena central de estos polisacáridos. Algunas de estas unidades de xilosa se encuentran además sustituidas con ácido  $\alpha$ -D-glucurónico o ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico en la posición C-2. Los desplazamientos químicos de las posiciones sustituidas por grupos acetilos de las unidades de xilosa presentan valores típicos entre 73,5 y 76 ppm para carbono y 4,65 a 5,15 ppm para hidrógeno, dependiendo de la ubicación de estos grupos y la presencia o no de unidades de ácido glucurónico como sustituyentes.

En un trabajo publicado en 2003, Evtuguin *et al.*<sup>106</sup> caracterizaron un heteroxilano acetilado extraído de la madera del árbol *Eucalyptus globulus*. En la **Tabla 2.36** se muestran los desplazamientos químicos reportados en dicho trabajo para distintas unidades de xilosa que presentan en su mayoría un grupo acetilo en posición 2 y/o 3. Si bien se pueden encontrar algunas pequeñas diferencias, estos resultados se encuentran en gran concordancia con lo informado en otras publicaciones<sup>56,57,106,107,116,132</sup>.

**Tabla 2.36.** Desplazamientos químicos (ppm) de distintas unidades de xilosa de cadena acetiladas (informados por Evtuguin *et al.*<sup>106</sup>).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5eq/H-5ax
→4)-2-O-Ac-β-D-Xilp-(1→	101,0	74,5	72,5	77,2	63,8
	4,67	4,68	3,80	3,86	4,16;3,44
→4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→	102,5	72,0	76,3	76,5	63,8
	4,58	3,49	4,98	3,93	4,13;3,48
→4)-2,3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→	100,4	74,6	76,0	78,2	63,8
	4,79	4,82	5,14	4,05	4,20;3,53
→2 <sup>b</sup> ,4)-β-D-Xilp-(1→	101,9	77,4	73,3	77,2	ND <sup>a</sup>
	4,66	3,52	3,70	3,84	ND;ND
→2 <sup>b</sup> ,4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→	102,0	76,0	76,1	77,0	63,7
	4,73	3,69	5,05	3,98	4,14;3,48

<sup>a</sup> ND = No determinado

<sup>b</sup> Unidades de β-D-xilosa sustituida en posición C-2 con ácido (4-O-Me)-α-D-glucurónico

Como se puede observar en la tabla anterior, la presencia de un grupo acetilo enlazado directamente a una unidad de β-D-xilosa de un xilano con uniones 1→4 genera corrimientos importantes hacia campos bajos en las señales de estas unidades, fundamentalmente en las

originadas en los hidrógenos de la posición de sustitución, siendo el corrimiento para el H-3 mayor que para H-2.

Si se comparan las señales pertenecientes a los residuos de  $\rightarrow 2,4$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  sustituidos en posición C-2 con ácido (4-O-Me)- $\alpha$ -D-glucurónico, se puede apreciar que la presencia de un grupo acetilo en posición O-3 de la xilosa provoca cambios en los desplazamientos químicos tanto de las señales correspondientes a los carbonos como a los hidrógenos. Puede apreciarse que el H-1 de la unidad 3-O-acetilada se corre hacia campos más bajos. Además, se observa que la señal originada en el H-3 de esta unidad se encuentra en 5,05 ppm, el cual es un valor muy alto en relación a los valores típicos de las señales de los H-3 de las unidades de xilosa. En particular, este desplazamiento químico informado para la señal de esta unidad acetilada en posición O-3 es muy similar al que presentan las señales encontradas a  $\delta$  de 74,5/5,06-5,09 ppm en el espectro HSQC de la fracción **GB**. Asimismo, cabe destacar que la señal con desplazamientos químicos de 74,6/4,66 ppm presente en dicho espectro HSQC de **GB** presenta valores muy similares al de la unidad de  $\rightarrow 4$ )-2-O-Ac- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  mostrada en la tabla anterior.

Por otro lado, Dahlman *et al.*<sup>56</sup> y Uhliaríková *et al.*<sup>57</sup> en trabajos publicados en 2000 y 2013 sobre glucuronoxilanos acetilados extraídos de la madera de los árboles *Populus tremula* (álamo) y *Betula pendula* (abedul) respectivamente, reportaron los desplazamientos químicos de las señales originadas en los metilos y carbonilos de los grupos acetilos en función de su sitio de unión a la xilosa y el entorno químico en esos polisacáridos. En ambos casos informaron valores de  $\delta$  de las señales de los hidrógenos metílicos entre 2,11-2,21 ppm y 21,0-22,0 ppm para sus respectivos carbonos, siendo los más altos los correspondientes a los grupos acetilo unidos en posición C-3 de residuos de  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  con respecto a los enlazados en posición C-2.

Especialmente desplazados a mayores  $\delta$  se encuentran las señales de aquellos grupos acetilo unidos a residuos de xilosa que se encontraban además sustituidos en posición C-2 con una unidad de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico. En el trabajo de Uhliaríková *et al.*<sup>57</sup> informaron además el desplazamiento químico de los carbonos de los carbonilos, los cuales serán analizados posteriormente.

Las señales con desplazamientos químicos de 74,5/5,06-5,09 ppm resultaron diagnósticas para confirmar la existencia de unidades de xilosa acetiladas. Sin embargo, el análisis de los espectros TOCSY y NOESY resultó dificultoso ya que la señal del H-3 de la unidad 3-*O*-Ac- $\beta$ -D-Xilp coincide en su desplazamiento químico con el de otras unidades presentes en los polisacáridos de la goma brea. Como ya fue descrito anteriormente, el H-1 perteneciente a la unidad **Af $\beta$**  posee un desplazamiento químico de 5,08 ppm. Además, como se puede apreciar en el espectro HSQC de la fracción **GB** (ver **Figura 2.69**), existe una señal anómérica a 101,3 y 5,09 ppm que como se verá posteriormente en detalle, pertenece a un residuo de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminal que se encuentra influenciado por la presencia de un grupo acetilo en las cercanías. Por esta razón el espectro TOCSY de la fracción **GB** en esta zona de desplazamiento químico presenta una gran superposición de señales.

Para poder realizar un correcto análisis de las señales de RMN de las unidades de xilosa 3-*O* acetiladas, se trabajó con el espectro TOCSY del producto reducido y parcialmente hidrolizado **GBRH** ya que no presentaba superposición con otras señales. Esto se debe a que al hidrolizar la goma brea reducida en condiciones suaves se eliminan los residuos terminales de arabinofuranosas y en consecuencia desaparecen en el espectro TOCSY las señales de correlación con el H-1 a 5,08 ppm correspondiente a la unidad **Af $\beta$** . Además, por efecto de la reducción ocurre un desplazamiento de 0,15 ppm a campos más bajos en protón de la señal a 101,3 y 5,09 ppm presente en los espectros de **GB** (ver **Figura 2.50**).

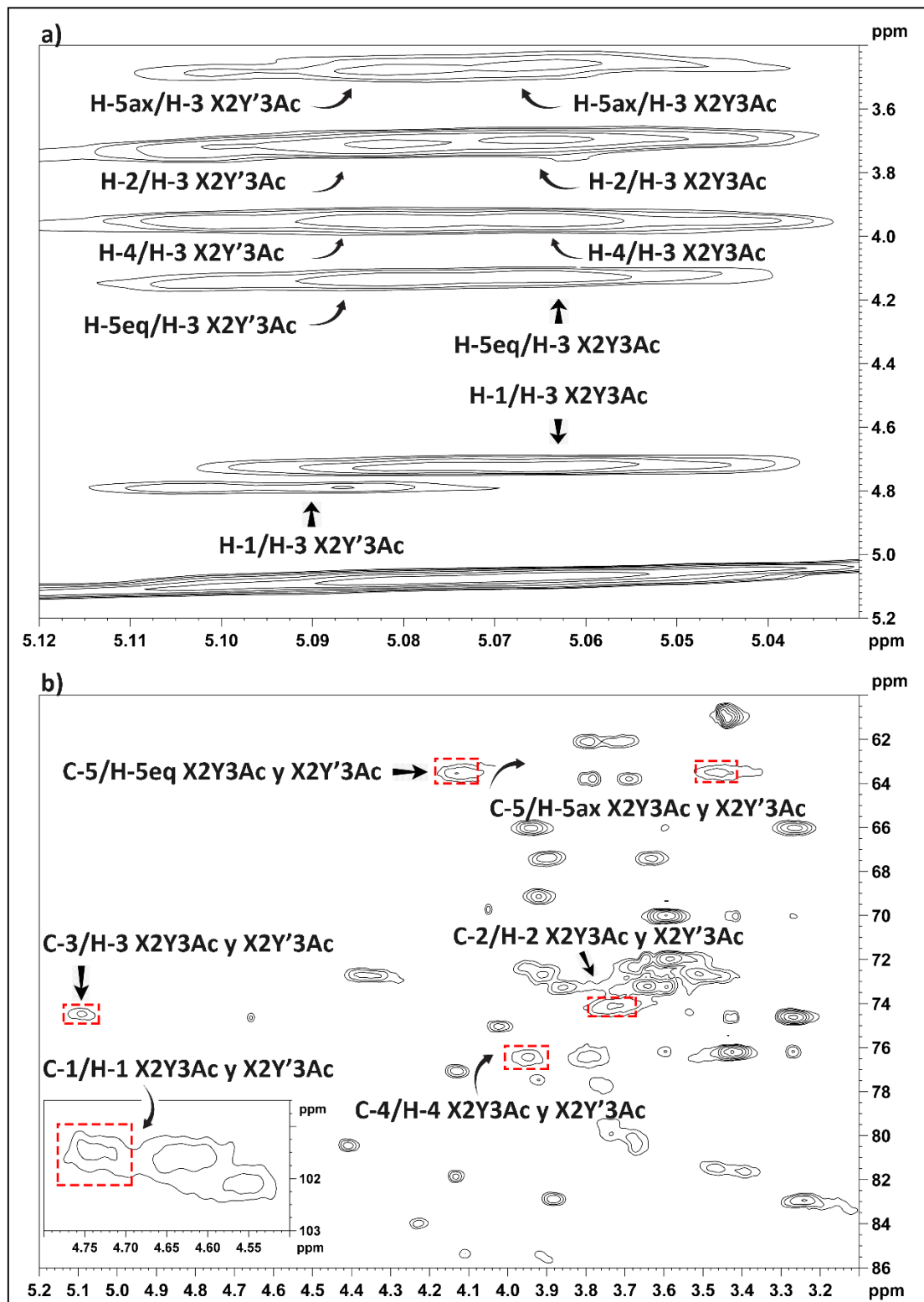
Con la información obtenida de espectros TOCSY y HSQC, en conjunto con los antecedentes bibliográficos mencionados<sup>56,57,106,107,116,132</sup>, se pudieron identificar dos unidades de xilosa de cadena sustituidas en posición C-2 con unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico o ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico, estructuralmente similares a las anteriormente descritas **X2R** y **X2R'** pero que presentan un grupo acetilo en la posición 3 (**X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac**, Y = **Ap-AG2Ap**; Y' = **Ap-AG4M2Ap**, ver **Figura 2.83**).

En la **Figura 2.70 a)** se muestra una ampliación del espectro TOCSY del producto **GBRH** donde se pudieron asignar e identificar todos los hidrógenos de las dos unidades acetiladas **X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac**. En el espectro b) correspondiente al HSQC de la fracción original **GB** se identifican todas las señales originadas en las correlaciones C1-5/H1-5 de dichas unidades. La asignación completa de cada unidad se presenta en la **Tabla 2.37**.

**Tabla 2.37.** Desplazamientos químicos (en ppm) de las señales correspondientes a las unidades de xilosa de cadena sustituida en posición C-2 y acetiladas en posición O-3 **X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac**.

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5eq/H-5ax
→2,4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→ ( <b>X2Y3Ac</b> )	101,5	74,1	74,5	76,5	63,5
	4,71	3,71	5,06	3,95	4,13;3,49
→2,4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→ ( <b>X2Y'3Ac</b> )	101,5	74,1	74,5	76,5	63,5
	4,75	3,71	5,09	3,95	4,13;3,49

Como se puede observar en los espectros TOCSY y HSQC de la **Figura 2.70** y en la tabla anterior, se pudieron identificar dos señales de xilosas sustituidas en posición 2 y acetiladas en posición 3 que presentan valores de desplazamientos químicos muy similares. De hecho, con la información provista por el espectro HSQC no pueden distinguirse y únicamente se pudo diferenciarlas por el espectro TOCSY. Las únicas diferencias encontradas fueron en el desplazamiento químico las señales de los H-1 y H-3 que se encuentran levemente desplazados hacia campos más bajos en la unidad **X2Y'3Ac** con respecto al residuo **X2Y3Ac**.



**Figura 2.70.** a) Ampliación del espectro TOCSY del producto **GBRH** y b) ampliaciones espectro HSQC de la fracción **GB**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con los C1-5/H1-5 de las unidades acetiladas **X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac**.

Cabe destacar que el valor de desplazamiento químico de los protones anoméricos de ambas unidades es muy similar al del HOD, lo que conlleva a que esa región de desplazamientos químicos en los espectros TOCSY presente una resolución muy pobre. Por ese motivo se mostraron los acoplamientos entre los H-3 y el resto de los hidrógenos pertenecientes a estas unidades ya que presentan una resolución mucho mejor.

En la **Tabla 2.38** se comparan las señales de las unidades **X2R** y **X2R'** con sus pares acetiladas **X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac**.

**Tabla 2.38.** Desplazamientos químicos (en ppm) de las unidades de xilosa de cadena sustituida en posición C-2 **X2R** y **X2R'** y acetiladas en posición O-3 **X2R3Ac** y **X2R'3Ac**.

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)				
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
→2,4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→ <b>(X2Y3Ac)</b>	101,5 4,71	74,1 3,71	74,5 5,06	76,5 3,95	63,5 4,13;3,49
→2,4)-β-D-Xilp-(1→ <b>(X2R)</b>	102,2 4,61	77,2 3,41	73,2 3,59	76,4 3,78	63,5 4,11;3,37
→2,4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→ <b>(X2Y'3Ac)</b>	101,5 4,75	74,1 3,71	74,5 5,09	76,5 3,95	63,5 4,13;3,49
→2,4)-β-D-Xilp-(1→ <b>(X2R')</b>	101,6 4,66	76,5 3,52	72,0 3,65	77,2 3,78	63,5 4,11;3,37

En primer lugar se puede apreciar que la presencia de un grupo acetilo en la posición 3 produce cambios en los desplazamientos químicos de manera diferenciada. En cuanto a los carbonos, los C-4 y C-5 muestran muy poca variación entre estas unidades. En cambio, los C-1, C-2 y C-3 presentan variaciones más importantes, fundamentalmente para el desplazamiento químico de los C-2 que presentan un corrimiento de 2,4 ppm y 3,1 ppm hacia campos más altos entre **X2R'-X2Y'3Ac** y **X2R-X2Y3Ac** respectivamente. Respecto a corrimientos en los hidrógenos, las mayores diferencias se observan en los desplazamientos químicos de los H-3 que presentan corrimientos de prácticamente 1,5 ppm hacia campos más bajos. Para ambos pares de unidades se observa asimismo un aumento de aproximadamente 0,1 ppm en el desplazamiento químico de los H-1.

#### 2.2.4.15 Asignación de señales de RMN de unidades de ácido $\alpha$ -D-glucurónico y de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazadas en posición 2 e influenciadas por grupos acetilo

En los espectros NOESY de distintos productos que conservan los grupos acetilo y de la fracción **GB** se encuentran evidencias espectroscópicas de los sustituyentes y que se encuentran enlazados a las unidades **X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac**.

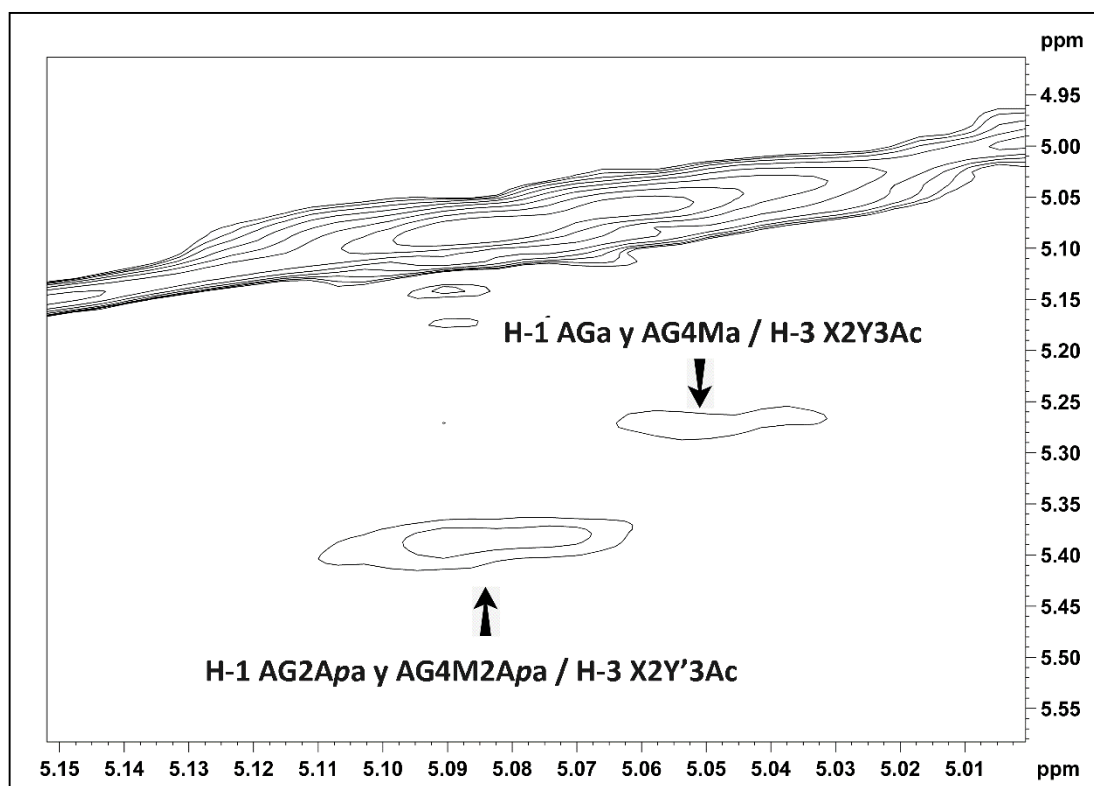
Para identificar los sustituyentes Y fue especialmente importante la utilización de los espectros NOESY de los productos acetilados y desacetilados. En la **Figura 2.71** se muestra a modo de ejemplo una ampliación del espectro NOESY del producto hidrolizado **GBH** en la zona de desplazamientos químicos entre 5,00 y 5,15 ppm donde se observan dos señales a 5,27/5,06 ppm y 5,38-5,40/5,09 ppm, las cuales además no aparecen en los espectros de los productos desacetilados. Como se verá a continuación, se dedujo que estas señales surgían de la correlación entre los H-3 de las xilosas acetiladas y los H-1 de los residuos de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico.

Los valores de desplazamientos químicos asignados a los H-1 de los ácidos urónicos unidos a xilosas acetiladas presentan valores prácticamente idénticos al de los residuos de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazados a la posición C-2 de unidades de xilosas no acetiladas, tanto para los residuos terminales como para los que poseen unidos arabinopiranosas en posición 2 (**AG/AG4M** y **AG2Ap/AG4M2Ap**). Sin embargo, la presencia del grupo acetilo en la posición O-3 de las unidades de xilosa provoca corrimientos en los desplazamientos químicos de las señales de algunos carbonos e hidrógenos de los ácidos urónicos que están unidos en la posición 2 de la pentosa. De esta manera, es posible diferenciar las señales de aquellas unidades de ácido glucurónico y 4-O-metilglucurónico unidos a 3-O-Ac- $\beta$ -D-Xilp. Estas unidades, estructuralmente similares a las descritas anteriormente, se diferencian con la letra "a", y fueron nombradas como **AG2Apa/AG4M2Apa** y **AGa/AG4Ma**.

La coincidencia en el desplazamiento químico de las unidades de ácidos urónicos enlazadas en posición 2 e influenciadas por grupos acetilo se encuentra en concordancia con lo descrito en la **Figura 2.40**, en la cual se podía apreciar en los espectros HSQC de la fracción **GB** y de los distintos productos desacetilados que el desplazamiento químico de los C-1/H-1



de las señales originadas en estas unidades no variaba a pesar de las modificaciones químicas realizadas.



**Figura 2.71.** Ampliación del espectro NOESY del producto **GBH** donde se muestran las señales de correlación entre los H-3 de las unidades **X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac** y los sustituyentes enlazados a las mismas.

En la **Figura 2.72 a)** se presenta el espectro TOCSY de la fracción **GB** en la región de desplazamientos químicos entre 5,40 y 5,25 ppm, mientras que la imagen b) corresponde al espectro TOCSY del producto desacetilado **GBD** en la misma zona de desplazamientos químicos. En el espectro superior se pueden observar dos señales anchas, con desplazamientos químicos de 3,68-3,69/5,38-5,40 ppm y 3,80/5,27 ppm que desaparecen en el espectro del producto desacetilado. En esta ampliación del espectro de **GBD** no se observa que desaparezcan otras señales, lo que implica que aquellas originadas por las unidades **AG2Apa/AG4M2Apa** y **AGa/AG4Ma** se superponen con las originadas por los residuos de ácidos urónicos unidos a unidades de xilosa no acetiladas. La comparación de otras zonas de los espectros TOCSY de la fracción **GB** y del producto **GBD** permitió corroborar la existencia de las señales superpuestas, lo que requirió un análisis muy detallado de numerosas ampliaciones.

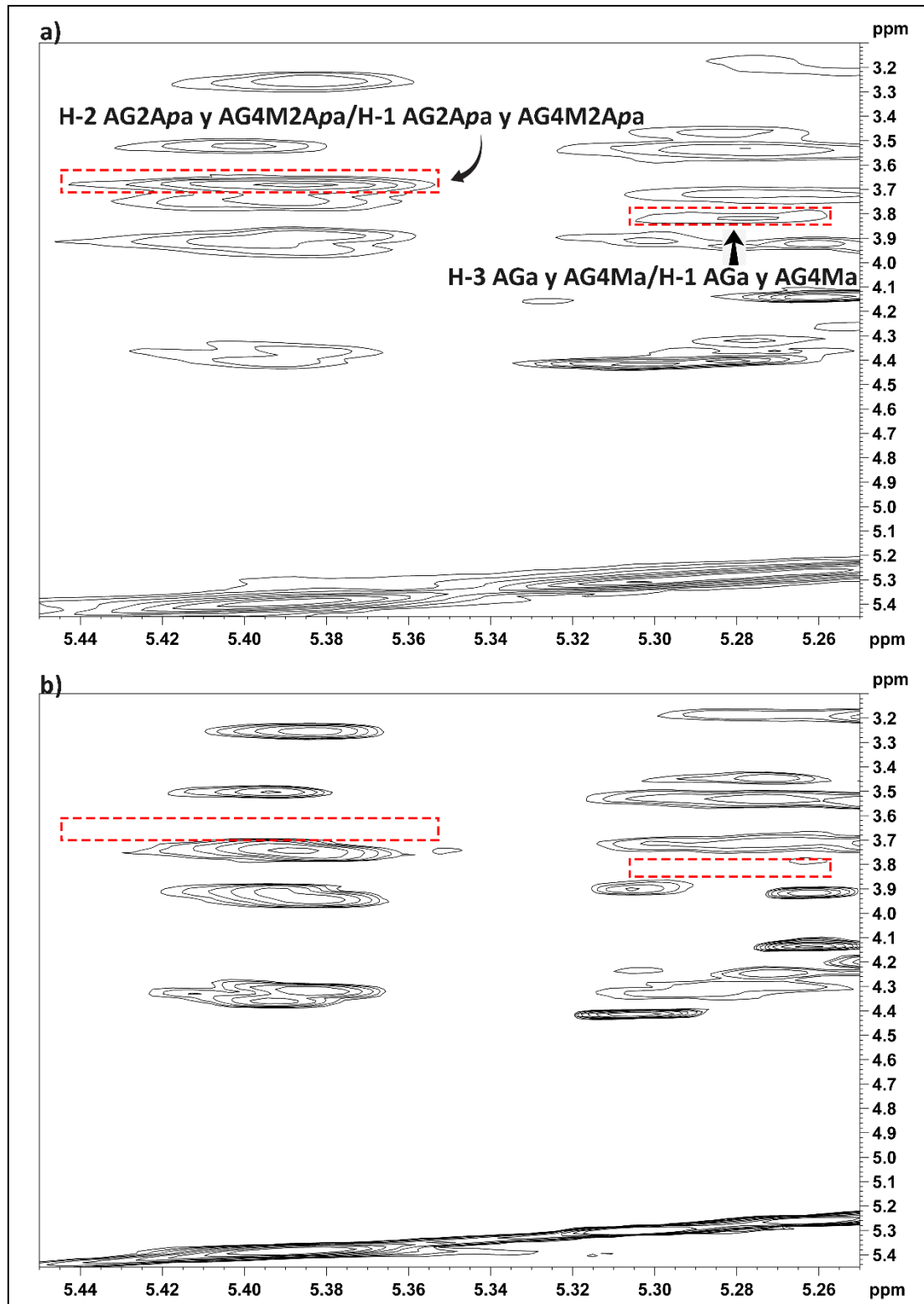


Figura 2.72. Ampliaciones de los espectros TOCSY de a) GB y b) GBD. Las señales marcadas en rojo desaparecen luego de la desacetilación de la fracción GB.

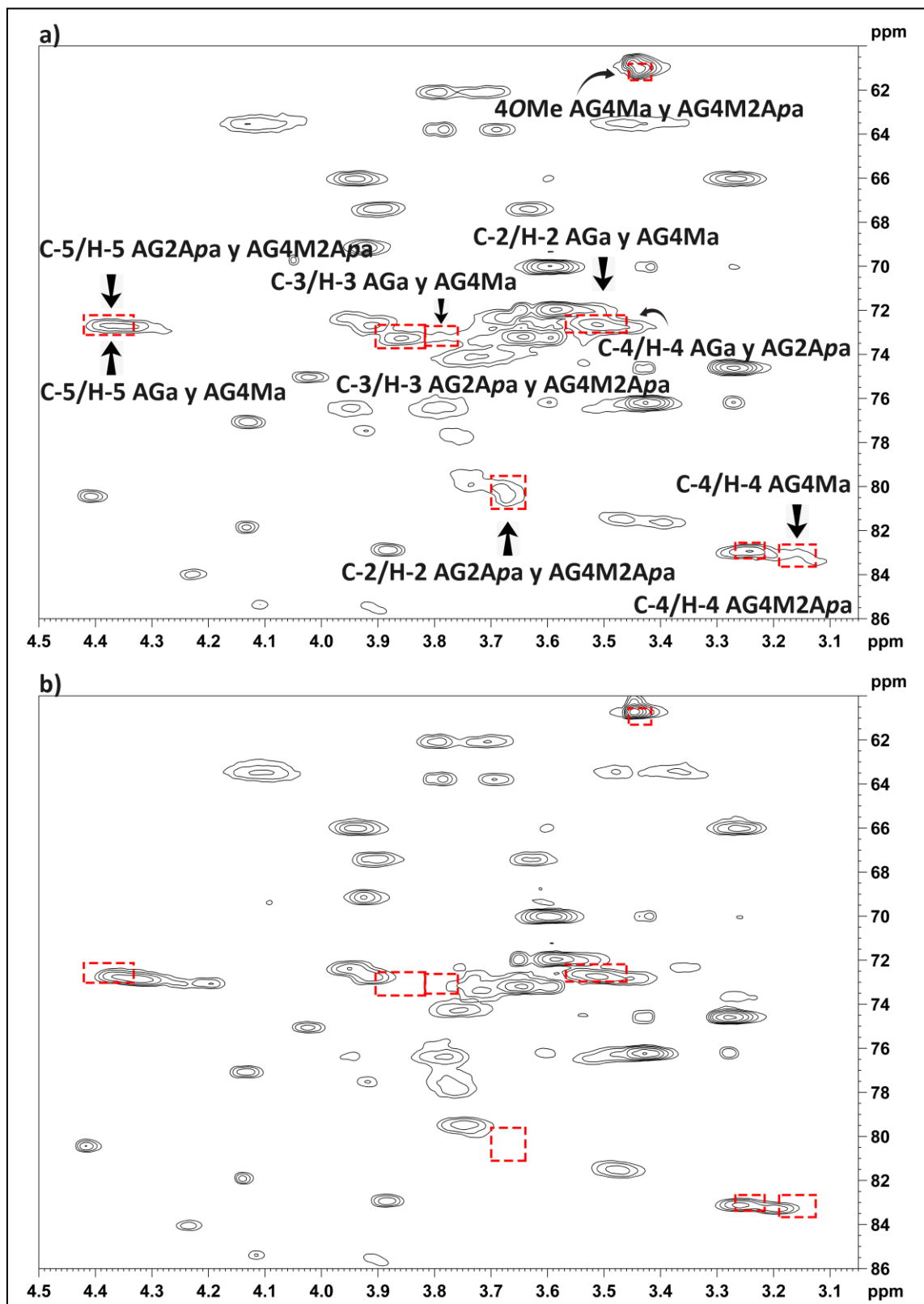
En la **Figura 2.73** se muestran ampliaciones de los espectros HSQC de la fracción **GB** y del producto desacetilado **GBD**, donde se marcan todas las señales originadas en las correlaciones de los C2-5 y los H2-5 de las unidades **AG2Apa/AG4M2Apa** y **AGa/AG4Ma**. Comparando ambos espectros se puede apreciar que algunas señales de estos residuos desaparecen en el espectro del producto desacetilado, mientras que otras señales también se mantienen. Algunas de estas señales en los espectros mostrados se encuentran parcialmente superpuestas y su existencia pudo ser corroborada con la utilización de espectros de otros productos.

En la **Tabla 2.39** se presentan las asignaciones completas de las unidades de los ácidos urónicos unidos a la posición C-2 de las unidades de xilosas que se encuentra a su vez acetiladas en posición O-3. Se muestra la asignación tanto de las unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y el ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales como de las unidades que presentan un residuo de arabinosa piranósica en su posición C-2.

**Tabla 2.39.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales originadas en las unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminales y sustituidas en posición C-2 influenciadas por grupos acetilo (**AGa/AG4Ma** y **AG2Apa/AG4M2Apa**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	4-O-Me
$\alpha$ -D-GlcpA-(1→) ( <b>AGa</b> )	98,5	72,7	73,4	72,8	72,8	
	5,27	3,52	3,80	3,48	4,39	
4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→) ( <b>AG4Ma</b> )	98,5	72,7	73,0	83,2	72,8	61,0*
	5,27	3,52	3,80	3,16	4,39	3,44*
→2)- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→) ( <b>AG2Apa</b> )	97,4	80,6	73,3	72,7	72,7	
	5,40	3,69	3,90	3,52	4,41	
→2)- $\alpha$ -D-MeGlcpA-(1→) ( <b>AG4M2Apa</b> )	97,4	80,6	73,3	83,1	72,8	61,0
	5,38	3,68	3,88	3,25	4,36	3,44

\* Las señales se pudieron diferenciar de las informadas en las **Tablas 2.21** y **2.22** por la presencia de un pico adicional en el espectro HSQC de **GB**.

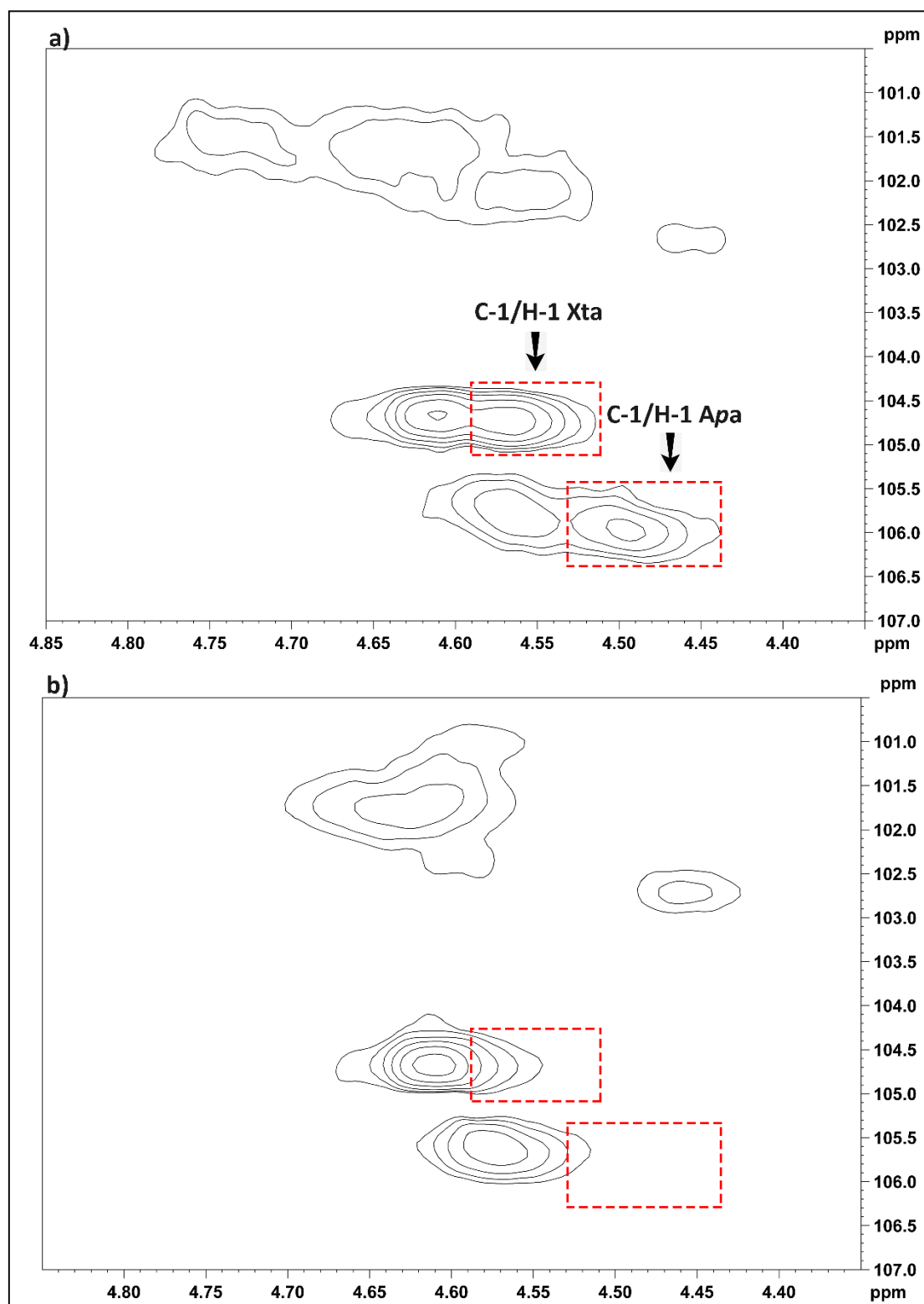


**Figura 2.73.** Ampliaciones de los espectros HSQC de a) **GB** y b) **GBD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden con los C2-5/H2-5 de las unidades influenciadas por grupos acetilo **AG2Apa/AG4M2Apa** y **AGa/AG4Ma**.

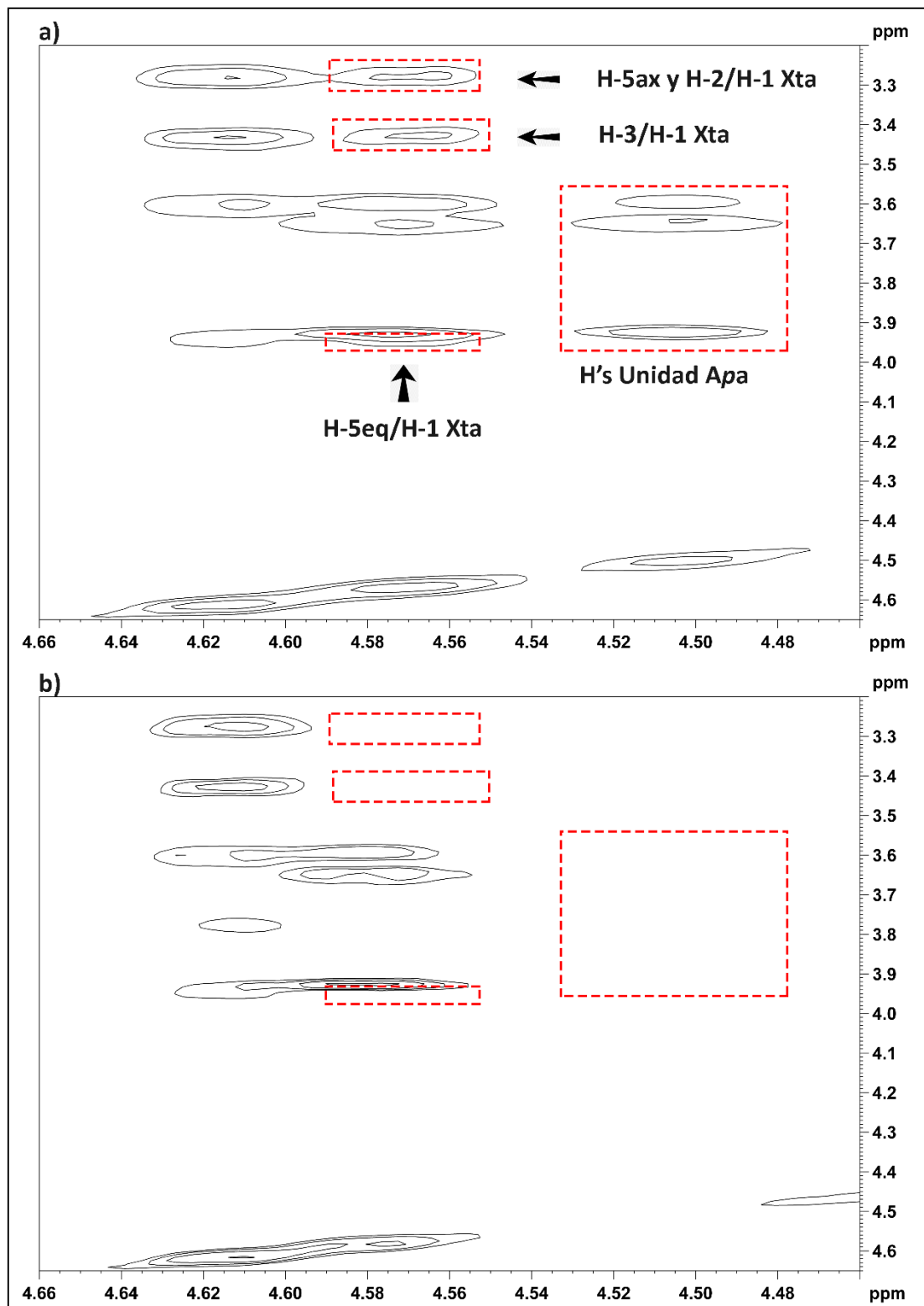
#### 2.2.4.16 Asignación de señales de RMN de las unidades de xilosa y arabinosa piranósicas terminales influenciadas por grupos acetilo

En la **Figura 2.74 a)** se muestran marcadas en la zona anomérica del espectro HSQC de la fracción **GB** dos señales a 104,7/4,56 y 105,9/4,49 ppm cuyos desplazamientos químicos son muy similares a los originados por los residuos terminales **Xt** y **Ap** (con  $\delta$  de 104,7/4,61 ppm y 105,6/4,57 ppm respectivamente), pero claramente se encuentran corridas levemente en protón hacia campos más altos. Se puede observar en el espectro correspondiente al producto desacetilado **GBD** (**Figura 2.74 b)**) que estas señales desaparecen completamente, indicando la relación entre las mismas y la presencia de grupos acetilo en los polisacáridos de la goma brea.

Adicionalmente, en la **Figura 2.75** se muestran ampliaciones de espectros TOCSY los productos a) **GBH** y b) **GBHD** en la región de los desplazamientos químicos correspondiente a los H-1 de estas unidades (se muestran los espectros de los productos hidrolizados en condiciones suaves para disminuir la superposición de señales al eliminar residuos furanósicos). En el espectro superior de la **Figura 2.75** se puede apreciar un conjunto de señales de correlación entre el H-1 con  $\delta$  de 4,56 ppm y el resto de los hidrógenos de la misma unidad. Puede observarse en la mencionada figura que en el espectro del producto desacetilado este conjunto de señales desaparecen. Los desplazamientos químicos de estas señales son idénticos a los correspondientes a las señales de los hidrógenos de la unidad **Xt**, los cuales correlacionan con el protón anomérico de  $\delta = 4,61$  ppm. Según estas características, se designaron estas unidades como **Xta**, es decir, unidades de xilas terminales influenciadas por grupos acetilos.



**Figura 2.74.** Ampliaciones de la zona anomérica de espectros HSQC de a) **GB** y b) **GBD**. Las señales marcadas en **rojo** son originadas por unidades terminales de xilopiranosas y arabinopiranosas influenciadas por grupos acetilo



**Figura 2.75.** Ampliaciones de los espectros TOCSY a) **GBH** y b) **GBHD**. Las señales marcadas en **rojo** se corresponden a las señales de correlación entre los H-1 de las unidades **Xta** y **Apa** y el resto de los hidrógenos que desaparecen en el espectro desacetilado.

Además, existe otro conjunto de señales de correlación con un protón anomérico con desplazamiento químico de 4,49 ppm que fueron asignadas a unidades de arabinosas piranósicas terminales que están influenciadas por los grupos acetilos (**Apa**). Las señales de estos protones son idénticas a las asignadas a la unidad **Ap**, cuyo protón H-1 aparece a  $\delta = 4,57$  ppm. Nuevamente en el espectro del producto desacetilado **GBHD** se puede observar que este conjunto de señales de correlación desaparece. Como fue analizado anteriormente en la **sección 2.2.4.3** para la unidad **Ap**, la presencia de sólo tres señales de correlación en el TOCSY de **GB** se debe a la superposición de las señales originadas en los pares H-3 y H-5ax, H-4 y H-5eq que presentan desplazamientos químicos muy similares.

Estas unidades de xilopiranosas y arabinopiranosas terminales afectadas por grupos acetilo denominadas **Xta** y **Apa** no poseen, según el análisis de los espectros HSQC y TOCSY, posiciones en las cuales tengan unidos grupos acetilos. De manera que, teniendo esta certeza y sabiendo que las señales de las mencionadas unidades desaparecen en los productos desacetilados, se concluye que la influencia de los grupos acetilos es originada por las unidades cercanas que los poseen.

Con el empleo de los espectros TOCSY mostrados y comparando los espectros HSQC de la fracción **GB** y el producto desacetilado **GBD** se asignaron completamente las señales de unidades **Xta** y **Apa**. En la **Tabla 2.40** se muestran los resultados obtenidos en comparación con la asignación realizada previamente de las señales de las unidades **Xt** y **Ap**.

**Tabla 2.40.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales originadas en los residuos de  $\beta$ -D-xilopiranosas y  $\alpha$ -L-arabinopiranosas influenciados por grupos acetilo (**Xta** y **Apa**).

Residuo		Desplazamiento químico (ppm)				
		C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5 eq/H-5 ax
$\beta$ -D-Xilp-(1→)	<b>(Xta)</b>	104,7	74,6	76,2	70,0	66,0
		4,56	3,28	3,43	3,60	3,94; 3,27
$\beta$ -D-Xilp-(1→)	<b>(Xt)</b>	104,7	74,6	76,2	70,0	66
		4,61	3,28	3,43	3,60	3,94; 3,27
$\alpha$ -L-Arap-(1→)	<b>(Apa)</b>	105,9	71,9	72,0	69,1	67,4
		4,49	3,58	3,65	3,92	3,90; 3,64
$\alpha$ -L-Arap-(1→)	<b>(Ap)</b>	105,6	71,9	72,0	69,1	67,4
		4,57	3,58	3,65	3,92	3,90; 3,64



Es importante destacar que si se comparan los desplazamientos químicos obtenidos para las unidades **Xta** y **Apa** respecto de las correspondientes no influenciadas por grupos acetilo **Xt** y **Ap**, se aprecia que la única diferencia entre las mismas radica en el valor de desplazamiento químico de sus H-1 y/o C-1. Es decir que la presencia de grupos acetilo en las cercanías de estas unidades terminales afecta únicamente el desplazamiento químico de los carbonos e hidrógenos anoméricos.

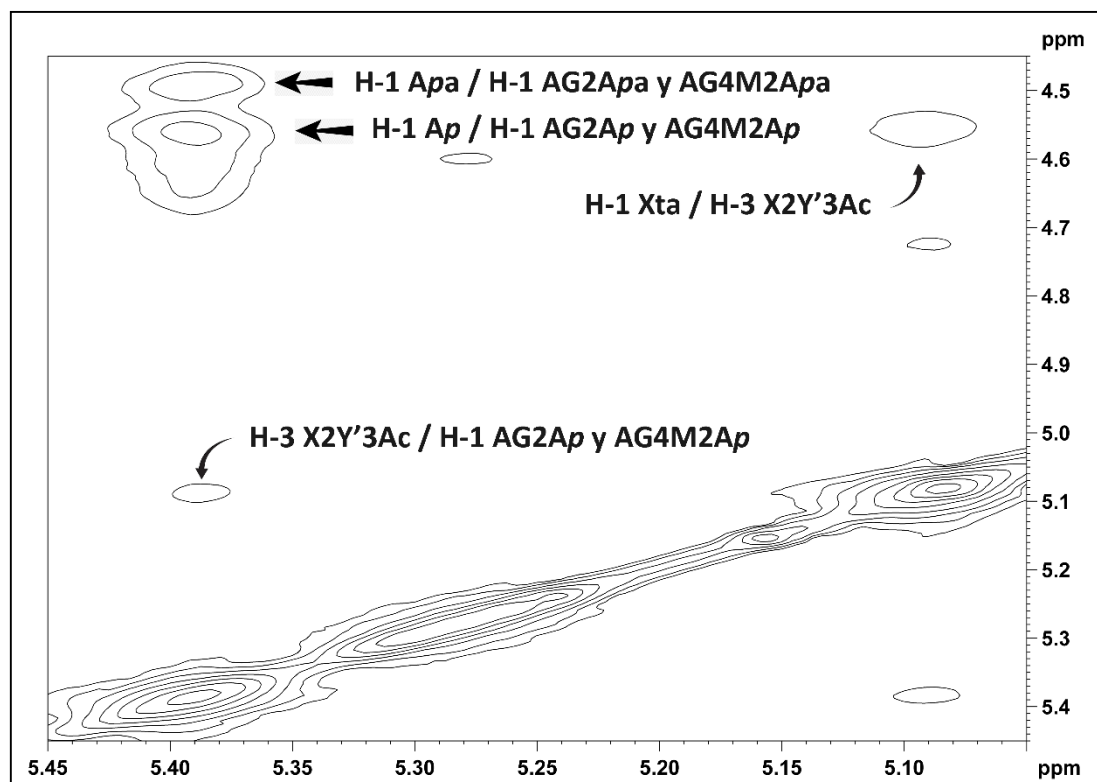
Para poder explicar en detalle la influencia de los grupos acetilo sobre las unidades terminales descritas se debe tener en consideración su ubicación en la estructura de los polisacáridos de la goma brea.

En primera instancia se debe considerar que las evidencias encontradas en este trabajo de Tesis indican que los grupos acetilo están unidos fundamentalmente en la posición O-3 de residuos de xilosa que conforman la cadena central de los polisacáridos de goma brea. Además, fue determinado que las mencionadas unidades de xilosa presentaban sustituyentes en la posición C-2 (**sección 2.2.4.14**).

En la **sección 2.2.4.5** se mostró que las unidades terminales de arabinopiranososa se encuentran exclusivamente enlazadas a la posición 2 de residuos de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico, conformando un disacárido que está unido a las unidades de xilosa de la cadena central. Estas xilosas pueden tener o no un grupo acetilo en su posición 3.

En el espectro NOESY de la fracción **GB** de la **Figura 2.76** se pueden apreciar las correlaciones descritas en la **sección 2.2.4.5** entre los H-1 de los ácidos urónicos y las unidades terminales de arabinopiranososa (**AG2Ap** y **AG4M2Ap**). Pero además se observan correlaciones entre los H-1 de los ácidos urónicos y el H-1 de la unidad **Apa**, que presenta un valor de  $\delta$  de 4,49 ppm y que forman las unidades **AG2Apa** y **AG4M2Apa**. Estas señales de correlación por NOE confirman que la unidad terminal **Apa** se encuentra enlazada a los residuos de ácidos urónicos **AG2Apa** y **AG4M2Apa**, los cuales a su vez se encuentran adyacentes a un grupo acetilo. Este hecho indica que probablemente por la conformación adoptada de esta cadena lateral, la posición anomérica de la unidad **Apa** se encuentra cercana a dicho grupo acetilo, lo cual genera un pequeño corrimiento en su desplazamiento químico. En las **Figuras 2.82** y **2.83** se muestran esquemas de estos fragmentos estructurales en conjunto con los descriptos anteriormente de los polisacáridos desacetilados. Cabe destacar

que no se encontró ningún tipo de evidencia que indique la existencia de ácidos urónicos acetilados ni arabinopiranosas acetiladas.



**Figura 2.76.** Ampliación del espectro NOESY de la fracción **GB** donde se muestran señales de correlación entre las unidades **Xta** y **Apa** y otros residuos.

Por otro lado, como se indicó en la **sección 2.2.4.10**, también se determinó que las unidades terminales de xilosa **Xt** se encontraban unidas a la posición C-2 de los residuos de xilosa de cadena **X2R** (ver **Figura 2.82**), no encontrándose evidencia sobre su unión a otras unidades.

En la ampliación del espectro NOESY de la fracción **GB** que se presenta en la **Figura 2.76** se aprecia una señal de correlación entre un protón con  $\delta = 4,56$  ppm originada por el H-1 de la unidad **Xta** y el H-3 del residuo de xilosa **X2Y'3Ac**, lo cual indica que estos hidrógenos se encuentran muy cercanos.

Existe la posibilidad de que estos residuos terminales de xilosa influenciados por un grupo acetilo se encuentren enlazados en la posición C-2 a una unidad de xilosa de cadena acetilada en posición C-3. No obstante, como se analizó para los residuos de ácidos urónicos

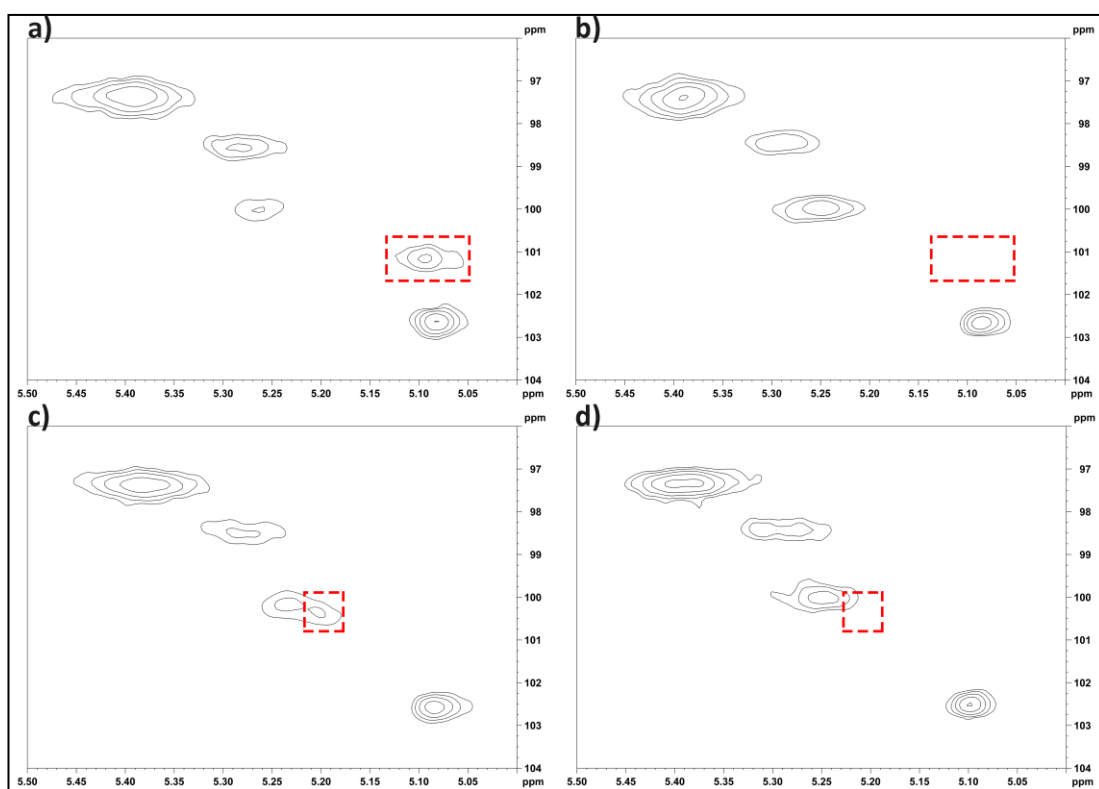
descritos en las secciones anteriores, se esperaría que algunos de los C2-5/H2-5 de la unidad **Xta** presenten señales en los espectros de RMN con corrimientos en el  $\delta$  respecto de la unidad análoga **Xt**. Debido a que el efecto sobre esta unidad es el mismo que lo analizado para el residuo de arabinopiranososa **Apa**, es decir, que el único efecto que se observa es el corrimiento a campos más altos de únicamente las señales originadas en los C-1/H-1, se considera que los residuos **Xta** se encuentran enlazados en la posición C-2 de una unidad de  $\rightarrow 2,4$ - $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) que presenta a su vez una unidad vecina con un grupo acetilo en la posición C-3, como se puede apreciar en el esquema de la **Figura 2.82**. De esta manera las unidades **Xta** se encontrarían a la misma distancia de enlaces de un grupo acetilo en comparación con las unidades **Apa**.

En ese sentido, no puede descartarse que las unidades **Xta** podrían estar enlazadas a un residuo análogo a la xilosa disustituida en posiciones 2 y 4 por unidades terminales de xilosa piranósica **X24XtXt** descrita anteriormente (ver **sección 2.2.4.9**), pero que a su vez se encuentre acetilado en la posición O-3. Sin embargo, no se encontró ninguna evidencia espectroscópica que confirme esta posibilidad.

### 2.2.4.17 Asignación de señales de RMN de unidades de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico terminal enlazadas en posición C-3 a unidades $\rightarrow$ 3,4)-2-O-Ac- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$

Además de las señales anoméricas originadas por las unidades **Xta** y **Apa** en el espectro HSQC de la fracción **GB**, se puede apreciar otra señal, con desplazamiento químico de 101,3/5,09 ppm, que también está asociada a la presencia de grupos acetilo en los polisacáridos de la goma brea.

En la **Figura 2.77** se muestran ampliaciones de los espectros HSQC de la fracción a) **GB** y de los productos b) **GBD**, c) **GBR** y d) **GBRD**. En el espectro correspondiente a **GBD** se puede apreciar cómo esta señal con  $\delta$  de 101,3/5,09 ppm desaparece luego del proceso de desacetilación.



**Figura 2.77.** Ampliaciones de la zona anomérica de los espectros HSQC de a) **GB**, b) **GBD**, c) **GBR** y d) **GBRD**.

Por otro lado, en el espectro del producto reducido **GBR** se observa que esta señal se desplaza hacia campos más bajos en protón y más altos en carbono y presenta un  $\delta$

prácticamente idéntico al de la unidad de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D- glucurónico enlazada en posición C-3 (**X3AG4M**). Nuevamente se aprecia que en el espectro del producto reducido y desacetilado **GBRD** esta señal desaparece.

Adicionalmente, si se observa la señal con  $\delta$  de 100,0 y 5,24 ppm perteneciente al C-1/H-1 de la unidad **X3AG4M** entre los espectros de **GB** y **GBD** se puede apreciar que en el espectro del producto desacetilado dicha señal es mucho más intensa. Esto indicaría que la unidad influenciada por un grupo acetilo y que genera la señal con  $\delta$  de 101,3/5,09 ppm luego del proceso de desacetilación presenta el mismo desplazamiento químico que la unidad **X3AG4M**, razón por la cual se incrementa la intensidad de la señal anomérica originada en esta unidad.

Con el empleo del espectro TOCSY de la fracción **GB** se pudieron identificar las señales generadas por los protones pertenecientes a este residuo. En la **Figura 2.78** se presenta una ampliación de dicho espectro en la zona de desplazamiento químico del H-1 de esta unidad donde se marcan todas las señales de correlación con los hidrógenos de la misma. Se puede apreciar un importante número de señales de correlación y una superposición parcial de las mismas originadas en las unidades **Af $\beta$**  y **X2Y3Ac/X2Y'** que presentan valores de  $\delta$  de su H-1 de 5,08, 5,06 y 5,09 ppm respectivamente. Sin embargo, esta superposición no fue un inconveniente debido a que estas señales de correlación ya estaban bien identificadas. Como se puede apreciar en este espectro, esta unidad presenta un protón con desplazamiento químico bajo de 3,13 ppm, muy similar al encontrado para el residuo de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D- glucurónico influenciado por un grupo acetilo **AG4Ma**.

Una vez identificados los desplazamientos químicos de los protones de esta unidad se utilizaron los espectros HSQC de **GB** y el producto desacetilado **GBD** para poder asignar los carbonos correspondientes. En la **Figura 2.79** se muestra una ampliación del espectro HSQC de la fracción **GB** donde se señalan todas las señales originadas de los C2-5/H2-5 de esta unidad. Con toda esta información y teniendo en cuenta lo analizado en las figuras anteriores se identificó esta unidad como un residuo de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D- glucurónico que posiblemente esté enlazado en la posición C-3 de una unidad de  $\rightarrow$ 3,4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  que a su vez se encuentra acetilada en posición *O*-2 (unidad **X3AG4Ma**, ver **Figura 2.83**). En la **Tabla 2.41** se presenta la asignación completa de esta unidad en comparación con el residuo no influenciado por un grupo acetilo **X3AG4M**.

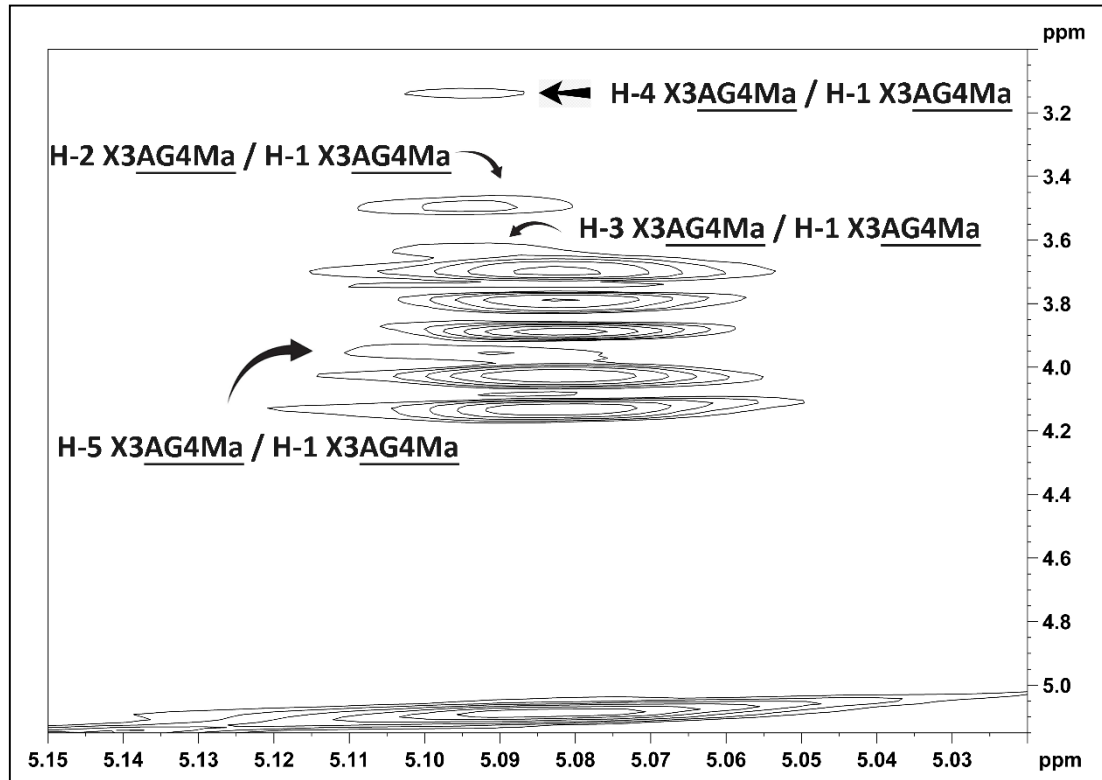


Figura 2.78. Ampliación del espectro TOCSY del producto GB.

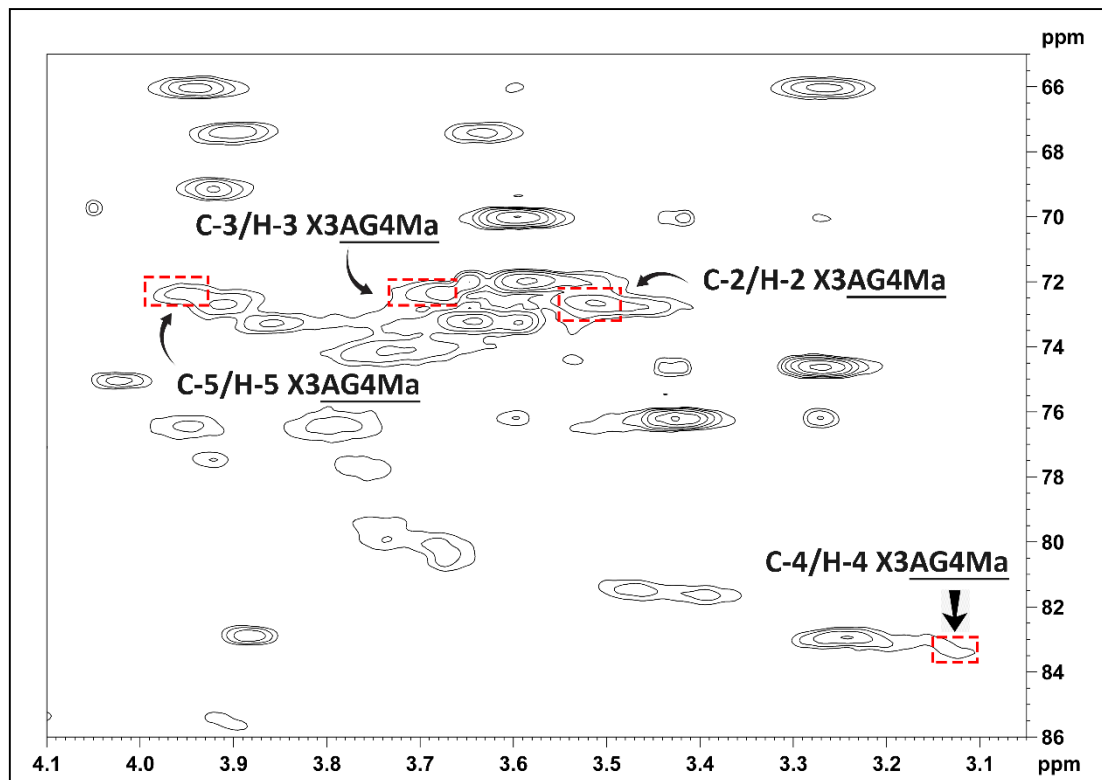
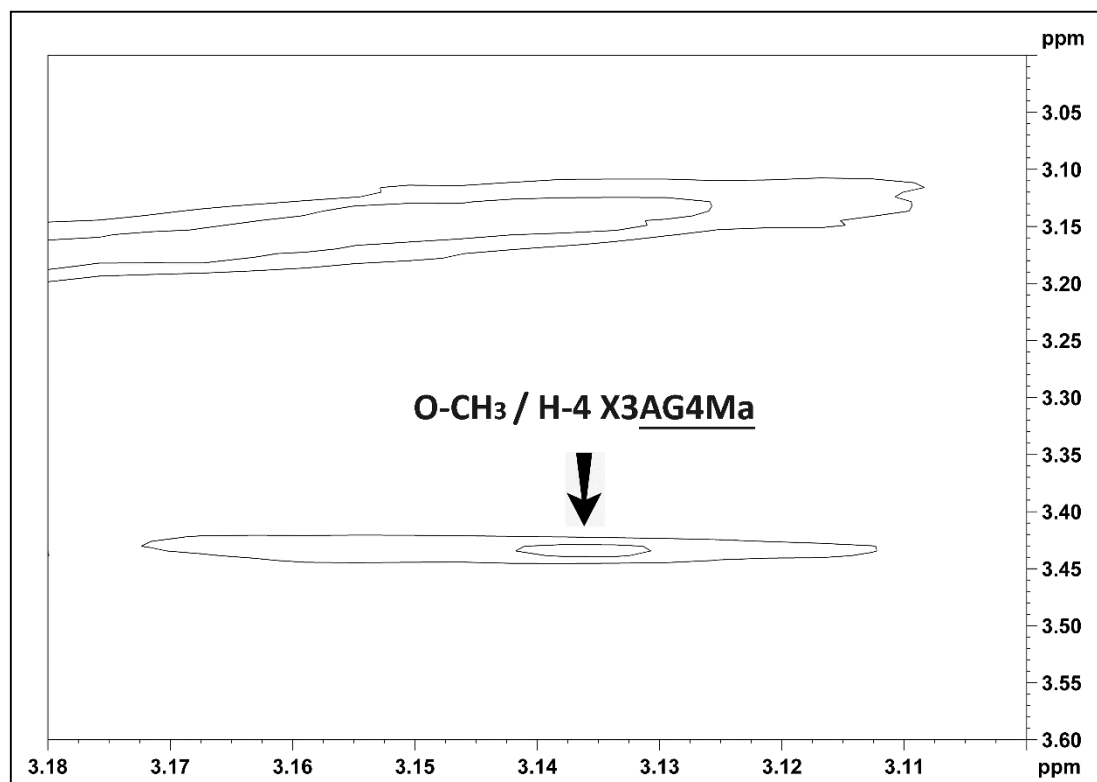


Figura 2.79. Ampliación del espectro HSQC de la fracción GB. Las señales marcadas en rojo se corresponden con los C2-5/H2-5 de la unidad X3AG4Ma.

Asimismo, en la **Figura 2.80** se muestra una ampliación del espectro NOESY de la fracción **GB** donde se marca una señal de correlación entre el H-4 de esta unidad y los hidrógenos del metilo enlazado en posición *O*-4.



**Figura 2.80.** Ampliación del espectro NOESY de la fracción **GB** donde se puede observar una señal de correlación entre el H-4 de la unidad **X3AG4Ma** y los hidrógenos del metilo enlazado en posición *O*-4.

**Tabla 2.41.** Desplazamientos químicos (ppm) de las señales correspondientes a la unidad de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazado en posición C-3 a residuos de  $\rightarrow$ 3,4)-2-*O*-Ac- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ ) (**X3AG4Ma**).

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	4- <i>O</i> -Me
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	
4- <i>O</i> -Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ ) ( <b>X3AG4Ma</b> )	101,3	72,7	72,3	83,1	72,3	61,0
	5,09	3,53	3,67	3,13	3,95	3,44
4- <i>O</i> -Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ ) ( <b>X3AG4M</b> )	100,0	72,7	73,0	83,2	73,1	60,8
	5,24	3,55	3,72	3,19	4,20	3,45

Se puede ver en la tabla anterior que el desplazamiento químico de las señales originadas de los C1-5/H1-5 presentan corrimientos de forma diferencial. En particular, las mayores diferencias se encuentran en el  $\delta$  de los C-1/H-1 y el H-5, que llamativamente se corre 0,25 ppm hacia campos más altos.

En la **sección 2.2.4.8** se asignaron las señales correspondientes a los residuos de glucosa de los espectros de los productos reducidos obtenidos a partir de la fracción **GB**. Como se detalló allí, los desplazamientos químicos encontrados para los C-1/H-1 del ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y del ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico en los distintos entornos no se ve afectado al reducir los mismos a sus análogos de  $\alpha$ -D-glucosa y 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucosa respectivamente. No obstante, como se puede apreciar en la **Figura 2.77**, el  $\delta$  del C-1/H-1 de las unidades de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico enlazadas en posición C-3 a un residuo de xilosa de la cadena central que presenta además un grupo acetilo en la posición O-2 es una excepción ya que cambia cuando estas unidades son reducidas a 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucosa. No se pudo encontrar una explicación de esta particularidad, aunque posiblemente se deba a la conformación adoptada en este caso donde el ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico se encuentra en posición C-3 y el grupo acetilo en posición O-2, de forma inversa a los fragmentos anteriormente descritos.

Por otro lado, como se mostró en la **sección 2.2.4.14**, en el espectro HSQC de **GB** se observa una señal con  $\delta$  de 74,6/4,66 ppm compatible con el de una unidad de  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  y acetilada en posición O-2. Sin embargo, no se pudo encontrar ninguna señal de correlación en espectros TOCSY y NOESY entre algunos de los protones de la unidad **X3AG4Ma** con un hidrógeno con desplazamiento químico de 4,66 ppm.

En línea con lo antedicho, en el espectro HSQC de **GB** se puede observar una señal anomérica con  $\delta$  102,1/4,55 ppm que posee un valor de desplazamiento químico compatible con el de un residuo de  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ . Esta señal está presente además en los espectros de los productos reducidos y/o hidrolizados pero desaparece luego del proceso de desacetilación. En los espectros TOCSY de la fracción **GB** y del producto **GBH** se pudieron identificar dos señales de correlación entre este hidrógeno anomérico y dos protones con  $\delta$  de 4,05 y 3,74 ppm. Sin embargo, en ninguno de los espectros TOCSY ni COSY tanto de **GB** como de las fracciones que conservan los grupos acetilo se pudieron encontrar señales de correlación adicionales. Es posible que estas señales presenten una intensidad baja y no

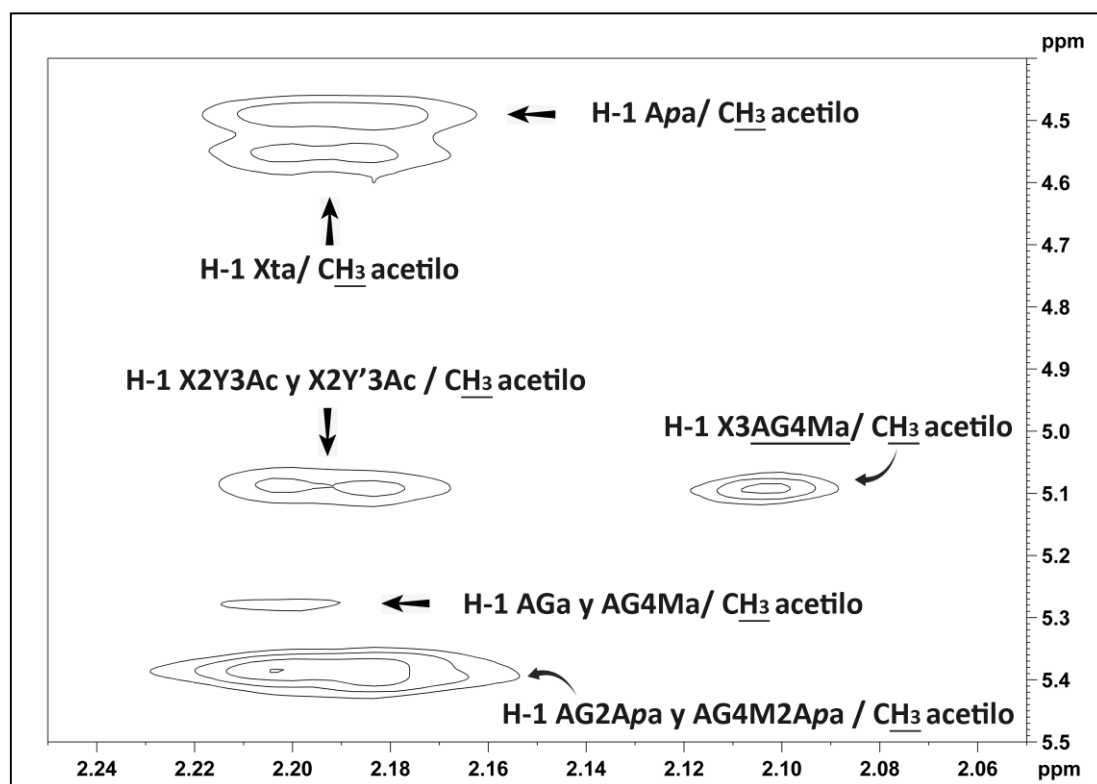


puedan identificarse debido a la gran cantidad de señales presentes en esa zona del espectro. En particular, no se pudo encontrar ninguna señal de correlación entre el H-1 con  $\delta$  de 4,55 ppm con un protón con  $\delta$  de 4,66 ppm, posiblemente por la diferencia pequeña en el valor de desplazamiento químico de estos hidrógenos.

Por lo tanto, existe la posibilidad de que la señal anomérica con  $\delta$  102,1/4,55 ppm se corresponda con la de una unidad del tipo  $\rightarrow 3,4\text{-}2\text{-}O\text{-}Ac\text{-}\beta\text{-}D\text{-}Xilp\text{-}(1\rightarrow$  (unidad **X3AG4M2Ac**) donde el par C-2/H-2 de esta unidad origine la señal con desplazamiento químico de 74,6/4,66 ppm y que a su vez, la unidad **X3AG4Ma** se encuentre enlazada en la posición C-3 de este residuo. Sin embargo, no se pudieron encontrar mayores evidencias espectroscópicas que confirmen esta hipótesis.

#### 2.2.4.18 Asignación de señales de RMN correspondientes a grupos acetilo

Para finalizar la asignación de las señales de los espectros de RMN de la goma brea resta asociar las señales originadas por los metilos y carbonilos de los grupos acetilo con el entorno químico en el que se encuentran. Para ello se utilizaron los espectros NOESY tanto de la fracción **GB** como de los productos que conservan estos grupos en conjunto con los antecedentes bibliográficos antes mencionados<sup>56,57</sup>. En la **Figura 2.81** se muestra una ampliación del espectro NOESY de **GB** donde se marcan señales de correlación entre los hidrógenos metílicos de los grupos acetilo con desplazamientos químicos de 2,20, 2,18 y 2,10 ppm y distintos protones de las unidades influenciadas por estos grupos que se describieron en las secciones anteriores.



**Figura 2.81.** Ampliación del espectro NOESY de la fracción **GB** donde se identifican señales de correlación entre los hidrógenos de los metilos de los grupos acetilos y distintos protones.

Como se puede apreciar en el espectro anterior, los grupos acetilo cuyos hidrógenos metílicos poseen un  $\delta$  de 2,20 y 2,18 ppm presentan señales de correlación con distintos fragmentos estructurales que indican que estos grupos se encuentran enlazados en posición *O*-3 de residuos de xilosa de la cadena central que a su vez se encuentran sustituidos en posición *C*-2 por unidades terminales de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico o ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico o bien disacáridos del tipo *Arap*→2)-(4-*O*-Me)-*Glc*pA-(1→ (unidades **X2Y3Ac** y **X2Y'3Ac**). En cambio, los hidrógenos del grupo metilo que presentan un desplazamiento químico de 2,10 ppm dan lugar a una señal de correlación con el H-1 de la unidad **X3AG4Ma**, sugiriendo que los mismos pertenecen a un grupo acetilo unido en posición *O*-2 de una unidad de xilosa sustituida en posición *C*-3 por un ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico. Estos resultados, resumidos en la **Tabla 2.42** (desplazamientos químicos ya presentados en la **Tabla 2.35**), coinciden con los desplazamientos químicos reportados en la bibliografía mencionada anteriormente<sup>56,57,106,107,116,132</sup>.

**Tabla 2.42.** Desplazamientos químicos (ppm) de señales generadas en los grupos acetilo.

Desplazamiento químico (ppm)			Ubicación
CH <sub>3</sub>		C=O	
C	H		
21,5	2,10	173,9	Posición O-2 →3,4)-β-D-Xilp-(1→
21,9	2,18	174,4	Posición O-3 →2,4)-β-D-Xilp-(1→
21,9	2,20	174,4	Posición O-3 →2,4)-β-D-Xilp-(1→

En cuanto a los desplazamientos químicos de las señales originadas en los carbonos de los carbonilos, se puede observar que los carbonos correspondientes a grupos acetilo enlazados en posición C-3 presentan un mismo corrimiento hacia campos más bajos, al igual que informaron Uhliaríková *et al.*<sup>57</sup>

Cabe destacar que las señales originadas en los hidrógenos metílicos de los grupos acetilo tienden a colapsar en los espectros de los productos modificados a partir de la goma brea, especialmente luego del proceso de reducción.

## 2.3 Conclusiones

### 2.3.1 Resumen de señales de RMN

En las **Figuras 2.82 y 2.83** se muestran todos los fragmentos estructurales descritos en el presente capítulo. A su vez, en las **Tablas 2.43 y 2.44** se compilaron todas las asignaciones realizadas correspondientes a las señales originadas en dichos fragmentos estructurales. Finalmente, en las **Figuras 2.84 a 2.87** se muestran ampliaciones del espectro HSQC de la fracción **GB** donde se marcaron todas las señales de las unidades que constituyen los polisacáridos de la goma brea.

Claramente, la abundancia de los fragmentos identificados no es la misma para todos. Se debe considerar que aun pudiendo haber identificado diversas señales originadas en distintos entornos químicos con ayuda de los productos modificados, puede ocurrir que algunos de ellos se encuentren en muy bajas proporciones.

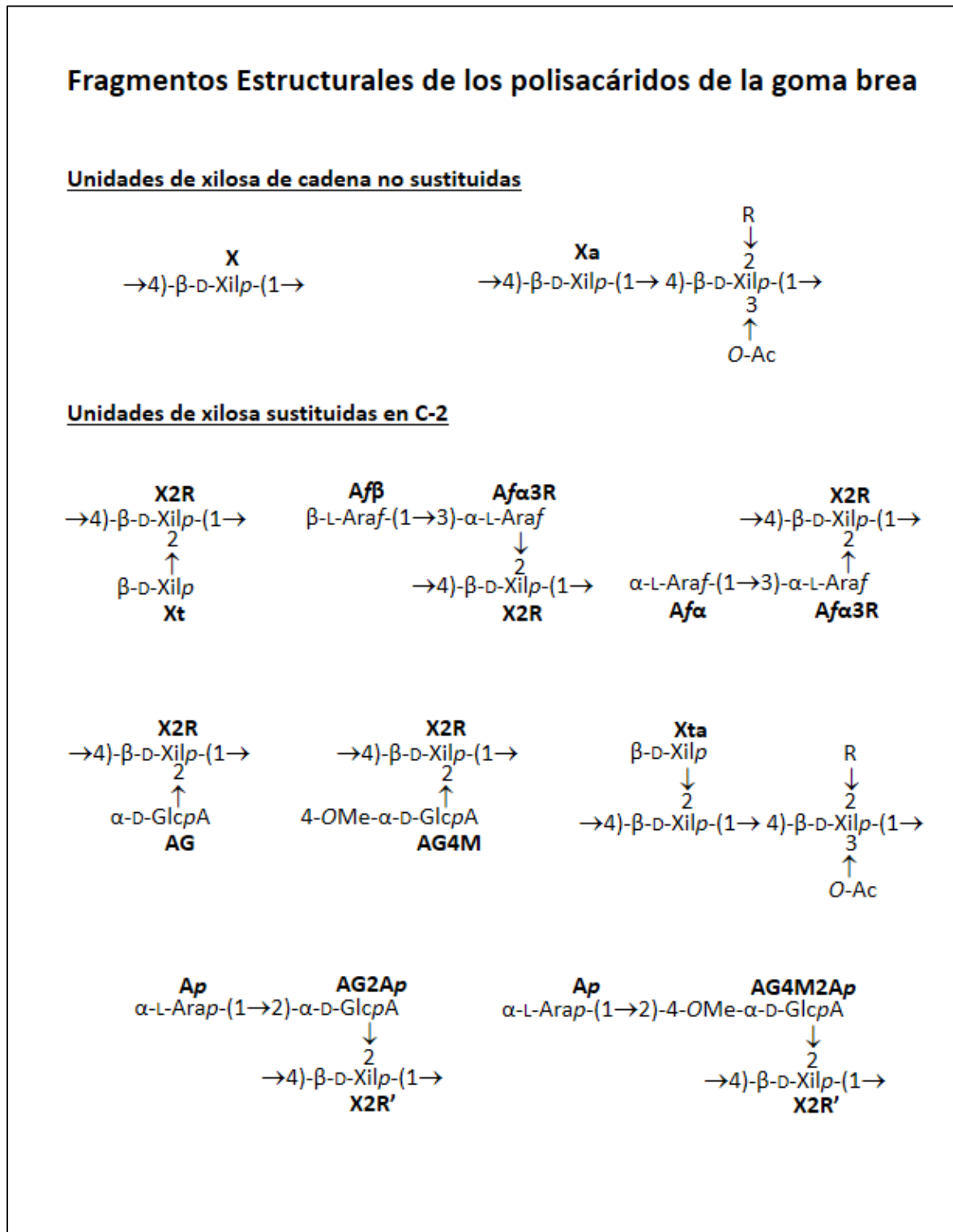


Figura 2.82. Fragmentos estructurales encontrados en los polisacáridos de la goma brea.

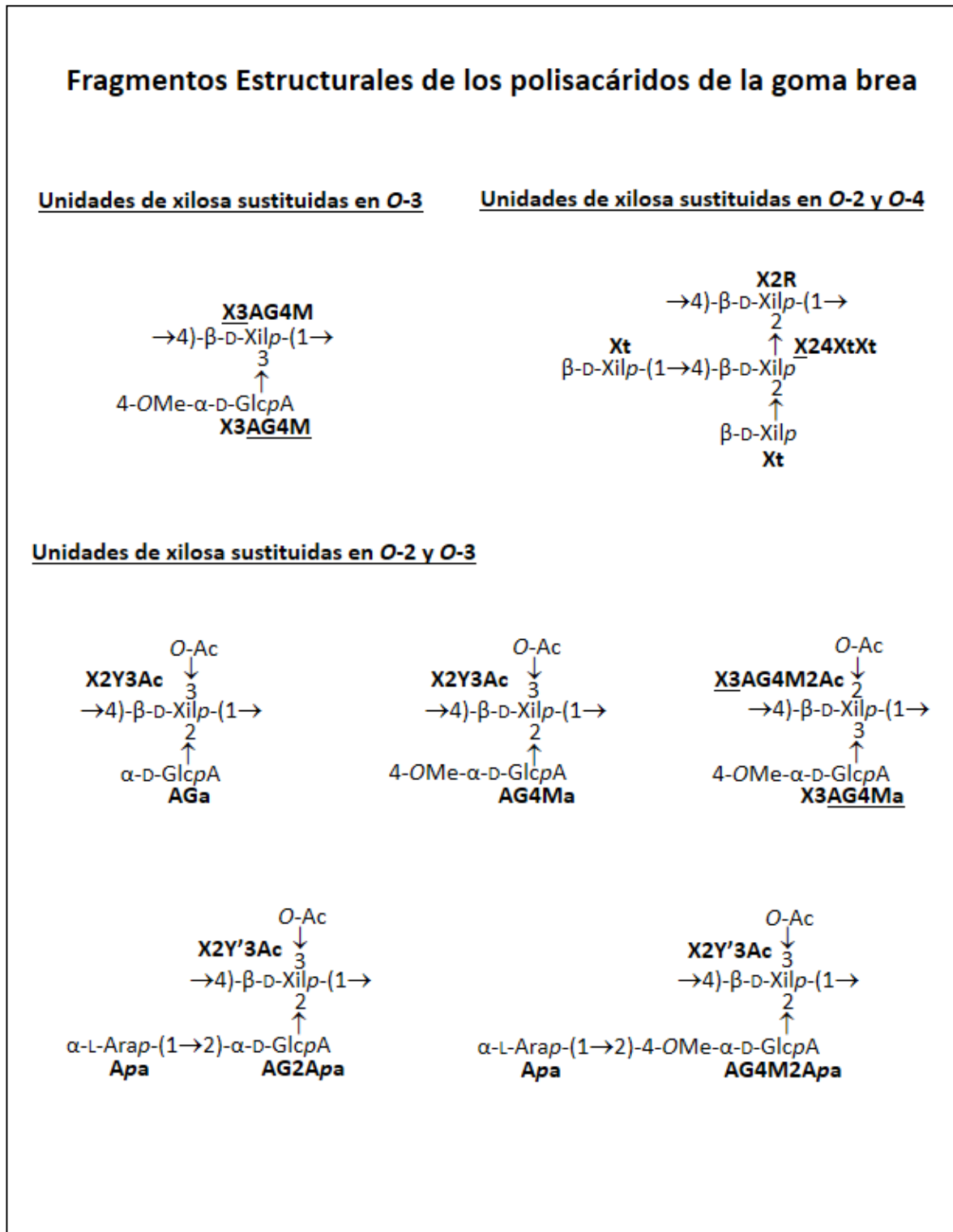


Figura 2.83. Fragmentos estructurales encontrados en los polisacáridos de la goma brea.

**Tabla 2.43.** Desplazamientos químicos asignados de todos los fragmentos estructurales descritos en los espectros de RMN de **GB** (Parte I)

Residuo		Desplazamiento Químico (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	4-O-Me
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5 eq, H-5 ax	
<b>X</b>	→4)-β-D-Xilp-(1→	102,6	73,6	74,5	77,1	63,5	
		4,46	3,26	3,55	3,77	4,11; 3,36	
<b>Xa</b>	→4)-β-D-Xilp-(1→	103,6	73,6	74,5	77,5	63,5	
		4,41	3,18	3,52	3,74	4,08; 3,41	
<b>X2R</b>	→2,4)-β-D-Xilp-(1→	102,2	77,2	73,2	76,4	63,5	
		4,61	3,41	3,59	3,78	4,11; 3,37	
<b>X2R'</b>	→2,4)-β-D-Xilp-(1→	101,6	76,5	72,0	77,2	63,5	
		4,66	3,52	3,65	3,78	4,11; 3,37	
<b>X3AG4M</b>	→3,4)-β-D-Xilp-(1→	102,6	72,3	80,8	76,3	63,5	
		4,46	3,36	3,65	3,96	4,09; 3,36	
<b>X24XtXt</b>	→2,4)-β-D-Xilp-(1→	101,5	81,4	74,2	77,6	63,6	
		4,62	3,49	3,77	3,78	4,15; 3,48	
<b>X2Y3Ac</b>	→2,4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→	101,5	74,1	74,5	76,5	63,5	
		4,71	3,71	5,06	3,95	4,13; 3,49	
<b>X2Y'3Ac</b>	→2,4)-3-O-Ac-β-D-Xilp-(1→	101,5	74,1	74,5	76,5	63,5	
		4,75	3,71	5,09	3,95	4,13; 3,49	
<b>Xt</b>	β-D-Xilp-(1→	104,7	74,6	76,2	70,0	66,0	
		4,61	3,28	3,43	3,60	3,94; 3,27	
<b>Xta</b>	β-D-Xilp-(1→	104,7	74,6	76,2	70,0	66	
		4,56	3,28	3,43	3,60	3,94; 3,27	
<b>Afβ</b>	β-L-Araf-(1→	102,6	77,0	75,0	82,8	63,8	
		5,08	4,13	4,01	3,88	3,69; 3,78	
<b>Afα</b>	α-L-Araf-(1→	109,3	81,8	77,5	85,3	62,1	
		5,25	4,13	3,92	4,11	3,71; 3,79	
<b>Afα3R</b>	→3)-α-L-Araf-(1→	109,5	80,4	85,4	84,0	62,1	
		5,29	4,40	3,91	4,23	3,71; 3,79	
<b>Ap</b>	α-L-Arap-(1→	105,6	71,9	72,0	69,1	67,4	
		4,57	3,58	3,65	3,92	3,90; 3,64	
<b>Apa</b>	α-L-Arap-(1→	105,9	71,9	72,0	69,1	67,4	
		4,49	3,58	3,65	3,92	3,90; 3,64	
<b>AG</b>	α-D-GlcpA-(1→	98,5	72,7	73,4	72,8	72,8	
		5,29	3,54	3,72	3,45	4,34	
<b>AG4M</b>	4-O-Me-α-D-GlcpA-(1→	98,5	72,7	73,0	83,2	72,8	60,8
		5,28	3,55	3,73	3,19	4,32	3,45
<b>AGa</b>	α-D-GlcpA-(1→	98,5	72,7	73,2	72,8	72,7	
		5,27	3,52	3,80	3,48	4,39	
<b>AG4Ma</b>	4-O-Me-α-D-GlcpA-(1→	98,5	72,7	73,2	83,1	72,7	61,0
		5,27	3,52	3,80	3,16	4,39	3,44
<b>AG2Ap</b>	→2)-α-D-GlcpA-(1→	97,4	79,4	72,7	72,7	72,7	
		5,40	3,73	3,92	3,51	4,36	

**Tabla 2.44.** Desplazamientos químicos asignados de todos los fragmentos estructurales descritos en los espectros de RMN de **GB** (Parte II)

Residuo		Desplazamiento Químico (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	4-O-Me
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	
<b>AG2Apa</b>	→2)-α-D-GlcpA-(1→	97,4	80,6	73,3	72,7	72,7	
		5,40	3,69	3,90	3,52	4,41	
<b>AG4M2Ap</b>	→2)-4-O-Me-α-D-GlcpA-(1→	97,4	79,4	72,3	83,1	72,8	60,8
		5,38	3,75	3,95	3,26	4,32	3,45
<b>AG4M2Apa</b>	→2)-4-O-Me-α-D-GlcpA-(1→	97,4	80,6	73,3	83,1	72,7	61,0
		5,38	3,68	3,88	3,25	4,36	3,44
<b>X3AG4M</b>	4-O-Me-α-D-GlcpA-(1→	100,0	72,7	73,0	83,2	73,1	60,8
		5,24	3,55	3,72	3,19	4,20	3,45
<b>X3AG4Ma</b>	4-O-Me-α-D-GlcpA-(1→	101,3	72,7	72,3	83,1	72,3	61,0
		5,09	3,53	3,67	3,13	3,95	3,44

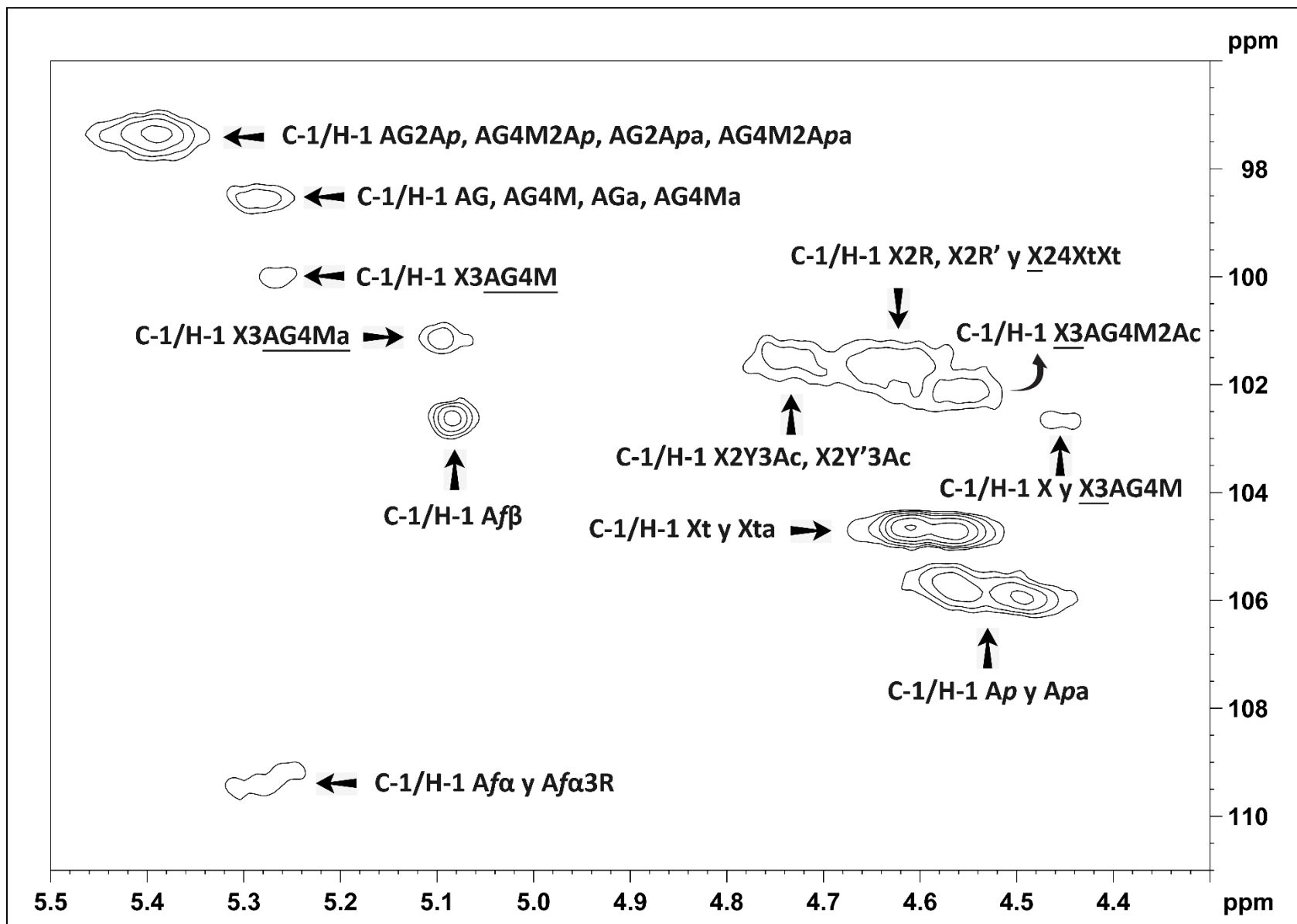


Figura 2.84. Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC de la fracción GB.



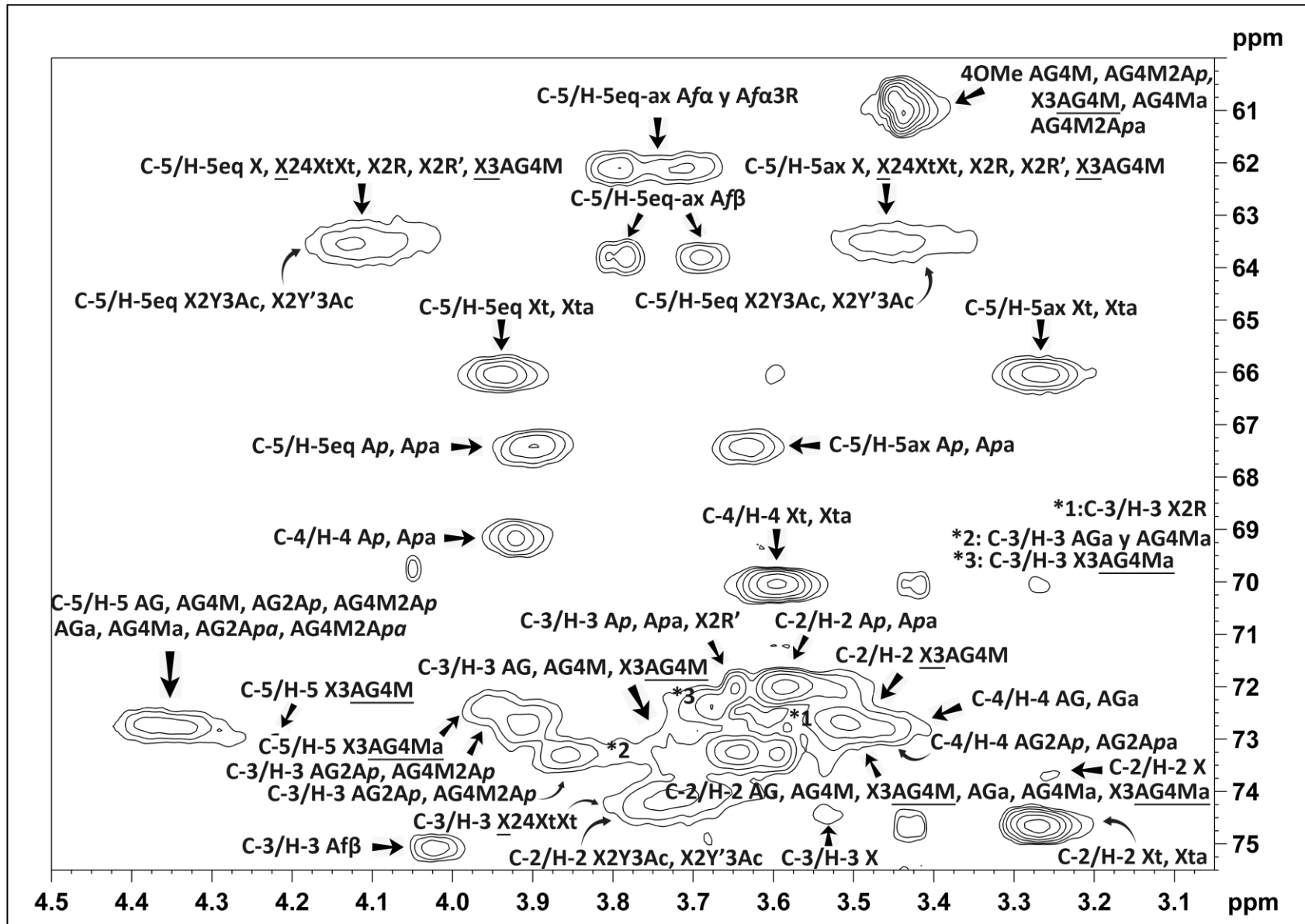


Figura 2.85. Ampliación del espectro HSQC de la fracción GB en la zona correspondiente a las señales originadas en los C2-5/H2-5 (Parte I).

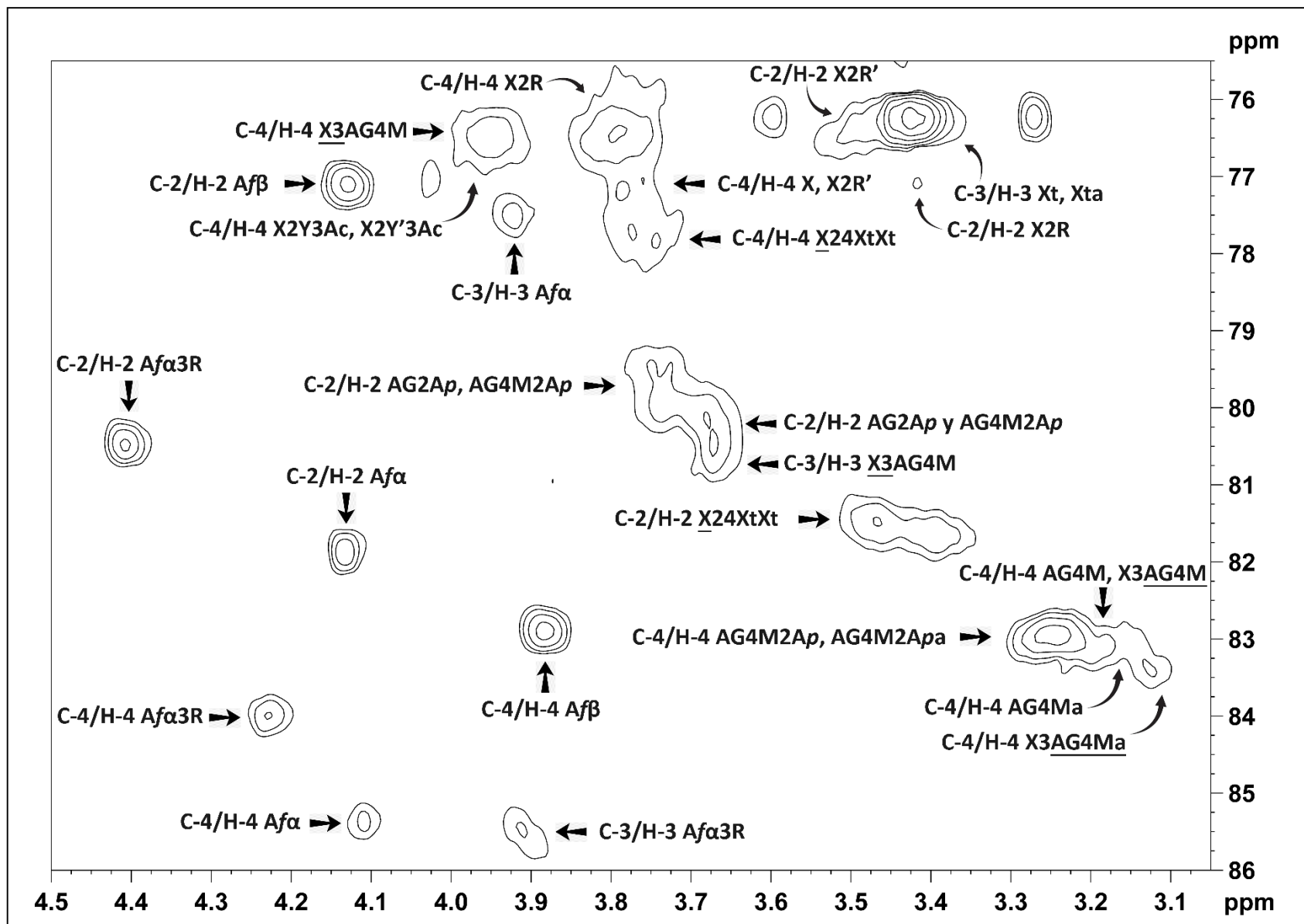


Figura 2.86. Ampliación del espectro HSQC de la fracción GB en la zona correspondiente a las señales originadas en los C2-5/H2-5 (Parte II).

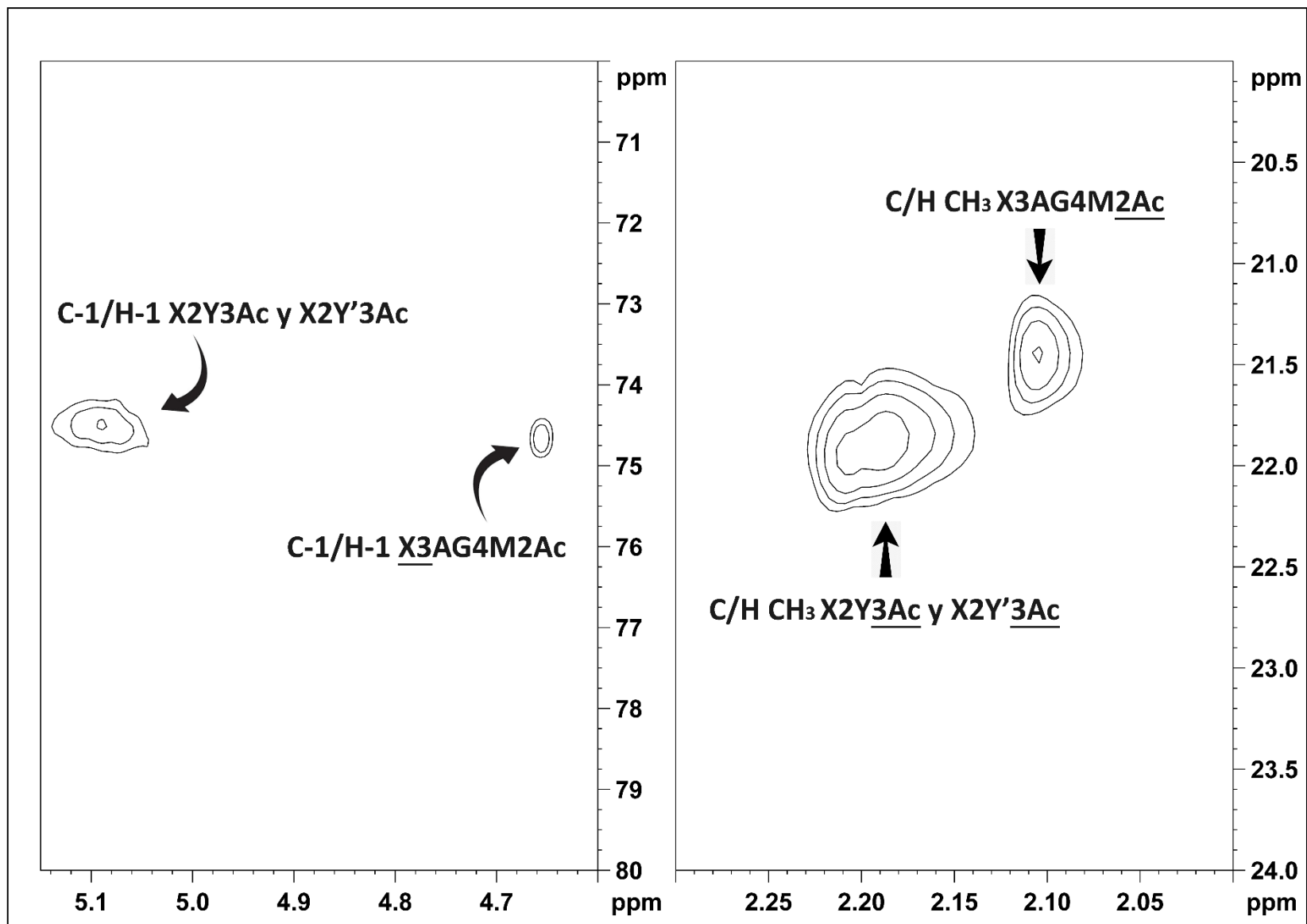


Figura 2.87. Ampliaciones del espectro HSQC de la fracción GB, zonas correspondientes a las señales originadas en los C/H acetilados y los hidrógenos de los metilos de los grupos acetilo.

### 2.3.2 Conclusiones estructurales

En este capítulo se presentó una caracterización completa de la goma brea, exudado extraído del árbol *Cercidium praecox*. Además, se realizó una determinación estructural exhaustiva de los polisacáridos constituyentes de este exudado mediante análisis químicos y espectroscópicos.

Los resultados mostraron que el exudado está compuesto en un 75 % de azúcares neutros, un 17 % de ácidos urónicos, un 9 % de proteínas y aproximadamente un 3% de grupos acetilo. En cuanto a los azúcares constituyentes de los polisacáridos, se determinó que los mismos son xilosa, arabinosa, ácido glucurónico y ácido 4-*O*-metil-glucurónico en una proporción 55:24:9:12.

Se determinó que los polisacáridos de este exudado son glucuronoarabinoxilanos de un peso molecular promedio de 122 kDa compuestos por una cadena principal de unidades de 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$  altamente sustituida con unidades de  $\beta$ -D-xilosa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosa,  $\beta$ -L-arabinofuranosa, ácido  $\alpha$ -D-glucurónico, ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico y grupos acetilo, ya sea como unidades terminales o formando pequeñas cadenas laterales.

Específicamente, se determinó que por cada 100 unidades de xilosa de la cadena central, 72 de estas unidades se encuentran sustituidas en C-2 ( $\rightarrow$ 2,4-Xil), 11 en C-3 ( $\rightarrow$ 3,4-Xil) y 14 no se encuentran sustituidas. Como sustituyentes en la posición C-2 de las unidades de xilosa de la cadena central se encuentran disacáridos del tipo  $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$  y  $\beta$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ; disacáridos de arabinopiranososa y ácido glucurónico  $\alpha$ -L-Arap-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$  y  $\alpha$ -L-Arap-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ ; unidades terminales de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico, ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico y  $\beta$ -D-xilosa; o bien un trisacárido del tipo  $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ .

Adicionalmente, se pudo determinar que el único sustituyente enlazado en posición C-3 a las unidades de xilosa de la cadena central es el ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico.

A su vez, se determinó que los grupos acetilo se encuentran enlazados mayormente en posición *O*-3, y minoritariamente en posición *O*-2, de unidades de xilosa de la cadena central que presentan como sustituyentes en la posición vecina unidades de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico o ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico.

# CAPÍTULO 3

## AMIDACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA GOMA BREA



### 3.1. Introducción

#### 3.1.1 Modificaciones químicas de polisacáridos

Desde hace décadas se reconoce que las características y la utilidad de los polisacáridos de origen natural pueden cambiar sustancialmente mediante modificaciones químicas<sup>133</sup>. Las alteraciones de parámetros como la estructura primaria, conformación, hidrofiliidad, solubilidad, naturaleza polielectrolítica, y estabilidad pueden impactar profundamente en sus propiedades biológicas, químicas y físicas. La mayoría de las alteraciones se centran en modificar los grupos funcionales presentes, realizar degradaciones controladas y en producir entrecruzamiento con otros polímeros. Algunos de estos procesos, como la formación de ésteres de celulosa (incluyendo otras modificaciones como la formación de nitrocelulosa y acetato de celulosa), son conocidos y se han llevado a cabo a nivel industrial durante más de cien años<sup>134</sup>.

Las técnicas sintéticas para realizar modificaciones sobre los grupos funcionales presentes en los polisacáridos pueden clasificarse como selectivas o no selectivas. Los métodos no selectivos introducen sustituyentes de forma predominantemente aleatoria a lo largo de la cadena del polímero y dentro de cada unidad monosacáridica, mientras que las técnicas selectivas se dirigen a posiciones o grupos funcionales específicos. Las ventajas de las técnicas selectivas es que al tener un control regioquímico sobre la modificación química realizada, el proceso es más reproducible y los productos que se obtienen presentan una estructura que se conoce con exactitud.

El alcance de estas reacciones de derivatización se parametriza determinando el grado de sustitución (DS por sus siglas en inglés). El DS se define como el número de posiciones que reaccionaron por monosacárido, por lo que el valor máximo de DS depende de la estructura y reacción en cuestión. Por ejemplo, en la reacción de acetilación de celulosa, como la misma presenta tres grupos hidroxilo por monómero susceptibles de acetilarse, el DS máximo sería 3, en tanto que si se realiza una reacción de oxidación que solo actúa sobre alcohol primario, el DS máximo es de 1. En ocasiones el grado de sustitución suele normalizarse y expresarse como un porcentaje.

Cabe destacar que las propiedades reológicas de los polisacáridos se relacionan con múltiples factores estructurales como por ejemplo la carga del polisacárido, la conformación más estable y el peso molecular. Por ende, las modificaciones químicas de los grupos funcionales presentes pueden alterar dichas propiedades sustancialmente<sup>135</sup>.

En este sentido, una de las modificaciones químicas más comunes para modular las propiedades reológicas sobre polisacáridos ácidos es la amidación de los ácidos carboxílicos, la cual es comúnmente aplicada sobre las pectinas. Las pectinas son amidadas empleando amoníaco, aunque también se realiza esta derivatización introduciendo aminas alifáticas primarias<sup>136</sup>. Es importante destacar que dependiendo del DS alcanzado y de la amina introducida se observan distintos cambios en las propiedades físicas y químicas de estos polisacáridos<sup>136</sup>. En general, las modificaciones son realizadas con el fin de aumentar las propiedades gelificantes de estos polisacáridos<sup>136</sup>, razón por la cual se emplean estas pectinas modificadas en la industria alimentaria principalmente como agentes gelificantes en mermeladas bajas en azúcar y jaleas, por lo que representan una alternativa a las pectinas de bajo metoxilo<sup>137</sup>.

En este trabajo de Tesis se llevó a cabo la amidación de los ácidos carboxílicos presentes en el ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y el ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico de la goma brea, empleando diversas aminas primarias con el objetivo de modular sus propiedades reológicas. En este capítulo se presentará la estrategia sintética utilizada y la optimización de la reacción.

### **3.1.2. Amidación de ácidos carboxílicos**

El grupo funcional amida se encuentra presente en numerosas moléculas naturales ya sean pequeñas o de gran tamaño<sup>138</sup>. Particularmente, se encuentra en distintos biopolímeros como las proteínas, las cuales desempeñan un papel crucial en prácticamente todos los procesos biológicos<sup>138</sup>. Además, estos grupos se encuentran en polisacáridos de fuentes naturales como quitina, quitosano parcialmente acetilado, condroitín sulfato y ácido hialurónico, entre otros.

La formación de amidas, análogamente a la formación de ésteres, es formalmente una reacción de condensación entre un ácido y una amina (o un alcohol en el caso de los ésteres).



Sin embargo, existe una diferencia importante entre estas reacciones dado que las reacciones de esterificación se pueden realizar por reacción directa en medio ácido entre el ácido y el alcohol correspondiente, mientras que la formación de amidas requiere otras alternativas. Esto se debe a que la simple mezcla de una amina con un ácido carboxílico, conduce a la reacción ácido-base de los mismos, generando el carboxilato de amonio correspondiente. Si bien es cierto que el tratamiento térmico de estas sales podría dar lugar finalmente a la amidación, no suele ser un método aplicable debido a que suele conducir a bajos rendimientos, o bien estas duras condiciones de reacción pueden ser incompatibles con la presencia de otros grupos funcionales<sup>138</sup>. Por otra parte, la reacción no es promovida en medio básico o ácido debido a la inactivación del ácido carboxílico por desprotonación o de la amina por protonación.

En sistemas biológicos esta limitación es superada mediante procesos de activación selectiva catalizados por enzimas. Por ejemplo, la biosíntesis de proteínas, que implica una secuencia de reacciones de acoplamiento de péptidos por formación de enlaces amida entre dos aminoácidos o péptidos más cortos, se realiza por activación de los ácidos carboxílicos de los aminoácidos, transformándolos en un intermediario más reactivo de tipo éster<sup>138</sup>.

En lo que respecta a los métodos químicos para la formación del enlace amida, se han desarrollado distintas estrategias sintéticas para poder llevar a cabo esta reacción, las cuales tienen en común un primer paso de activación del ácido carboxílico, mediante reacción con algún agente activante (o de acoplamiento) para luego permitir el ataque nucleofílico de la amina o el amoníaco y formar la respectiva amida.

Dependiendo de la presencia de distintos grupos funcionales y de posibles efectos estéricos, entre otros factores, se han utilizado distintas condiciones de reacción y agentes activantes para poder tener un buen control de la regioselectividad de la reacción, optimizar el rendimiento, reducir la cantidad de subproductos, facilitar la purificación del producto final, poder realizar un proceso escalable, aprovechar reactivos más económicos, etc<sup>138</sup>.

Para formar estos derivados y realizar la reacción posterior de formación del grupo amida se han desarrollado diferentes metodologías<sup>138</sup>:

- a) Obtención de un intermediario entre el ácido carboxílico y un grupo activante que se aísla y se somete a una aminólisis.

- b) Formación de un intermediario reactivo a partir del ácido carboxílico en uno o más pasos con un agente activante que no se aísla, seguido de un tratamiento inmediato con la amina.
- c) Generación *in situ* del intermediario en presencia de la amina a partir del ácido carboxílico mediante la adición de un agente activante.

Las estrategias más tradicionales para la activación de los ácidos carboxílicos consisten en la formación de derivados como son los haluros de acilo, anhídridos o compuestos derivados similares como anhídridos mixtos o ésteres<sup>138</sup>. Sin embargo estas estrategias pueden ser difíciles de aplicar en moléculas con altos grados de funcionalización.

En el caso particular de los polisacáridos, estas técnicas no son convenientes debido a que son reactivos sensibles a la humedad y por lo tanto se necesitan condiciones anhidras, en las cuales una gran cantidad de los polisacáridos a modificar son insolubles. Además, algunas de estas transformaciones pueden llegar a afectar también a los grupos hidroxilos libres presentes en los residuos, como por ejemplo la formación de cloruro de acilo utilizando cloruro de tionilo, y también esos oxhidrilos podrían reaccionar con los cloruros de acilo formados para dar ésteres inter o intramoleculares.

En este mismo sentido, la activación de los ácidos carboxílicos mediante ésteres tampoco representa una estrategia sintética adecuada para polisacáridos. Un caso particular son las pectinas de alto grado de metoxilo, en las que se aprovecha la esterificación natural de los ácidos urónicos presentes en el polisacárido para realizar la amidación por aminólisis en metanol<sup>136,139</sup>.

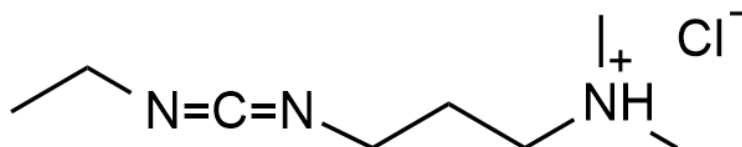
Por lo tanto, una estrategia común utilizada para polisacáridos solubles en agua es emplear otro tipo de reactivos, como las carbodiimidas<sup>134,138</sup>, que son compatibles con estas condiciones y que pueden utilizarse en un medio levemente ácido.

### **3.1.3 Amidación de ácidos carboxílicos presentes en polisacáridos empleando carbodiimidas solubles en agua**

Las carbodiimidas ( $RN=C=NR$ ) son compuestos insaturados con una estructura del tipo aleno. Desde su primera síntesis a fines del siglo XIX, las carbodiimidas se han utilizado

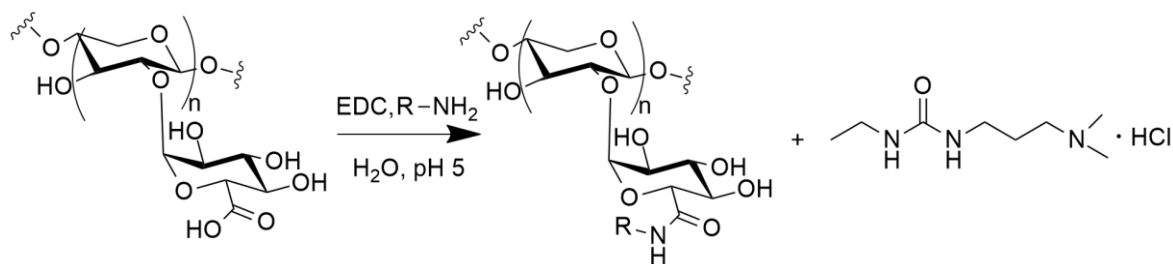
ampliamente en síntesis orgánica. Estas moléculas se han empleado en la síntesis de péptidos y proteínas y en la modificación química de polisacáridos, aún en sistemas acuosos<sup>140</sup>. Una particularidad por la cual estos reactivos se han usado ampliamente es debido a que a diferencia de otros agentes activantes o entrecruzantes no dejan ningún residuo carbonado en el producto resultante, razón por la cual se los considera “zero-length crosslinkers” (entrecruzantes de longitud cero)<sup>140</sup>.

Para realizar la amidación de los ácidos carboxílicos de polisacáridos solubles en agua se utiliza desde hace muchos años el clorhidrato de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, el cual es soluble y estable en medio acuoso (ver **Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Estructura del clorhidrato de la EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida).

Este reactivo se ha empleado para la amidación de diversos polisacáridos como, ácido hialurónico<sup>141-143</sup>, alginato<sup>144,145</sup>, carboximetilcelulosa<sup>146</sup>, diferentes glucuronoxilanos<sup>147</sup> y mucopolisacáridos<sup>148</sup>. En la **Figura 3.2** se muestra un esquema de la reacción general de amidación de los ácidos carboxílicos pertenecientes al ácido  $\alpha$ -D-glucurónico en un glucuronoxilano donde se obtiene el producto amidado y como subproducto una urea sustituida<sup>147</sup>. Cabe destacar que la formación los enlaces C-N en el subproducto es muy importante ya que es la fuerza impulsora de la reacción<sup>138</sup>.



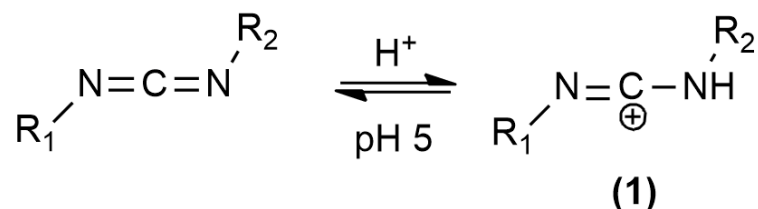
**Figura 3.2.** Reacción de amidación de los ácidos carboxílicos pertenecientes al ácido glucurónico en un glucuronoxilano.

### 3.1.3.1 Mecanismo de la reacción de amidación mediada por EDC

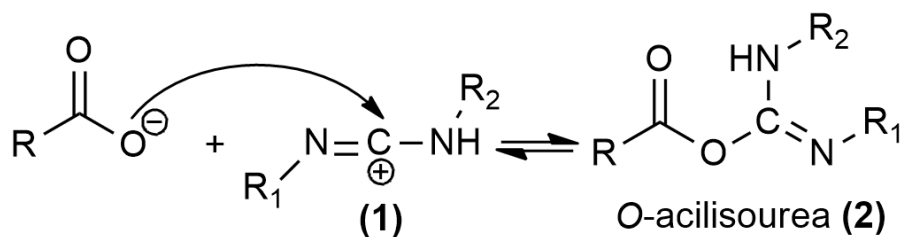
La reacción entre carbodiimidas y ácidos carboxílicos ha sido estudiada extensamente en el siglo pasado. Williams e Ibrahim<sup>149</sup> publicaron un trabajo de revisión en 1981 donde recolectaron numerosos estudios sobre los aspectos cinéticos y mecanísticos de diversas reacciones de carbodiimidas en general y de su reacción con ácidos carboxílicos en particular, aunque pocos de ellos en solución acuosa.

En 1995 Nakajima e Ikada<sup>140</sup> realizaron un estudio detallado de la reacción de amidación de los ácidos carboxílicos de diversos sustratos en presencia de EDC, donde establecieron algunos detalles mecanísticos adicionales de la reacción. Los autores presentaron el estudio de las condiciones óptimas de la reacción en función de la estabilidad de la EDC y de los intermediarios de la reacción. Determinaron que la EDC es estable en solución acuosa a un pH mayor a 4 y que la reacción se optimiza en un rango de pH entre 4,5 y 5<sup>140</sup>, lo cual se encuentra en concordancia con lo informado por otros autores<sup>142,146,150</sup>.

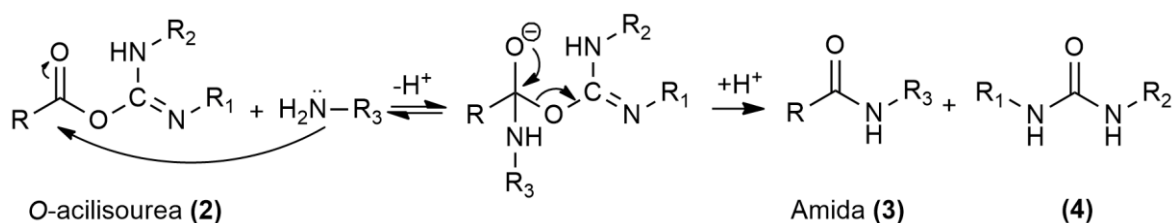
Lo primero que se debe considerar respecto al mecanismo de la reacción de amidación, es el equilibrio ácido-base de la EDC para dar una especie cargada positivamente (**1**):



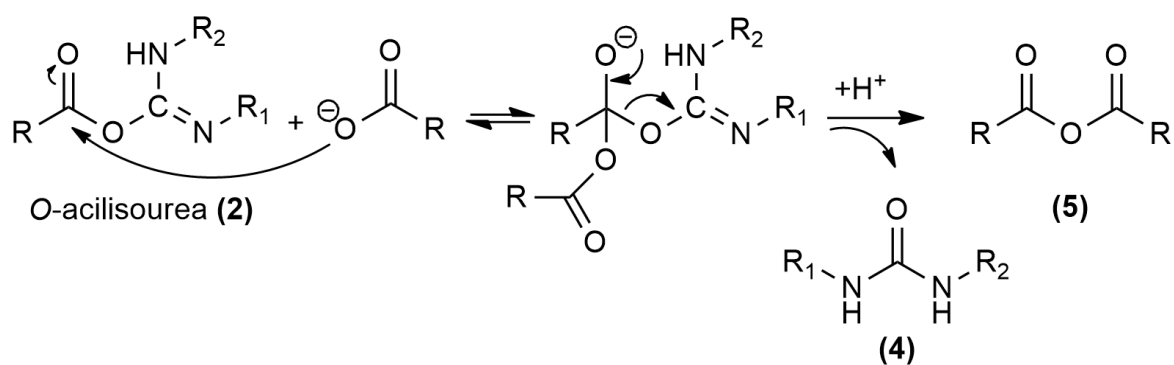
A pH = 5, una proporción significativa de los ácidos carboxílicos presentes en solución se encuentran en su forma desprotonada (pKa ≈ 4,0-4,5<sup>151</sup>), lo que permite plantear un ataque nucleofílico de un carboxilato a la carbodiimida protonada (**1**) para formar un intermediario del tipo *O*-acilisourea (**2**):



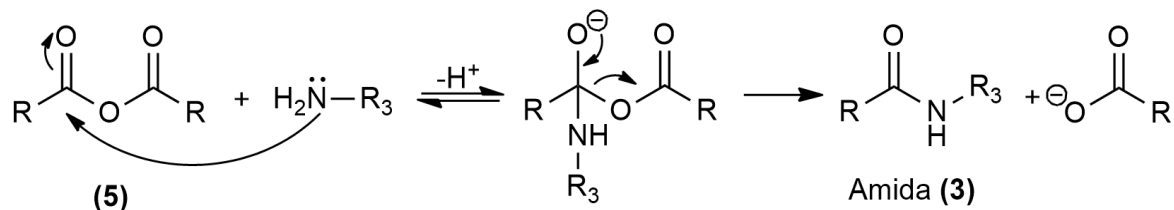
A diferencia de los ácidos carboxílicos, este intermediario (2) es susceptible de sufrir un ataque nucleofílico por parte de una amina primaria a temperatura ambiente dando lugar a la amida (3) y a un derivado de urea como subproducto (4):



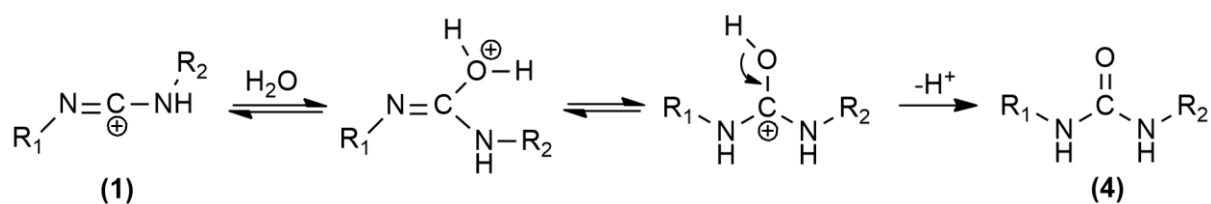
Ahora bien, como describieron Nakajima e Ikada<sup>140</sup>, dependiendo del sustrato que se esté utilizando, puede ocurrir además la formación de un anhídrido (5) por reacción entre otro carboxilato y el intermediario (2):



A su vez, este anhídrido **(5)** es una especie más reactiva que el ácido carboxílico de partida, por lo que puede ocurrir un ataque nucleofílico de la amina al anhídrido a temperatura ambiente y la consiguiente formación de la amida **(3)**:

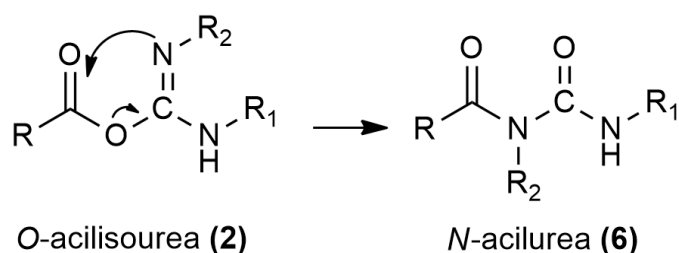


Además de las reacciones mostradas, pueden ocurrir reacciones secundarias. En primer lugar, la carbodiimida protonada **(1)** puede inactivarse generando el derivado de tipo urea **(4)** por reacción con una molécula de agua:



Sin embargo, como fue descrito por Nakajima e Ikada, la carbodiimida mantiene su nivel de actividad hasta un mínimo de 300 minutos a pH mayor o igual a 4, por lo tanto este proceso de inactivación no es relevante en esas condiciones.

No obstante, luego de la formación del intermediario del tipo *O*-acilisourea **(2)**, está descrito en numerosas publicaciones<sup>140,141,146,152</sup> que puede ocurrir un reordenamiento N→O para formar una imida estable del tipo *N*-acilurea **(6)**:



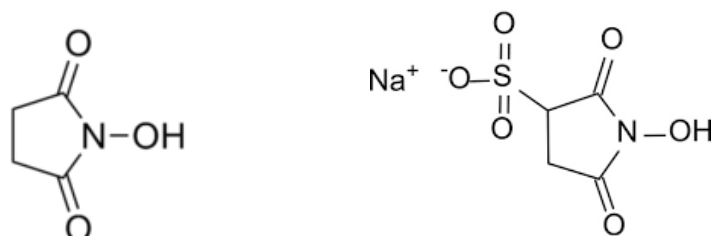
Como la formación de este subproducto es irreversible, no sólo se ve afectada la eficiencia de la reacción de amidación sino que se forma una acilurea como subproducto, la cual puede ser difícil de separar. En el caso de los polisacáridos, no sólo los posibles sitios de reacción quedan permanentemente modificados sino que no es posible separar este subproducto ya que forma parte de los mismos, razón por la cual es especialmente importante minimizar esta reacción secundaria.

Anteriormente se mencionó que esta estrategia sintética ha sido empleada por numerosos autores<sup>141-148</sup> sobre distintos polisacáridos solubles en agua como ácido hialurónico, alginato, etc. En estos estudios, además de realizarse esta reacción sobre sustratos diferentes, se emplearon también diferentes aminas primarias y distintas condiciones de reacción, encontrándose variaciones especialmente en la relación de equivalentes de EDC respecto a los ácidos carboxílicos, el pH de la solución y los tiempos de reacción.

Del análisis minucioso de estas publicaciones puede concluirse que los grados de amidación utilizando únicamente EDC como agente activante resultaron bajos y además en general se observaron altas proporciones del producto secundario del tipo *N*-acilurea. Por ejemplo, Bulpitt y Aeschlimann<sup>153</sup> informaron que al intentar amidar ácido hialurónico con distintas aminas alifáticas empleando únicamente EDC como agente activante no pudieron obtener el producto deseado ya que más del 99 % del producto obtenido fue el derivado de *N*-acilurea. Bystrický et al.<sup>154</sup> reportaron resultados muy similares al utilizar sólo EDC como agente activante para amidar ácido hialurónico.

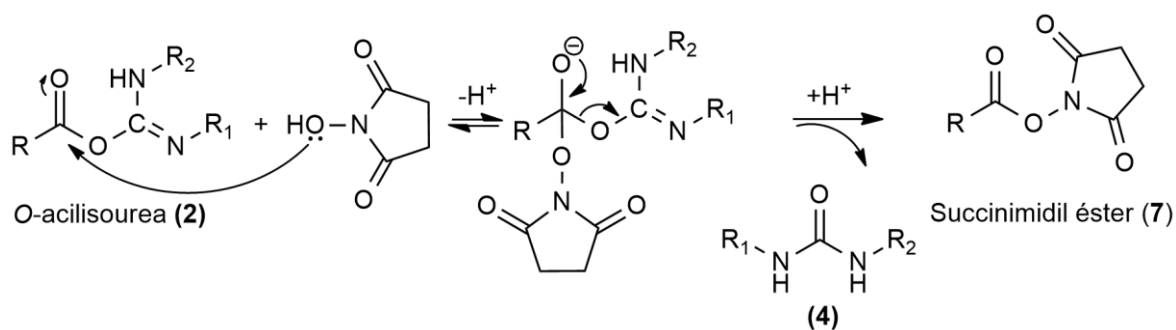
Quien escribe realizó en el marco de la materia de posgrado “Modelado Molecular” dictada en esta casa de estudios un estudio computacional preliminar para determinar si el reordenamiento del derivado (**2**) resultaba más favorable que el ataque nucleofílico por parte de una amina primaria (metilamina) (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.11.3.**). Se pudo determinar que los  $\Delta G_r$  para ambas reacciones son  $< 0$  lo cual implica que ambas reacciones se encuentran termodinámicamente favorecidas, aunque el  $\Delta G^\ddagger$  es aproximadamente 4 kcal/mol menor para la reacción de reordenamiento  $N \rightarrow O$  respecto a la reacción de amidación de la *O*-acilisourea (**2**).

Para minimizar el producto secundario debido al reordenamiento N→O de la *O*-acilurea (**2**) se suele introducir en la reacción N-hidroxisuccinimida (NHS) o su análogo la N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS), que funcionan como un segundo agente activante en conjunto con la EDC<sup>141,145,146,153,155</sup> (ver **Figura 3.3**):



**Figura 3.3.** Estructura de la N-hidroxisuccinimida (izquierda) y de la N-hidroxisulfosuccinimida (derecha).

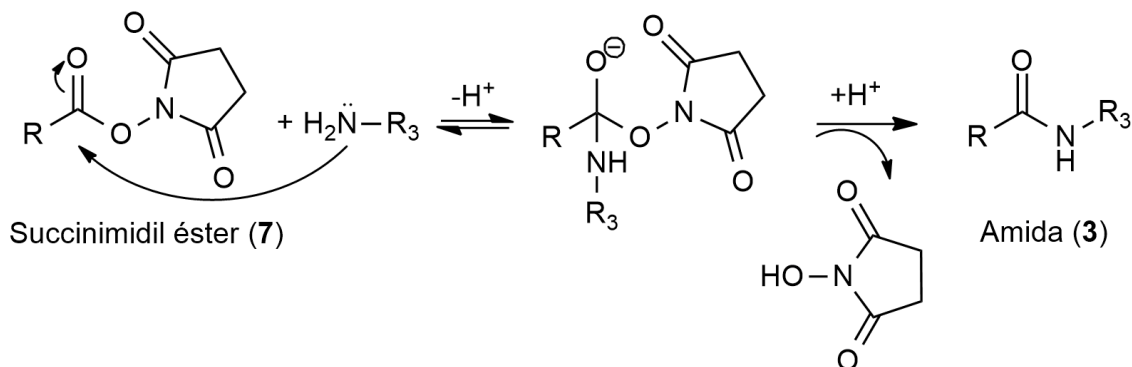
Tanto la NHS como la Sulfo-NHS no reaccionan directamente con los ácidos carboxílicos sino que reaccionan rápidamente con el derivado de *O*-acilisourea (**2**) para formar un succinimidil éster (**7**). El ataque nucleofílico de la NHS sobre **2** libera el derivado de urea (**4**) impulsando la reacción y obteniéndose de este modo el succinimidil éster (**7**):



El intermediario (**7**) es más estable en solución acuosa que el derivado (**2**). Grabarek y Gergely<sup>150</sup> determinaron para el intermediario formado entre la proteína troponina y la NHS un tiempo de vida media a pH 6 de 40 minutos, mientras que los mismos autores determinaron que el derivado (**2**) presenta un tiempo de vida de unos pocos segundos en esas condiciones.



El succinimidil éster (**7**) formado es susceptible de ser atacado por una amina primaria para formar la amida derivada (**3**):



Cabe destacar que luego de la formación de la amida (**3**) se libera la NHS la cual puede volver a reaccionar con el derivado de *O*-acilisourea (**2**) y de esta manera volver a formar el derivado (**7**), por lo que en principio podría utilizarse en cantidades catalíticas.

En la bibliografía se encuentran diversas condiciones de la reacción de amidación que se emplean para maximizar el rendimiento de la misma y minimizar la obtención del producto secundario del tipo *N*-acilurea. Especialmente sensibles son las condiciones de pH utilizadas ya que como se mostró anteriormente, la formación del derivado de *O*-acilisourea (**2**) ocurre cuando parte de la carbodiimida se encuentra protonada, y a su vez una porción de los ácidos carboxílicos se encuentra en su forma desprotonada como carboxilato<sup>151</sup>. Se ha reportado que el pH de compromiso para optimizar estos dos procesos y que tenga lugar de manera eficiente la formación del derivado (**2**) se superponen solo ligeramente y, por lo tanto, numerosos autores han recomendado un rango de pH de 4,5 a 4,75<sup>142,146,148,156</sup>. Sin embargo, para que una vez formada la *O*-acilisourea se produzca la reacción de amidación se necesita que la amina se encuentre desprotonada para que sea nucleofílica, la cual en el rango de pH de 4,5 a 4,75 se va a encontrar mayoritariamente como su ácido conjugado. Por esta razón, en ausencia de NHS, otros autores han recomendado utilizar valores de pH más altos, de 5,5 a 8 si se realiza la reacción de amidación en un solo paso<sup>146,155,157</sup>.

Estas mismas discrepancias en las condiciones óptimas de pH utilizadas se han encontrado en la bibliografía consultada cuando se emplea NHS o Sulfo-NHS en combinación con la EDC para mejorar el rendimiento de la reacción de amidación. Debido a que las mejores

condiciones de pH para la formación del enlace amida difieren de las condiciones para la formación del succinimidil éster, en general se utiliza un valor de pH de compromiso. Sin embargo, este valor varía según el trabajo consultado. Se han utilizado valores de pH disímiles que varían entre 4,5 y 8 para la reacción de formación del succinimidil éster (**7**) a partir del derivado de *O*-acilisourea (**2**)<sup>144,150,158,159</sup>.

Más allá de las discrepancias encontradas en la bibliografía, está estipulado que la reacción entre especies activadas de NHS y aminas primarias es más eficiente a  $\text{pH} \geq 7$  por estar presente en solución una mayor proporción de amina en su forma desprotonada<sup>146</sup>. Por este motivo, en algunos trabajos se presenta una estrategia sintética de dos partes, en donde en una primera instancia se prepara la especie activada con EDC y NHS a un rango de pH levemente ácido y luego en un segundo paso se aumenta el pH y se agrega la amina primaria para realizar la reacción de amidación<sup>144,146</sup>.

En función de obtener un grado de amidación alto de los ácidos carboxílicos disponibles, en bibliografía se han reportado condiciones de reacción donde se emplearon diferentes cantidades de carbodiimida, aun superando las estequiométricas<sup>146</sup>. Se ha informado la utilización de 1,5 a 10 equivalentes de EDC respecto a los ácidos carboxílicos<sup>144,147,153,159,160</sup>, intentando evitar niveles de activación mayores debido a que los mismos pueden conducir a una mayor obtención del producto secundario (**6**)<sup>146</sup>. Además, cabe destacar que no se ha encontrado una relación lineal entre el nivel de activación empleado y el grado de amidación obtenido, por lo que resulta claro que la reacción es dependiente de otros factores.

Teniendo en cuenta la rapidez de la formación del derivado tipo *N*-acilurea a partir del derivado de *O*-acilisourea (**2**), es sensato considerar la necesidad de emplear una proporción igual o mayor de NHS respecto de la carbodiimida EDC, de forma de disminuir la proporción de este producto secundario<sup>146</sup>. En la bibliografía consultada se encontró que generalmente al utilizar la NHS, se la ha empleado en iguales cantidades que la EDC<sup>147,158-161</sup>, lo cual resulta lógico teniendo en cuenta la rapidez de la formación del derivado tipo *N*-acilurea a partir del derivado de *O*-acilisourea (**2**).

En cuanto a la proporción de amina a utilizar, se ha encontrado también una enorme disparidad en las cantidades de equivalentes utilizados. Existen reportes donde se han empleado desde 0,25 equivalentes de amina por ácido carboxílico hasta un exceso de 10 o 30

veces. Al igual que para el activante EDC, tampoco se ha establecido un valor óptimo ni una relación entre la cantidad de amina empleada y el grado de sustitución alcanzado.

En un trabajo publicado en 2013, Madison y Carnali<sup>146</sup> presentan una optimización de la reacción de amidación de la carboximetilcelulosa empleando EDC y NHS como agentes activantes y distintas aminas primarias aromáticas que presentaban la característica de absorber luz en la región UV-Visible. Por un lado, los autores determinaron que cuando utilizaron aminas cuyo pKa presentaba un valor mayor a 7 se obtenían mejores resultados si la reacción se realizaba en dos pasos, un primer paso de activación de los ácidos carboxílicos con EDC y NHS a pH 4,75, y un segundo paso de amidación con la amina empleada a pH 7.

Por otro lado, estos autores pudieron encontrar una expresión matemática que predice de forma aproximada el grado de sustitución alcanzado con distintos parámetros experimentales como el grado de disociación de los ácidos carboxílicos como carboxilatos, la proporción de la EDC en su forma protonada, de la amina en su estado neutro y un factor empírico que tiene en cuenta la inestabilidad de los intermediarios que se forman en la reacción. Si bien los autores aclaran que la expresión hallada no puede utilizarse de forma totalmente cuantitativa, cabe destacar que es el único ejemplo encontrado en la bibliografía de una optimización y consiguiente parametrización del grado de sustitución de esta reacción.

### 3.1.3.2 Toxicidad de la EDC y sus derivados

La carbodiimida soluble en agua EDC se ha utilizado ampliamente en aplicaciones para generar materiales que resulten biocompatibles: en síntesis de hidrogeles inyectables en cirugía<sup>158</sup> o para liberación controlada de fármacos<sup>153</sup>; en la preparación de materiales microencapsulados para inmunosupresión local<sup>160</sup>; para el entrecruzamiento de colágeno para la reconstitución de tendones<sup>162-164</sup>, entre otros. En todos estos casos no sólo se busca obtener productos con ciertas características físico-químicas sino que es sumamente importante que los mismos resulten biocompatibles y que presenten una baja toxicidad.

La ventaja de utilizar esta carbodiimida para este tipo de aplicaciones radica justamente en su baja toxicidad en comparación con otras metodologías<sup>164</sup>. Al ser un agente entrecruzante del tipo “Zero length crosslinker” no queda ningún fragmento del mismo en el

producto final; y además el derivado de urea (4) que se forma presenta una muy baja citotoxicidad<sup>162-164</sup>.

Como se mencionó anteriormente, ya ha sido establecido que la goma brea es segura para consumo humano y para su uso como aditivo en alimentos. Si bien se debe realizar una evaluación toxicológica a los productos modificados a partir de la goma brea en caso de utilizarlos con los mismos fines, es importante destacar que con esta metodología se pudieron obtener distintos materiales biocompatibles de una baja o nula toxicidad para el ser humano.

### **3.1.4 Diseño de experimentos utilizando herramientas de quimiometría para la optimización de la reacción de amidación**

Para llevar a cabo la reacción de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en la goma brea y optimizar las condiciones de la reacción se utilizó un enfoque quimiométrico utilizando el diseño estadístico de experimentos, con el cual se puede obtener una gran cantidad de información acerca del proceso, con una menor cantidad de experimentos que con el enfoque tradicional.

Tradicionalmente, cuando se desea optimizar una reacción química, se emplea un método que consiste en variar solamente uno de los factores (variables) que se cree intervienen en el proceso, dejando todo el resto de los factores constantes de forma de encontrar el valor óptimo de dicha variable. Luego, se repite el proceso con los n factores empleando en cada paso sucesivo los valores óptimos determinados previamente para el resto de los factores.

Si bien esta metodología es sencilla, presenta varias desventajas:

- Se necesita una gran cantidad de experimentos y por lo tanto de tiempo y recursos.
- Se pierden las interacciones entre los distintos factores (interacciones cruzadas de primer orden o de órdenes superiores).
- Al variar un solo factor a la vez se llegan a mínimos/máximos locales en la respuesta de ese factor.

- No se obtiene una parametrización del proceso en función de los factores que intervienen, por lo que no se pueden realizar predicciones de cómo será la respuesta al emplear valores distintos a los optimizados.

En cambio, el diseño estadístico de experimentos es una forma más eficaz de hacer pruebas ya que consiste en determinar cuáles se deben realizar y de qué manera para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder los interrogantes planteados, y clarificar los aspectos inciertos de un proceso, o simplemente lograr mejoras<sup>165</sup>.

Mediante este enfoque se pueden determinar los factores de un proceso que tienen impacto sobre una o más características de la respuesta, por ejemplo maximizar el rendimiento de una reacción y/o encontrar las condiciones óptimas donde se reduzcan o eliminen los productos secundarios<sup>165</sup>.

Para determinar qué factores son importantes, en primer lugar se realiza un experimento que se conoce como *selección de factores*. Este estudio consiste en una serie de experimentos utilizando generalmente combinaciones de dos valores posibles (niveles) de los factores a estudiar y midiendo una respuesta asociada, que puede ser por ejemplo un rendimiento. Como resultado se determina qué factores son significativos y cuáles no alteran la respuesta de este proceso.

Luego, para optimizar dicho proceso se utiliza un enfoque conocido como *metodología de la superficie de respuesta* (MSR). En este estudio se realizan experimentos donde se combinan distintos valores de los factores significativos determinados previamente y se mide la misma respuesta, obteniéndose como resultado una ecuación que describe cómo los factores la modulan, lo que permite predecir la respuesta que se va a obtener con cualquier combinación de los factores que se utilice.

#### **3.1.4.1 Selección de Factores**

Como se explicó anteriormente, la *selección de factores* es un conjunto de experimentos que mediante un diseño factorial permiten estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias variable/s de respuesta (o simplemente respuesta) cuando se tiene inicialmente el

mismo interés sobre todos los factores<sup>165</sup>. Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la/s variable/s de respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos, donde nivel de prueba se refiere a los diferentes valores que se asignan a cada factor estudiado.

Existen distintos tipos de diseños factoriales que se diferencian fundamentalmente en la cantidad de experimentos que se deben realizar y la información que se puede obtener de los mismos. Si bien se pueden utilizar diseños con tres niveles, lo más común es realizar los experimentos de selección de factores con solamente dos niveles, por lo que de forma general se los identifica como diseños de  $2^k$  donde  $k$  es el número de factores a evaluar.

En un diseño factorial completo se realizan experimentos aleatoriamente con todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar<sup>165</sup>. Por ejemplo, con  $k = 2$ , ambos con dos niveles, se forma el diseño factorial  $2^2$ , que consiste en cuatro combinaciones o puntos experimentales ( $2 \times 2$ ). En forma general, la familia de diseños factoriales  $2^k$  consiste en  $2 \times k$  experimentos (o tratamientos).

Cabe destacar que los factores pueden influenciar la respuesta estudiada por su acción individual o por interacción con otros factores. En particular, se define efecto principal a los cambios en la media de la variable de respuesta que se deben a la acción individual de cada factor. En cambio, cuando dos (o más) factores interactúan en conjunto de manera significativa sobre la variable de respuesta se denomina efecto de interacción (doble para dos factores, triple para tres, etc).

Ahora bien, cuando crece el número de factores también aumenta rápidamente el número de tratamientos en los diseños factoriales completos  $2^k$ . En ocasiones en la práctica no es posible hacer tantos experimentos (o como se denomina en la jerga quimiométrica, corridas experimentales). Sin embargo, como es frecuente que en las primeras etapas de una investigación sea de interés estudiar muchos factores, se utiliza una estrategia conocida como diseños factoriales fraccionados que permiten reducir de manera importante el número de tratamientos experimentales, pero perdiendo un mínimo de información valiosa. La teoría de los diseños fraccionados se basa en una jerarquización de los efectos: son más importantes los efectos principales, seguidos por las interacciones dobles, luego las triples, etc, por lo que debido al exceso de información que acumulan los diseños factoriales completos, estos diseños simplificados permiten sacrificar información poco importante reduciendo el número

de corridas experimentales<sup>165</sup>. En general, para poder describir los factores más importantes que intervienen en una reacción, con los efectos principales y los efectos dobles es suficiente. Estos diseños se definen genéricamente como  $2^{k-p}$ , donde  $p$  es un número entero que determina el tamaño del diseño fraccionado, el cual será  $1/2^p$ . Por ejemplo, un diseño experimental completo de dos niveles y 4 factores  $2^4$  está compuesto de 16 corridas experimentales, mientras que un diseño fraccionado  $2^{4-1}$  requiere solamente de la mitad, es decir de 8 experimentos.

Para que los resultados de estos diseños sean robustos se deben cumplir algunos requisitos. Las corridas experimentales se deben realizar en orden aleatorio para aumentar de esta forma la probabilidad de que se cumpla el supuesto de independencia de los errores. Ya que es una manera de asegurar que las pequeñas diferencias provocadas por materiales, equipos y otros factores no controlados se repartan de manera homogénea en todos los tratamientos<sup>165</sup>.

En ocasiones es necesario realizar más de una corrida del mismo experimento, es decir, una repetición. Las repeticiones permiten distinguir mejor qué parte de la variabilidad total de los datos se debe al error aleatorio y cuál a los factores que intervienen en el proceso. Cuando no se hacen repeticiones no hay manera de estimar la variabilidad natural o el error aleatorio, y esto dificulta la construcción de estadísticas realistas.

#### **3.1.4.2 Análisis de los resultados**

Una vez que se lleva a cabo el diseño factorial se debe analizar qué factores son relevantes para la respuesta estudiada y de qué forma la modulan, lo que se conoce como evaluación de los efectos.

Para poder evaluar qué efectos influyen de manera significativa en el proceso estudiado se emplean métodos gráficos que resultan muy útiles, ya que son confiables y sencillos de interpretar. Los diagramas más comunes y utilizados son:

- Diagrama de probabilidad normal (o de Daniel<sup>166</sup>): En este gráfico se muestra la probabilidad acumulada de cada efecto (principales, interacciones dobles, etc) en función de cada efecto estandarizado y se evalúa que el conjunto de los mismos

tenga una distribución normal. Aquellos efectos que se alejan de una línea recta no tienen una distribución normal y por lo tanto son efectos significativos.

- Gráfica de Pareto<sup>165</sup>: este diagrama es una representación en un gráfico de barras de los valores de *t-student* de cada uno de los efectos donde se muestran dos límites visuales que se utilizan para decidir si un efecto es significativo o no. Está establecido que si el valor del estadístico de un efecto supera el límite establecido por el test de hipótesis de *Bonferroni* (límite de *Bonferroni*) es significativo, mientras que si se encuentra entre este límite y un límite inferior dado por el valor de *t-student* crítico a un dado nivel de confianza es posible que lo sea.

Estos dos gráficos se emplean en conjunto para poder tomar una decisión sobre la importancia de un dado efecto. En algunos casos, el resultado obtenido del análisis de estos diagramas se encuentra en una situación límite, por lo que se debe utilizar el conocimiento adquirido sobre el proceso en estudio y el criterio desarrollado para determinar la significancia de un efecto.

En una segunda instancia, una vez seleccionados los efectos que modulan la respuesta del proceso se busca construir un modelo matemático que describa el comportamiento de la misma en función de los factores e interacciones significativos. Para ello se busca ajustar los datos experimentales con distintos modelos sencillos, comúnmente lineales (con y sin interacciones múltiples) o cuadráticos, y mediante el método de análisis de la varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) se determina qué modelo se ajusta mejor a esos datos. Para cada uno de los modelos se calculan distintos parámetros: la significancia de la regresión (idoneidad del modelo); la “falta de ajuste” (*lack of fit*); y el coeficiente de determinación ( $R^2_{\text{ajuste}}$ ). Se selecciona aquel modelo que presente los mejores parámetros y por lo tanto el ajuste más adecuado.

Sin embargo, para que el ANOVA sea estadísticamente válido se necesitan verificar tres supuestos que los resultados dados por los tratamientos y el modelo deben cumplir: normalidad, homocedasticidad (varianza constante) e independencia de los residuos.

El supuesto de normalidad establece que los residuos (es decir, la diferencia entre los valores de la variable observados y los predichos por el modelo de regresión) deben seguir una distribución normal. Se verifica mediante un gráfico de probabilidad normal donde se



observa si los residuos quedan alineados en una línea recta, lo que indica que este supuesto se cumple.

El segundo supuesto, de homocedasticidad, implica que la varianza de cada uno de los tratamientos del diseño factorial empleado es igual dentro de un margen estadístico. Esto se verifica mediante un gráfico de los residuos en función del valor predicho por el modelo de ajuste, donde se debe observar que los puntos se distribuyen de una forma aleatoria y con una amplitud similar. Si se encontrara un patrón definido o puntos con una amplitud mucho mayor al resto se debe repetir el experimento.

El supuesto de independencia radica en que no exista una relación entre los tratamientos y el orden en que los mismos se ejecutaron. Esto se puede verificar graficando los residuos en función del orden de los tratamientos y se debe apreciar una distribución aleatoria. Si se observara alguna tendencia se deben descartar los datos experimentales ya que existe algún error sistemático en los datos.

Una vez seleccionado el modelo de ajuste más idóneo, se debe analizar la existencia de valores atípicos de la respuesta estudiada, es decir, de valores asociados a los tratamientos realizados que presenten una respuesta significativamente distinta a la esperada, con una diferencia mayor a dos desvíos estándar entre el valor predicho por el ajuste y el experimental. Estos valores atípicos se conocen como puntos influyentes, y su presencia se determina mediante métodos gráficos que se utilizan en conjunto. Generalmente se emplean tres pruebas estadísticas distintas: DFFITS, DFFBETAS y la Distancia de Cook.

El primero de estos, DFFITS (*Difference Between Fitted Values*), es un gráfico donde se muestra la cantidad de desviaciones estándar ( $s$ ) que un punto se aleja del valor predicho, cuyo punto de corte es  $2s$ . Los otros dos diagramas son similares, y lo que se aprecia es cuánto cambian los coeficientes de la regresión si se elimina un dado experimento. Si el cambio es estadísticamente pequeño entonces se considera que el punto eliminado no se aleja de la respuesta esperada y por lo tanto no es un punto influyente.

En caso de que se determine que existe algún punto influyente se recomienda repetir dicho tratamiento para corroborar que el valor experimental hallado no presentaba un error significativo.

Para poder tener una visualización de la ecuación del ajuste hallada se puede construir un gráfico de tres dimensiones donde se representa la superficie de respuesta sobre la región experimental<sup>165</sup>. Cuando se tienen más de dos factores significativos, se construyen gráficos por pares de factores donde se puede apreciar cómo se comporta la respuesta dada esa combinación de factores.

Cabe destacar que cuando se utilizan diseños factoriales fraccionados  $2^{k-p}$  se define un nivel de resolución dependiendo de la combinación de  $k$  y  $p$ . Según esa resolución algunos efectos (triples, dobles o inclusive principales) van a ser alias de otros, lo que significa que al estimar uno de ellos al mismo tiempo se estima el otro, de manera que no se pueden separar<sup>165</sup>. Por lo tanto, cuando se utilizan este tipo de diseños se busca que los mismos tengan como mínimo un nivel de resolución IV, lo que implica que los efectos principales estén debidamente identificados pero que algunas interacciones dobles estarán alias con otras<sup>165</sup>. Dependiendo de cuáles sean los efectos principales significativos, este hecho puede no ser relevante en el modelo de ajuste hallado.

#### **3.1.4.3 Optimización de una reacción con la metodología de la superficie de respuesta**

Como se mencionó anteriormente, una vez hallados los factores significativos y teniendo una idea aproximada de cómo modulan la respuesta, para optimizar de forma más fina el proceso y poder describir en detalle la respuesta en estudio, se utiliza el enfoque conocido como “metodología de la superficie de respuesta” (MSR).

En este tipo de experimentos se deben considerar dos parámetros que son la *región experimental* y la *región de operabilidad*. La *región experimental* es el espacio delimitado por los rangos de experimentación utilizados con cada factor, mientras que *la región de operabilidad* está delimitada por el conjunto de puntos o condiciones donde el equipo o proceso puede ser operado<sup>165</sup>. En la MSR es importante tener presente esta visión de las regiones de operabilidad y experimental, ya que en principio, el punto óptimo que interesa encontrar podría localizarse en cualquier lugar de la región de operabilidad, dentro o afuera de la región experimental inicial<sup>165</sup>. En procesos ya establecidos y muy estudiados, es de

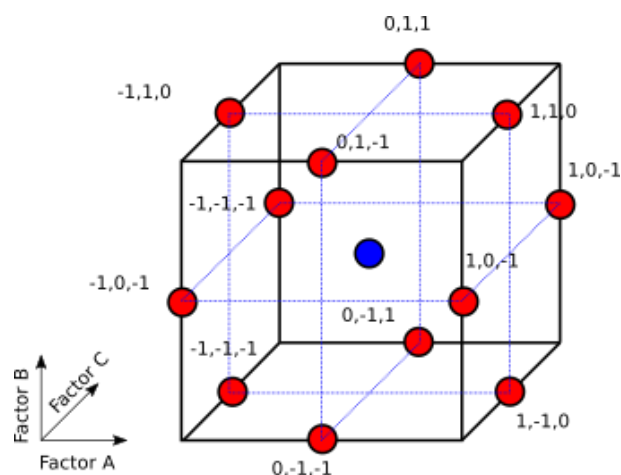
esperarse que dicho punto óptimo se encuentre “no muy lejos” de las condiciones de operación usuales, posiblemente dentro de la región experimental inicial.

Cabe destacar que en los diseños factoriales se puede encontrar el mejor tratamiento o mejor combinación de niveles de los factores estudiados. En cambio, con la MSR se puede encontrar el punto óptimo, esto es, la mejor combinación posible en toda la región de operabilidad para la respuesta buscada<sup>165</sup>.

Para utilizar esta metodología se debe crear un diseño experimental en base a los factores significativos anteriormente encontrados. De forma similar a los experimentos de selección de factores, se debe escoger un diseño en función de la cantidad de niveles de cada factor y a los efectos que interesa investigar, en relación con el ajuste matemático que se quiere alcanzar. Por esta razón estos diseños se dividen según si se tiene un modelo de primer o de segundo orden. En general, si se tiene conocimiento sobre el proceso en estudio y la región experimental en donde puede encontrarse el punto óptimo se emplean directamente los diseños de segundo orden. Además, estos modelos de segundo orden pueden ser simétricos o no simétricos.

Dentro de los diseños de tipo simétricos de segundo orden, los más comunes son el *diseño central compuesto* y el Box-Behnken<sup>167</sup>. Si bien estos presentan algunas diferencias, la construcción de estos diseños es similar y se pueden emplear indistintamente cualquiera de los dos, siempre que el número de factores ( $k$ ) sea mayor o igual a 3. En este trabajo de Tesis se utilizó un diseño de tipo Box-Behnken ya que el mismo requiere una cantidad de experimentos menor que un diseño central compuesto.

En la **Figura 3.4** se puede observar un esquema de este diseño para  $k = 3$  y 3 niveles para cada factor, donde se disponen los tratamientos dispuestos en un espacio tridimensional contenido en un cubo. Los valores de los niveles se suelen expresar en forma codificada como -1, 0 y 1. El punto central (de color azul) es aquel que presenta los valores (0; 0; 0) y generalmente se realiza por triplicado para poder calcular el parámetro *falta de ajuste*, lo que le da más robustez a los resultados. La fórmula general para la cantidad de puntos experimentales que requiere este diseño es  $N = 2k(k-1) + C_0$ , donde  $C_0$  es el punto central.



**Figura 3.4.** Esquema de un diseño Box-Behnken expresado en términos de factores codificados. Diseño para 3 factores con 3 niveles.

Una vez que se construye el diseño a utilizar y se realizan los experimentos, se deben ajustar los resultados con un modelo empleando como herramienta estadística el ANOVA y buscando un ajuste tal que el  $R^2_{adj}$  sea mayor a 0,7. Con el modelo de ajuste se pueden realizar predicciones sobre el comportamiento de la respuesta en puntos no medidos y se puede evaluar la calidad del mismo.

## 3.2 Resultados obtenidos

### 3.2.1 Estudios preliminares

#### 3.2.1.1. Selección del protocolo experimental

Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis era conseguir amidar los grupos carboxilo presentes en la goma brea para modular sus propiedades reológicas. Sin embargo, como se mencionó en la parte introductoria de este capítulo, en la bibliografía consultada no se encontró un consenso sobre las condiciones experimentales óptimas para realizar la amidación en solución acuosa de los ácidos carboxílicos presentes en un polisacárido.

Por esta razón, en primera instancia, se realizó un estudio de la reacción con el objetivo de maximizar el rendimiento y disminuir la presencia de productos secundarios. Con algunos

experimentos con fines exploratorios, se buscó verificar que la reacción tuviera lugar y al mismo tiempo obtener información para determinar los posibles factores que intervienen en la reacción y de esta forma decidir qué estrategia sintética resultaba más conveniente.

Para llevar a cabo estas reacciones se emplearon distintas condiciones experimentales teniendo en cuenta lo analizado en la bibliografía consultada, utilizando cantidades variables EDC, NHS y empleado n-propilamina como amina primaria. Además de variar los equivalentes empleados de los reactivos, se probaron 3 protocolos distintos para determinar qué estrategia sintética permitía obtener los mejores resultados, los cuales se pueden observar en la **Tabla 3.1**. Los procedimientos experimentales detallados se encuentran en el **Capítulo 5**.

En la mayoría de los casos (protocolo 2), la reacción se condujo a pH = 5 y a temperatura ambiente, formando intermediarios más reactivos *in situ* en presencia de la amina. En algunos casos, la reacción se realizó en dos pasos, primero formando el intermediario más reactivo a pH = 5 y luego agregando la amina, pudiendo llevar la reacción a otro valor de pH (protocolo 3).

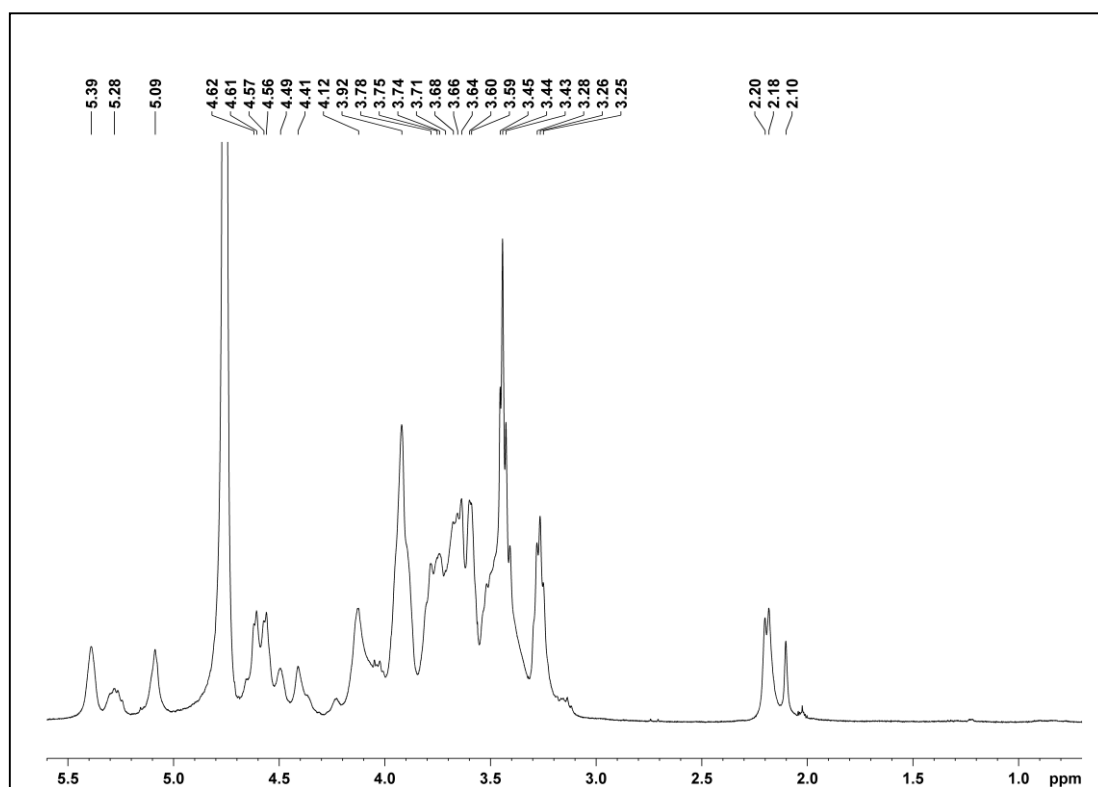
**Tabla 3.1.** Protocolos experimentales empleados en los estudios preliminares de la reacción de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en **GB** con propilamina y el sistema EDC-NHS.

Protocolo	Orden agregado reactivos	pH	Temperatura	Tiempo
1	1) <b>GB</b> + EDC	5	25 °C (amb.)	2 h
	2) NHS + propilamina	5	25 °C (amb.)	2 h
2	1) <b>GB</b> + propilamina	5	25 °C (amb.)	15 min
	2) EDC + NHS	5	25 °C (amb.)	16 h
3	1) <b>GB</b> + EDC + NHS	5	10 °C	15 min
	2) Propilamina	5 – 11,5	25 °C (amb)	16 h

En la **Tabla 3.2** se muestran los diferentes experimentos realizados indicando la cantidad de equivalentes de los reactivos utilizados y el protocolo empleado. También se indicó si se observó la formación de la amida y/o de la *N*-acilurea sobre los ácidos urónicos. Cada reacción se identificó utilizando la letra “A” para indicar que se realizó una reacción de amidación y una abreviatura para indicar que la fuente de amina empleada (Pr = propilamina). La última reacción consignada en la tabla fue realizada en ausencia de amina para obtener mayor información sobre algunos productos secundarios (ASA = en ausencia de amina)

Los resultados de estos experimentos preliminares se analizaron mediante espectros de RMN-<sup>1</sup>H de forma cualitativa, para lo cual se identificaron las señales que se originan por la propilamina una vez incorporada al polisacárido y a su vez las señales que se relacionan con la formación de productos secundarios que modifican a los polisacáridos de **GB**.

En la **Figura 3.5** se muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **GB** donde se puede apreciar tal como se describió en el **Capítulo 2** que en la zona de desplazamientos químicos por debajo de 3 ppm sólo se observan 3 señales significativas con  $\delta$  de 2,20, 2,18 y 2,10 ppm que se corresponden con los hidrógenos metílicos de los grupos acetilo



**Figura 3.5.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) de GB en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

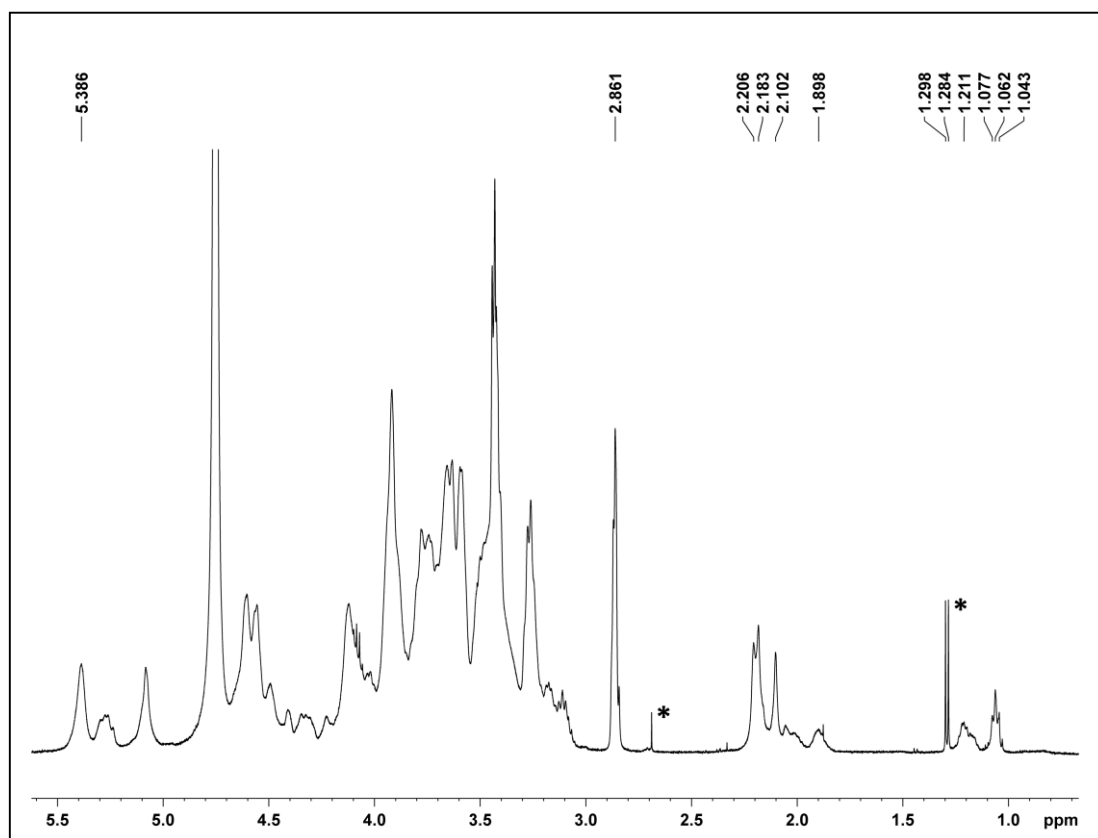
**Tabla 3.2.** Condiciones experimentales empleadas para el estudio preliminar de la reacción de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en **GB** empleando EDC, NHS y propilamina.

Experimento	EDC (Eq.)	NHS (Eq.)	Propilamina (Eq.)	[GB] % (m/m)	Protocolo	Formación de la amida*	Formación de la <i>N</i> -acilurea*
GB-APr-1	1	1	1	0,2 %	1	No	Sí (+++)
GB-APr-2	1	1	10	0,2 %	1	No	Sí (+++)
GB-APr-3	1	1	100	0,2 %	1	No	Sí (+++)
GB-APr-4	1	1	10	0,2 %	2	Sí (++)	Sí (+)
GB-APr-5	1	1	100	0,2 %	2	Sí (++)	Sí (+)
GB-APr-6	1	10	1	0,2 %	2	No	No
GB-APr-7	1	10	10	0,2 %	2	Sí (+)	No
GB-APr-8	1	10	100	0,2 %	2	Sí (+)	No
GB-APr-9	1	2	10	0,2 %	2	Sí (++)	Sí (+)
GB-APr-10	1	3	10	0,2 %	2	Sí (++)	Sí (+)
GB-APr-11	1	5	10	0,2 %	2	Sí (++)	Sí (+)
GB-APr-12	1	20	10	0,2 %	2	Sí (+)	No
GB-APr-13	1	10	100	0,2 %	3 (Paso 2 a pH 7)	Sí (++)	No
GB-APr-14	1	10	100	0,2 %	3 (Paso 2 a pH 9)	Sí (+)	No
GB-APr-15	1	10	100	0,2 %	3 (Paso 2 a pH 11,5)	Sí (+)	No
GB-APr-16	1	1	100	0,2 %	3 (Paso 2 a pH 7)	Sí (++)	Sí (+)
GB-APr-17	10	10	100	0,2 %	2	Sí (+++)	Sí (+)
GB-APr-18	10	10	100	0,2 %	3, (Paso 2 a pH 7)	Sí (+++)	Sí (+)
GB-APr-19	10	2	1	0,1 %	3, (Paso 2 a pH 6)	No	No
GB-ASA	10	10	0	0,2 %	2	No	Sí (+++)

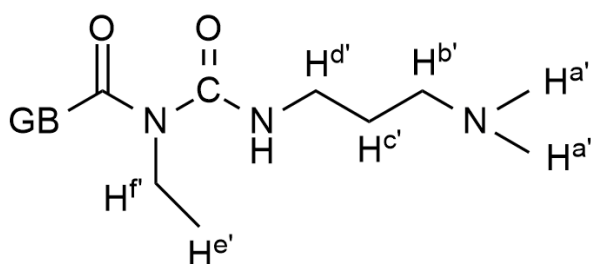
\* Formación de la amida o de la *N*-acilurea sobre los ácidos urónicos presentes en **GB**.

Nota. Un signo (+) corresponde a una proporción molar de 0-5 %, (++) corresponde a 5-10 % y (+++) está asociado a un valor > 10 %.

En la **Figura 3.6** se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido para el producto GB-APr-1, donde se observan, además de las señales correspondientes a los grupos aceto, un conjunto de señales adicionales con  $\delta$  de 2,86, 1,90 1,21 y 1,06 ppm. Los desplazamientos químicos de estas señales coinciden con lo informado en bibliografía para hidrógenos pertenecientes al derivado de *N*-acilurea<sup>141,142,145,154</sup>. La asignación completa de estas señales se puede observar en la **Tabla 3.3** y la identificación de dichos hidrógenos se muestra en la **Figura 3.7**.



**Figura 3.6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) del producto GB-APr-1 en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente. \* = impurezas.



**Figura 3.7.** Asignación de los hidrógenos del derivado de *N*-acilurea.



**Tabla 3.3.** Asignación de las señales originadas en los ácidos carboxílicos modificados con el derivado de *N*-acilurea.

Desplazamiento químico (ppm)	Integración	Asignación
>3 <sup>a</sup>	2	H-b'
>3 <sup>a</sup>	2	H-f'
2,86	6	H-a'
1,90	2	H-d'
1,21	2	H-c'
1,06	3	H-e'

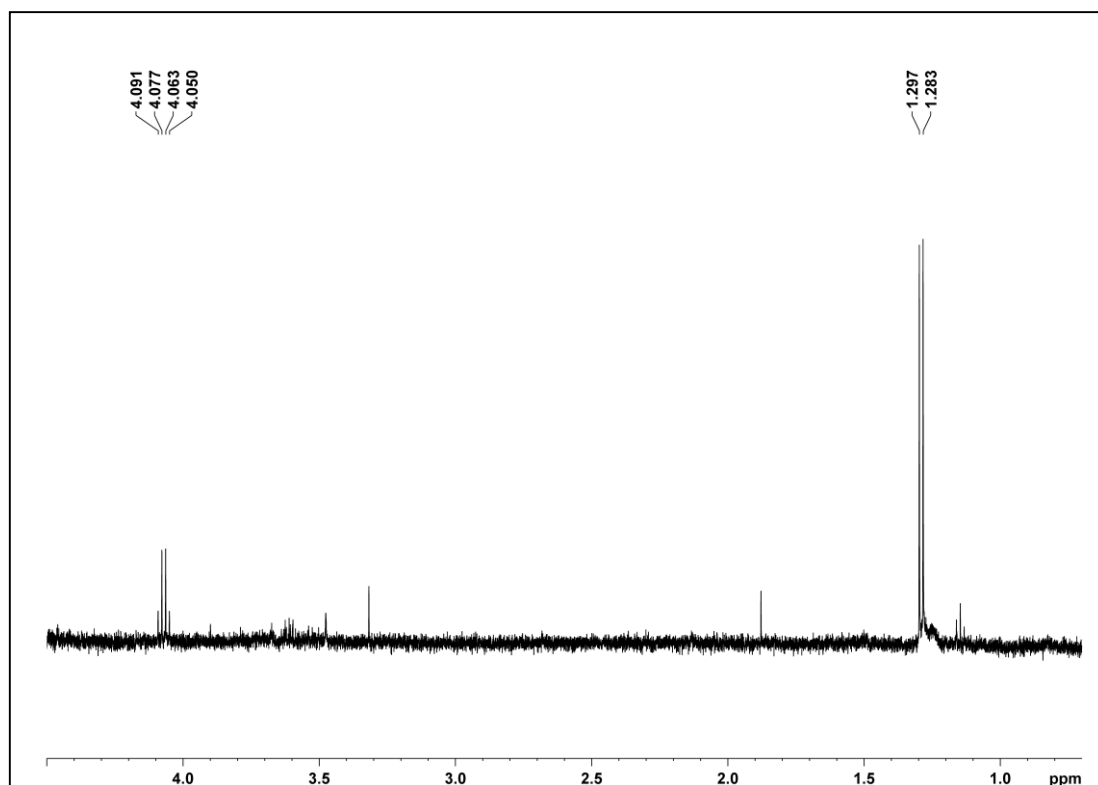
<sup>a</sup> Los hidrógenos H-b' y H-f' presentan desplazamientos químicos mayores a 3 ppm por lo que no pudieron ser identificadas<sup>142</sup>.

La señal con  $\delta$  de 2,86 ppm se corresponde con los 6 hidrógenos de los grupos metilo de la amina terciaria (H-a') (ver **Figura 3.6** y **Tabla 3.3**) y dada su buena resolución con respecto a otras señales ha sido utilizada en distintos trabajos como señal diagnóstico de este producto secundario no deseado<sup>141,142,145,154</sup>.

Como se muestra en la **Tabla 3.3**, las señales originadas en los hidrógenos b' y f' presentan desplazamientos químicos mayores a 3,0 ppm por lo que se superponen con señales del resto del polisacárido y no pudieron identificarse en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H mostrado<sup>142,145</sup> (ver **Figura 3.6**). Las señales restantes, con desplazamientos químicos de 1,06, 1,21 y 1,90 ppm se corresponden con los hidrógenos H-e', H-c' y H-d' respectivamente. Cabe destacar que estas señales son anchas y presentan una resolución pobre, la cual es una característica habitual de encontrar en los espectros de los polisacáridos.

Por otro lado, en el espectro anterior se aprecian dos señales con desplazamientos químicos de 1,29 y 2,69 ppm que fueron marcadas con un asterisco (\*). Dichas señales se corresponden a impurezas que se encontraron en los productos finales que provienen del agua destilada y que lamentablemente no se han podido eliminar. En particular, la impureza que origina un doblete con  $\delta$  de 1,29 ppm se ha encontrado en la mayor parte de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H realizados de los productos amidados y se sospecha que esta impureza que se encuentra en el agua queda presente en el material de vidrio lavado y/o se adiciona a la goma brea amidada en el paso de purificación por diálisis contra agua destilada. En cambio, la señal con desplazamiento de 2,69 ppm se encontró esporádicamente, siempre con baja intensidad y se asoció a otra impureza.

Sobre una muestra de agua destilada que se concentró por liofilización y posteriormente se le realizó un RMN de  $^1\text{H}$  reconstituyendo la muestra en  $\text{D}_2\text{O}$  (ver **Figura 3.8**), se pudo establecer que en conjunto con el doblete mostrado a 1,29 ppm se encuentra un multiplete con desplazamiento químico de 4,07 ppm. Ambas señales presentan el mismo  $J$  (6,9 Hz) y en el espectro TOCSY realizado sobre un producto de la reacción de amidación (no mostrado), se puede apreciar una señal de correlación entre dichos hidrógenos. Toda esta información espectroscópica indica que es altamente probable que esta impureza sea ácido láctico, ya que los espectros obtenidos coinciden totalmente con los originados por este compuesto<sup>168</sup>. Lamentablemente, los numerosos intentos realizados para eliminar esta impureza no fueron exitosos.

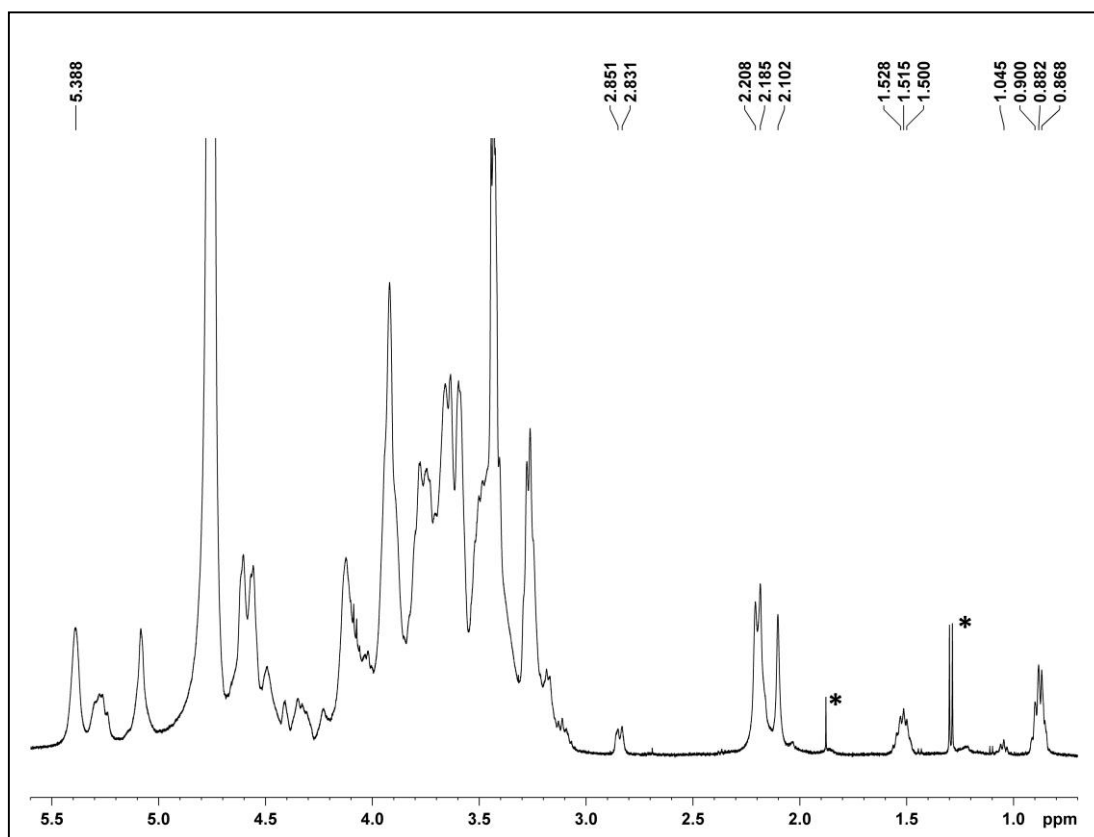


**Figura 3.8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  realizado a agua destilada liofilizada y reconstituida en  $\text{D}_2\text{O}$  utilizada para enjugar material de laboratorio.

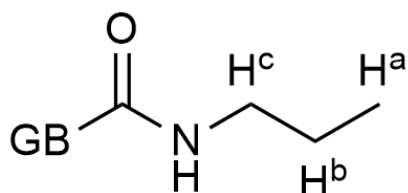
Retomando el análisis de la **Figura 3.7**, los resultados obtenidos indican que con las condiciones experimentales empleadas para la reacción GB-APr-1 no se encontró evidencia en las señales obtenidas de la formación de un enlace amida con propilamina. Además, se

obtuvieron espectros de RMN de  $^1\text{H}$  similares para los productos GB-APr-2 y GB-APr-3, indicando que el protocolo 1 (ver **Tabla 3.1**) no resultaba eficiente.

En las **Figuras 3.9** y **3.11** se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido para el producto GB-APr-5 que fue realizado en las mismas condiciones experimentales que la reacción GB-APr-3 pero con el protocolo 2 (donde en primer lugar se prepara una solución con el polisacárido y la amina y luego se agrega conjuntamente la EDC y la NHS). Asimismo, en la **Figura 3.10** se muestra la identificación de los hidrógenos de la N-propilamida.



**Figura 3.9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto GB-APr-5 en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.  
\* = impurezas.



**Figura 3.10.** Asignación de los hidrógenos de la amida formada.

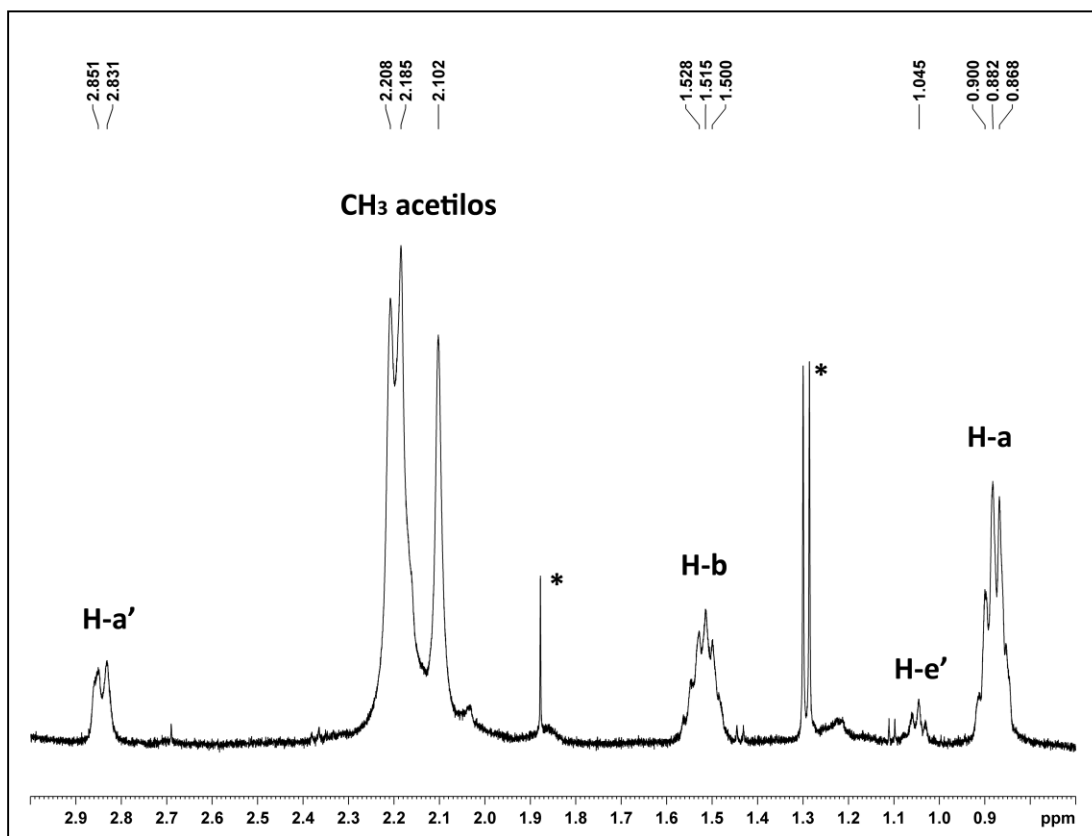


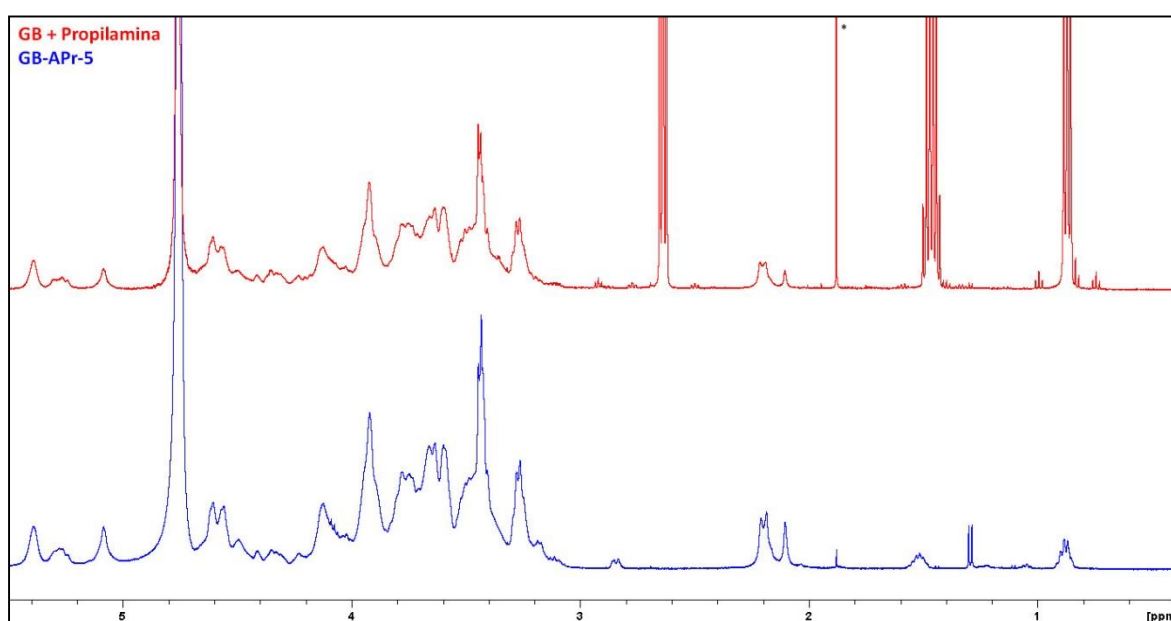
Figura 3.11. Ampliación del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto GB-APr-5. \* = impurezas.

En estos espectros se pueden apreciar dos señales diagnósticas con desplazamientos químicos de 0,88 y 1,52 ppm que no se encontraban en los productos obtenidos con el protocolo 1 y que se corresponden a los hidrógenos H-a y H-b del producto amidado (ver **Figura 3.11**). Además, se observa que si bien se obtuvieron señales originadas en el derivado de *N*-acilurea, las mismas son menos intensas que las mostradas anteriormente. Este resultado indica que mediante el protocolo 2 se pudieron amidar parcialmente los ácidos carboxílicos presentes en la **GB**, pero que también sobre algunas de estas unidades se formó el derivado de *N*-acilurea.

Al comparar el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto GB-APr-4 realizado en las mismas condiciones que el producto GB-APr-5 pero con 10 equivalentes de propilamina, se observaron resultados similares aunque cualitativamente se detectó un grado de amidación levemente menor que al utilizar 100 equivalentes de propilamina.

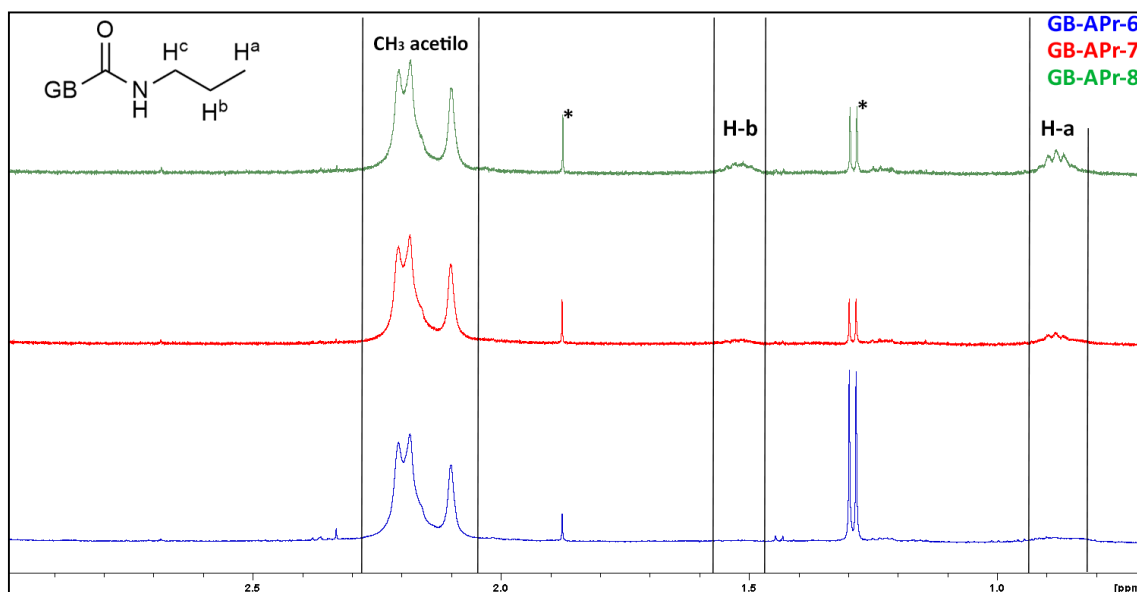
Si bien las reacciones llevadas a cabo se purificaron por diálisis, se buscó verificar que las señales encontradas en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se correspondieran efectivamente a

hidrógenos de la propilamida y no un exceso de propilamina sin reaccionar. Por esa razón, se realizó un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a una muestra de **GB** a la que se agregó propilamina (ver **Figura 3.12**). En este espectro se aprecia que las señales originadas en la propilamina son más finas y presentan una mayor resolución respecto a los espectros de los productos obtenidos, además de que dichas señales poseen desplazamientos químicos levemente distintos. Estas evidencias espectroscópicas confirman que las señales observadas en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los productos obtenidos pertenecen a hidrógenos de la propilamina incorporada en la goma brea.



**Figura 3.12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  realizado a la **GB** a la cual se agregó propilamina. \* = impurezas.

Para observar el efecto de utilizar mayores cantidades de NHS se realizaron 3 reacciones empleando 10 equivalentes de la misma, un equivalente de EDC y cantidades crecientes de propilamina (GB-APr-6, GB-APr-7 y GB-APr-8). Los resultados se pueden apreciar en la **Figura 3.13**, donde se superpusieron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  en la zona de desplazamientos químicos entre 0,7 a 3 ppm.



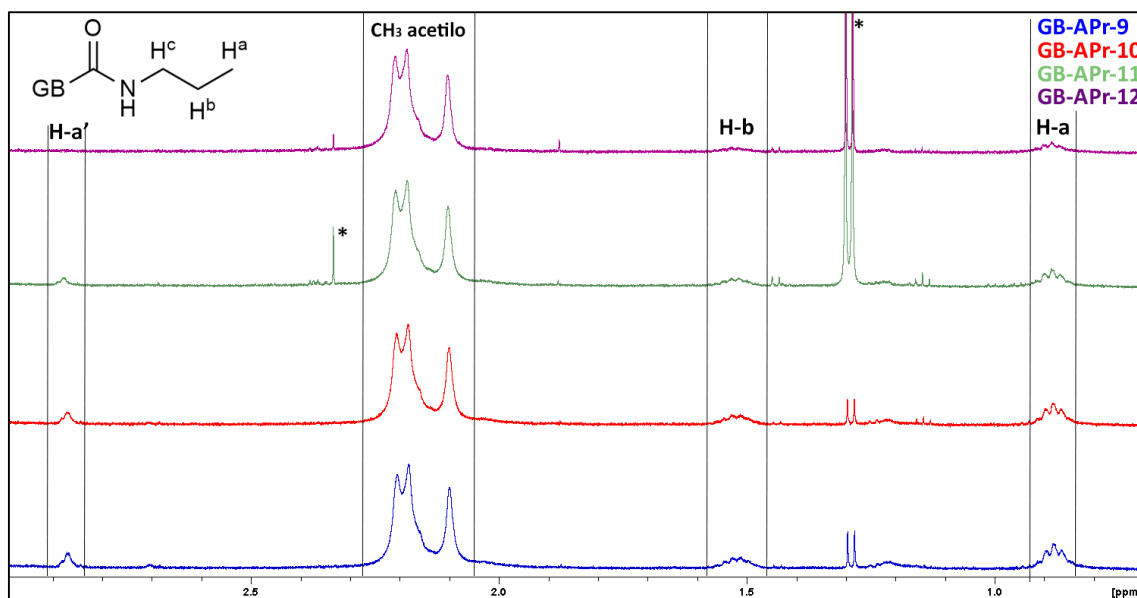
**Figura 3.13.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos para los productos GB-APr-6, GB-APr-7 y GB-APr-8. \* = impurezas.

En la **Figura 3.13** se puede apreciar en primer lugar que no se observan señales compatibles con la presencia de la formación de la *N*-acilurea sobre los ácidos urónicos. Este resultado indica que probablemente al aumentar la cantidad de equivalentes de NHS se forma más rápidamente el succinimidil éster (**7**) que el derivado de tipo *N*-acilurea (**6**) por reordenamiento del intermediario (**2**).

Sin embargo, se puede observar en el espectro del producto del experimento GB-APr-6 prácticamente la ausencia de señales que indiquen la formación de la amida buscada (**3**), mientras que para los productos GB-APr-7 y GB-APr-8 sí se obtuvieron señales que indican que la reacción fue exitosa, obteniéndose los mejores resultados al emplear un exceso de amina respecto de NHS (GB-APr-8). No obstante, se aprecia de forma cualitativa que el grado de amidación alcanzado fue menor que para el producto GB-APr-5. Es decir que al aumentar la cantidad de equivalentes de NHS respecto de EDC se pudo evitar la formación de productos secundarios pero a expensas del grado de amidación conseguido.

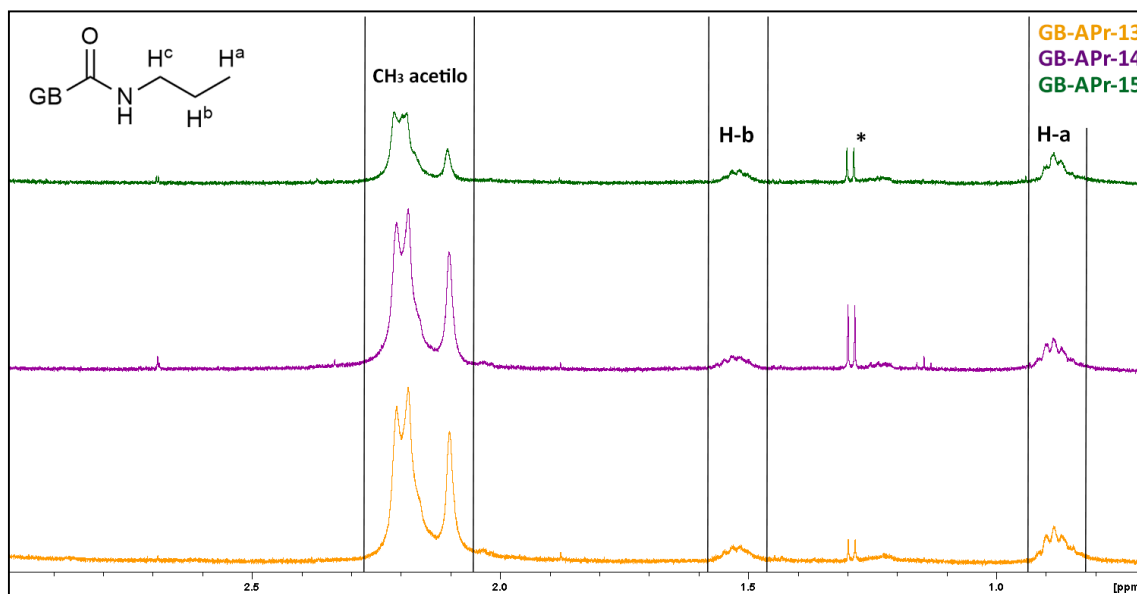
Para poder obtener mayor información sobre la influencia de la NHS sobre el grado de amidación, se realizaron los experimentos GB-APr-9 a GB-APr-12, mostrándose en la **Figura 3.14** los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  conseguidos en cada caso. Para llevar a cabo estas reacciones se utilizó el protocolo 2 variando los equivalentes de NHS de 2 a 20 empleando 1 equivalente

de EDC y 10 de propilamina. Se puede apreciar al comparar los espectros de RMN que al aumentar la cantidad de equivalentes de NHS se disminuye la proporción de *N*-acilurea unida a los ácidos urónicos, pero al mismo tiempo se obtiene un grado de amidación menor.



**Figura 3.14.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los productos GB-APr-9 a GB-APr-12. \* = impurezas.

Por otro lado, se llevaron a cabo algunas reacciones empleando un esquema en dos pasos (protocolo 3) como fue publicado por Madison y Carnali<sup>146</sup>. En primer lugar se agregaron a una solución de **GB** la EDC y la NHS y se mantuvo a pH = 5 y 10°C por 15 minutos. Luego se adicionó la propilamina y se ajustó el pH alcanzando valores de 7, 9 u 11,5 según el experimento (GB-APr-13, GB-APr-14 y GB-APr-15 respectivamente). En los tres casos la reacción fue llevada a cabo con la misma relación de reactivos que para el producto GB-APr-8. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura 3.15**.



**Figura 3.15.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los productos GB-APr-13, GB-APr-14 y GB-APr-15.  
\* = impurezas.

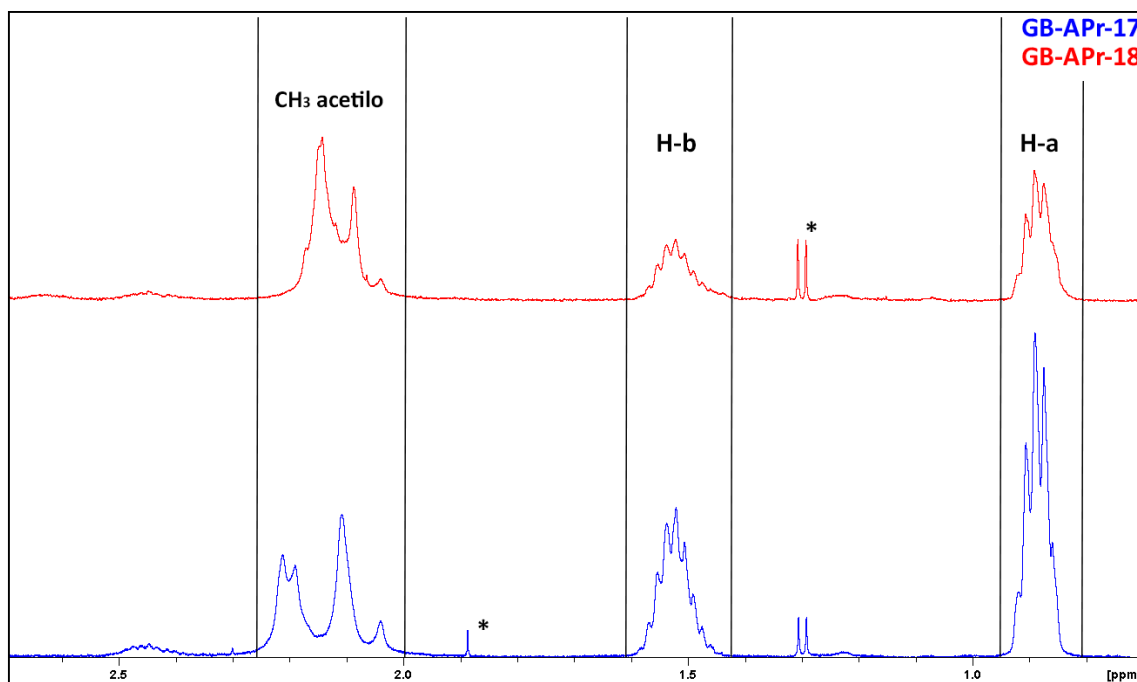
De los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos para los productos conseguidos de los experimentos GB-APr-13 a GB-APr-15 se puede observar que con el protocolo empleado (protocolo 3) se pudo obtener la amida buscada en una proporción cualitativamente similar a la obtenida con el protocolo 2 (GB-APr-8). Al comparar los resultados a distintos valores de pH, se puede ver cualitativamente que para las tres condiciones estudiadas se obtuvieron grados de amidación similares. Asimismo en los tres casos no se encontraron señales compatibles con la presencia de productos secundarios del tipo *N*-acilurea. Cabe destacar que para el producto GB-APr-15, en el cual no se ajustó el pH luego del agregado de la propilamina, se observó una pérdida de grupos acetilo debido a la alcalinidad de la solución resultante.

En función de los resultados obtenidos, se realizaron algunos experimentos adicionales empleando la misma proporción de reactivos utilizando los protocolos 2 y 3 con el objetivo de compararlos y seleccionar el mejor.

Para ello se realizó la reacción GB-APr-16 con las mismas condiciones experimentales que GB-APr5 pero-utilizando el protocolo 3. Además, se obtuvieron los productos GB-APr-17 y GB-APr-18 empleando 10 equivalentes de EDC, 10 equivalentes de NHS y 100 equivalentes de propilamina con los protocolos 2 y 3 respectivamente.



En la **Figura 3.16** se muestran los resultados obtenidos para los productos GB-APr-17 y GB-APr-18, donde se puede apreciar que se obtuvo un mayor grado de amidación para el producto realizado con el protocolo 2. Cabe señalar que el patrón de señales de RMN originadas en los metilos de los grupos acetilo cambia al aumentar el grado de amidación.



**Figura 3.16.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los productos GB-APr-17 y GB-APr-18. \* = impurezas.

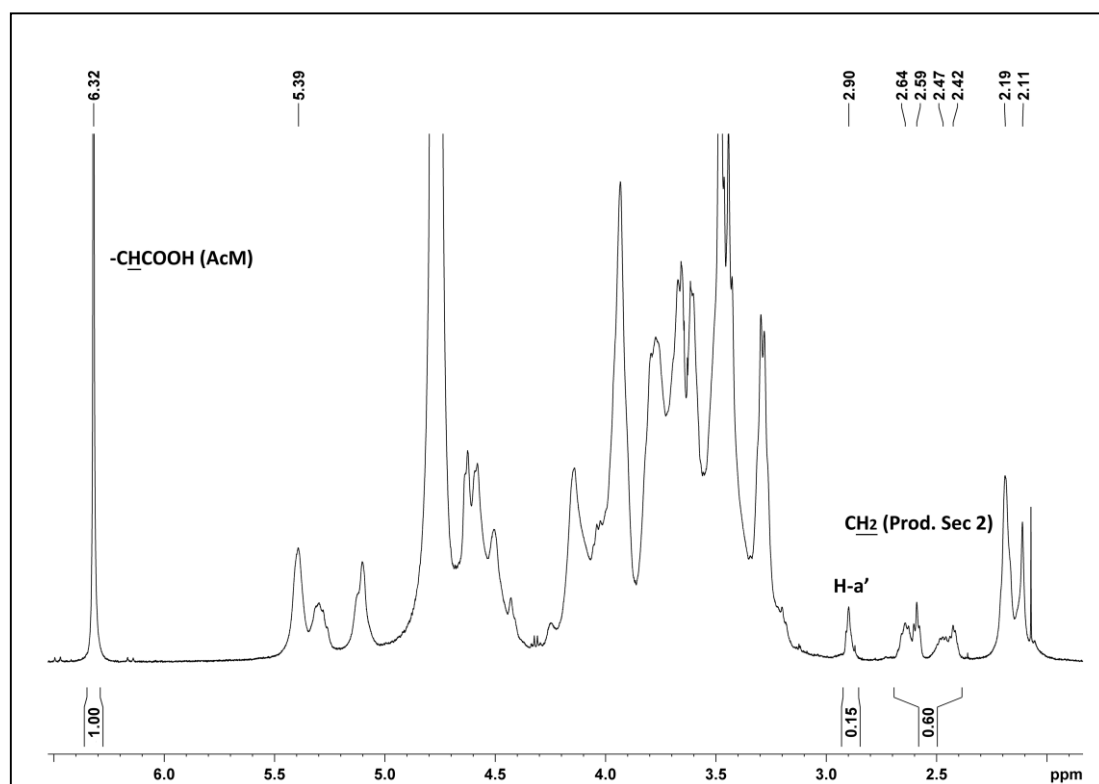
Finalizando el análisis de los experimentos detallados en la **Tabla 3.2**, el experimento GB-APr-19 presenta modificaciones respecto a lo descrito hasta aquí. Para llevar a cabo este experimento se utilizaron las condiciones de reacción descritas por Jakobi *et al.*<sup>144</sup> en un trabajo publicado en 2018 donde reportaron la amidación de alginato de sodio. Las condiciones de reacción utilizadas fueron 10 equivalentes de EDC, 2 equivalentes de NHS y 1 equivalente de amina. En nuestro caso, utilizando las mismas condiciones experimentales, se obtuvo un grado de amidación prácticamente nulo, por lo que las mismas fueron descartadas.

En función de los resultados obtenidos en los estudios preliminares realizados (ver **Tabla 3.2**) se obtuvieron algunas conclusiones parciales. Cuando se compararon los espectros de los productos GB-APr-5 y GB-APr-16 (mismas condiciones experimentales, protocolo 2 y 3 respectivamente) se encontraron resultados similares a los mostrados para los productos GB-APr-17 y GB-APr-18. Por lo tanto, debido a que se obtuvieron mejores resultados y el

procedimiento experimental es más sencillo (ya que la temperatura y el pH se mantienen constantes en toda la reacción), se eligió el protocolo 2 para realizar la reacción de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en **GB**. Además, se constató que los 3 reactivos utilizados (EDC, NHS y propilamina) son factores significativos ya que al variar la cantidad empleada de cada uno se obtuvieron resultados significativamente distintos, por lo que se concluye que modulan las respuestas en estudio (grado de amidación y obtención de productos secundarios). A partir de los resultados preliminares obtenidos, se decidió ampliar el estudio para determinar las condiciones óptimas de reacción con el objetivo de maximizar el rendimiento del producto amidado y minimizar la generación de los productos secundarios.

Por otro lado, cabe mencionar que en el espectro del producto obtenido del experimento GB-APr-17 (ver **Figura 3.16**) apareció una señal adicional de baja intensidad con un desplazamiento de aproximadamente 2,45 ppm que también se detectó en el espectro de GB-APr-18. Esta señal se encontró en espectros de los productos surgidos de las reacciones que utilizaron altas cantidades de equivalentes de EDC y de NHS. Curiosamente, en la bibliografía consultada referida a la amidación de polisacáridos con ácidos carboxílicos utilizando EDC y NHS, no se pudo encontrar ninguna referencia a la aparición de este tipo de señales.

Para estudiar la naturaleza de estas nuevas impurezas se realizó un experimento con altas proporciones de EDC y NHS, pero sin la presencia de aminos (ver **Tabla 3.2**, GB-ASA). En la **Figura 3.17** se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido del producto del experimento GB-ASA, donde nuevamente se pueden observar señales de estas impurezas a 2,5 ppm aproximadamente.



**Figura 3.17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto GB-ASA.

En el espectro de la **Figura 3.17** se observan en realidad dos señales diferenciadas alrededor de 2,5 ppm. En un espectro HSQC-DEPT realizado posteriormente a esta misma muestra (ver **Figura 3.18**) estas señales se encuentran asociadas a un desplazamiento en carbono de 36,2 ppm y con fase negativa, lo que indica que se trata de un metileno. Además, en el mismo espectro HSQC se observa una señal similar a 36,9/3,44 ppm también con fase negativa indicando nuevamente que se corresponden con carbonos e hidrógenos metilénicos. En conjunto con estas observaciones, en el espectro TOCSY de este mismo producto se observó que existen señales de correlación entre los pares de hidrógenos metilénicos descriptos. A su vez, no se pudieron encontrar otras señales de correlación que involucren a estos protones.

Por lo tanto, las evidencias espectroscópicas indicarían que estas señales son compatibles con una estructura del tipo  $\text{X-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Y}$ , donde los desplazamientos químicos de carbono e hidrógeno de estas señales sugieren que los fragmentos X e Y se podrían corresponder con grupos carbonilo o amina. Teniendo en cuenta que estos subproductos se

encontraron en condiciones donde se utilizaron mayores cantidades de NHS es factible considerar que este tipo de estructuras se derivan de este grupo activante.

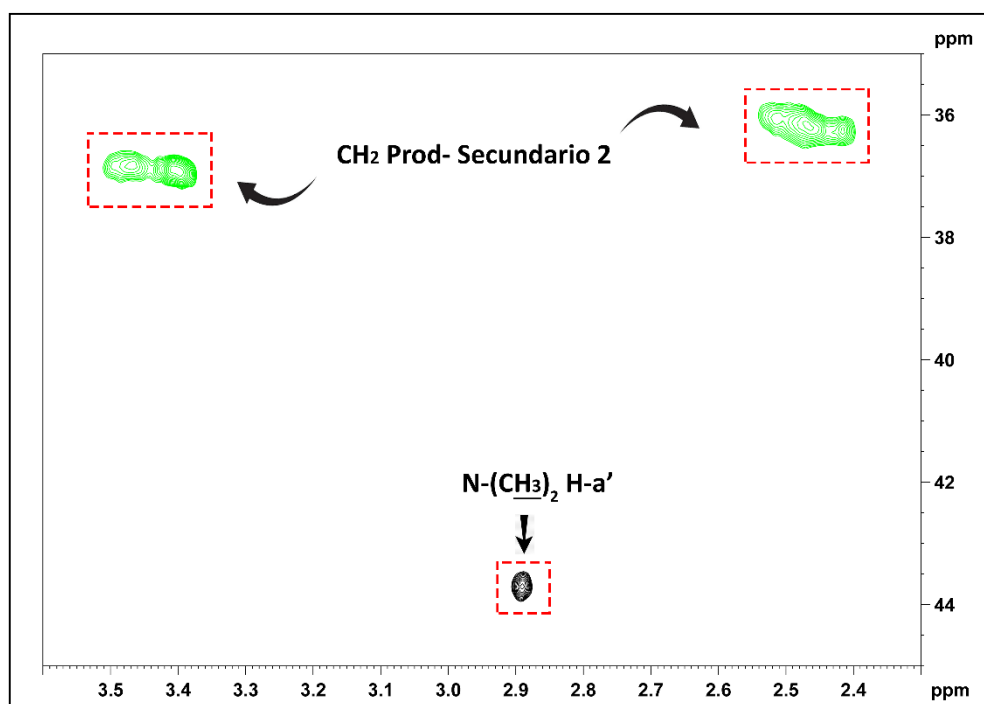
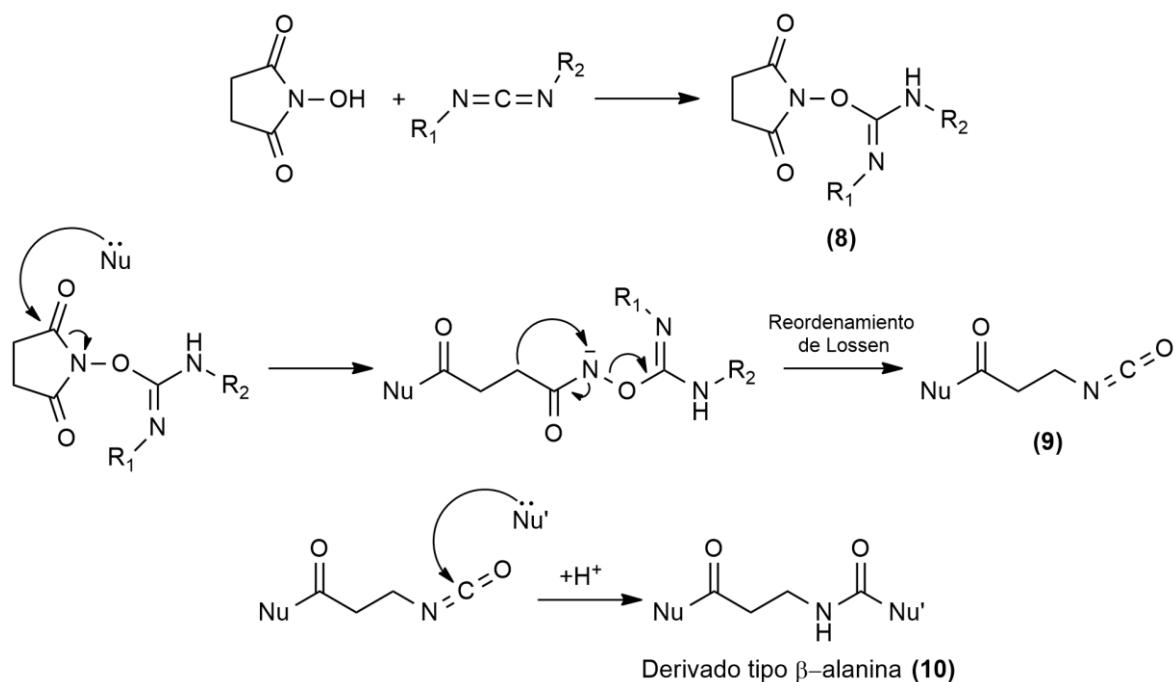


Figura 3.18. Ampliación del espectro HSQC del producto GB-ASA.

En una búsqueda profunda en bibliografía se pudo encontrar evidencia de la formación de subproductos derivados de la NHS<sup>152,169-171</sup> en la síntesis de péptidos empleando carbodiimidas como agentes activantes. En estas publicaciones<sup>152,169-171</sup>, se reportó que a partir de una serie de reacciones entre una carbodiimida y la NHS se obtuvieron productos indeseados, los cuales eran derivados del aminoácido  $\beta$ -alanina. En particular, Wilchek y Miror<sup>169</sup> en un trabajo publicado en 1987 estudiaron la formación de un subproducto inesperado que se obtenía al utilizar columnas de afinidad sintetizadas a partir de geles comerciales de agarosa funcionalizados con ácido aminocaproico (CH-Sepharose 4B<sup>®</sup>), que luego fueron modificados empleando el sistema carbodiimida-NHS. Estos autores informaron que las columnas armadas con esta fase fija presentaban un “sangrado” continuo de una impureza al momento de utilizarlas. Al aislar y caracterizar esta impureza reportaron que la misma era  $\beta$ -alanina, un aminoácido que se formaba luego de una serie de reacciones entre la carbodiimida empleada y un exceso de NHS y quedaba unido covalentemente al gel vía los

grupos hidroxilo libres del soporte. El mecanismo que propusieron estos autores para la formación de este subproducto se puede apreciar en la **Figura 3.19**.



**Figura 3.19.** Mecanismo de formación de  $\beta$ -alanina a partir de una carbodiimida y NHS (adaptado de Wilchek y Miron<sup>169</sup> y Totaro et al.<sup>152</sup>).

El primer paso del mecanismo mostrado en la **Figura 3.19** consiste en el ataque nucleofílico de la NHS sobre el C  $sp^2$  de la carbodiimida, formando de esta manera el intermediario (8). Luego, otra molécula de NHS u otro grupo funcional como un hidroxilo, puede realizar un nuevo ataque nucleofílico sobre uno de los carbonilos de la imida del intermediario (8), lo que produce la apertura del ciclo. A su vez, puede ocurrir un reordenamiento de Lossen (en el cual un ácido hidroxámico (o derivado del mismo) se convierte en un isocianato) para formar el derivado (9). Finalmente, el carbonilo del isocianato puede sufrir un ataque nucleofílico formando de esta manera el derivado tipo  $\beta$ -alanina (10). Cabe destacar que dependiendo de la identidad de los grupos Nu y Nu' la  $\beta$ -alanina formada de esta manera podría encontrarse libre y eliminarse por diálisis. En el caso de la reacción llevada a cabo con **GB**, al igual que los geles de agarosa utilizados por Wilchek y Miron<sup>169</sup>, los polisacáridos presentan numerosos grupos hidroxilo libres que pueden actuar como nucleófilos, y por lo tanto la  $\beta$ -alanina podría quedar unida covalentemente a los mismos.

Por lo tanto, los antecedentes mencionados<sup>152,169–171</sup> y la evidencia espectroscópica mostrada indicarían que en el caso de las reacciones llevadas a cabo sobre los polisacáridos de **GB** con mayores cantidades de EDC y NHS se pueden formar derivados de  $\beta$ -alanina que quedan covalentemente unidos a los polisacáridos de **GB** ya sea por el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal de este aminoácido. Estos resultados, en conjunto con la posible formación de derivados del tipo *N*-acilisourea fueron tenidos en cuenta posteriormente para poder seleccionar las mejores condiciones de reacción de forma de aumentar el rendimiento y minimizar estos posibles subproductos simultáneamente.

### 3.2.1.2 Obtención de distintos productos de amidación

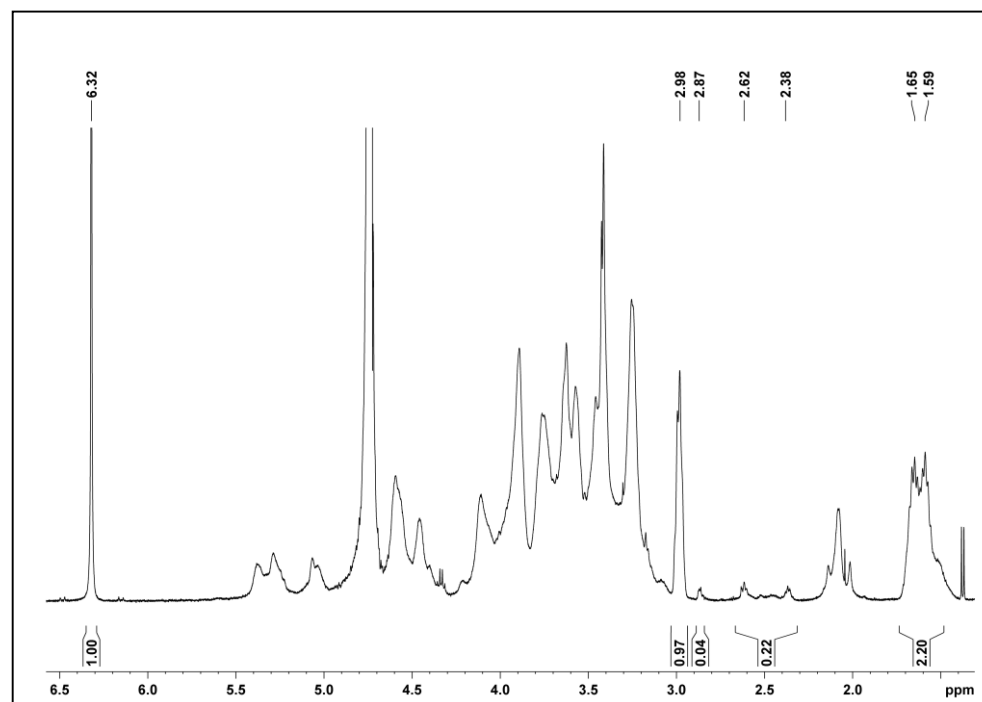
Paralelamente y en condiciones de reacción preliminares se buscaron obtener algunos productos de amidación empleando distintas aminas primarias para evaluar el método sintético.

El resultado de estas reacciones se evaluó cuantificando tanto el grado de amidación obtenido como también la formación de los posibles productos secundarios empleando espectros de RMN de  $^1\text{H}$  cuantitativos. Para realizar la cuantificación se utilizó como estándar interno el ácido maleico (AcM). En los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$ , esta molécula presenta una señal que es singlete con un  $\delta$  a 6,32 ppm que se origina en dos hidrógenos, por lo que se encuentra en una zona del espectro donde no existe superposición con otras señales. La cuantificación se realizó, empleando según el caso, una o más señales originadas en las aminas introducidas a la goma brea. Por ejemplo, para el derivado de propilamina se utilizaron las dos señales correspondientes a los hidrógenos metílicos H-a y los hidrógenos metilénicos H-b (ver **3.9**) con desplazamientos químicos de 0,88 y 1,52 ppm respectivamente, y se realizó el promedio del grado de amidación obtenido utilizando ambas señales para tener un resultado más representativo (ver **Capítulo 5 Materiales y Métodos, sección 5.8.2.3**).

En la **Tabla 3.4** se muestran las condiciones experimentales empleadas y los resultados obtenidos para las reacciones de amidación llevadas a cabo empleando como amina primaria propilamina (GB-APr-20), 1,4-diaminobutano (GB-ADb), 3-dimetilaminopropilamina (GB-ADm). En la **Figura 3.20** se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido para el producto GB-ADb a modo de ejemplo.

**Tabla 3.4.** Condiciones experimentales empleadas para reacciones de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en la goma brea mediante EDC, NHS y distintas aminas.

Experimento	Amina utilizada	EDC (Eq.)	NHS (Eq.)	Amina (Eq.)	[GB] % m/m	Protocolo	Grado de amidación (% molar)	Formación <i>N</i> -acilurea (% molar)	Formación $\beta$ -alanina (% molar)
GB-APr-20	Propilamina	10	10	100	0,2 %	2	85,3	0,4	13,0
GB-ADb	1,4-diaminobutano	20	20	200	0,2 %	2	86,6	1,1	12,3
GB-ADm	3-dimetilaminopropilamina	20	20	200	0,2 %	2	87,7	1,1	2,5



**Figura 3.20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto del experimento GB-ADb.

Como se puede apreciar en la **Tabla 3.4** para las 3 aminas utilizadas se obtuvieron grados de amidación altos, en torno a 85 %. Sin embargo, estos resultados se obtuvieron empleando una cantidad alta de equivalentes de los reactivos y además se obtuvieron proporciones no despreciables de productos secundarios, lo que sugería la necesidad de encontrar mejores condiciones experimentales para obtener productos con altos grados de amidación y con la menor cantidad de subproductos posibles.

### 3.2.2 Selección de factores: Diseño factorial $2^{4-1}$

Luego de realizar los estudios preliminares, se identificaron 7 factores que pueden modular el grado de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en **GB**: los equivalentes de los reactivos (EDC, NHS y la amina empleada), la concentración de **GB**, el pH, el tiempo y la temperatura.

Por los estudios realizados se sabe que los 3 primeros factores son significativos tanto para el grado de amidación conseguido como para la proporción de los productos secundarios. Sin embargo, en los experimentos realizados hasta el momento no se habían estudiado el resto de los factores en forma exhaustiva.

Por esa razón, para analizar la incidencia de estos 4 factores sobre la reacción de amidación se llevó a cabo un diseño factorial de tipo  $2^{4-1}$  con 3 puntos centrales, el cual presenta un nivel de resolución IV. En todos los casos se utilizó el protocolo 2 y la misma relación de reactivos: 10 equivalentes de EDC, 10 equivalentes de NHS y 50 equivalentes de propilamina. Se decidió emplear estas condiciones experimentales ya que se habían obtenido grados de amidación importantes.

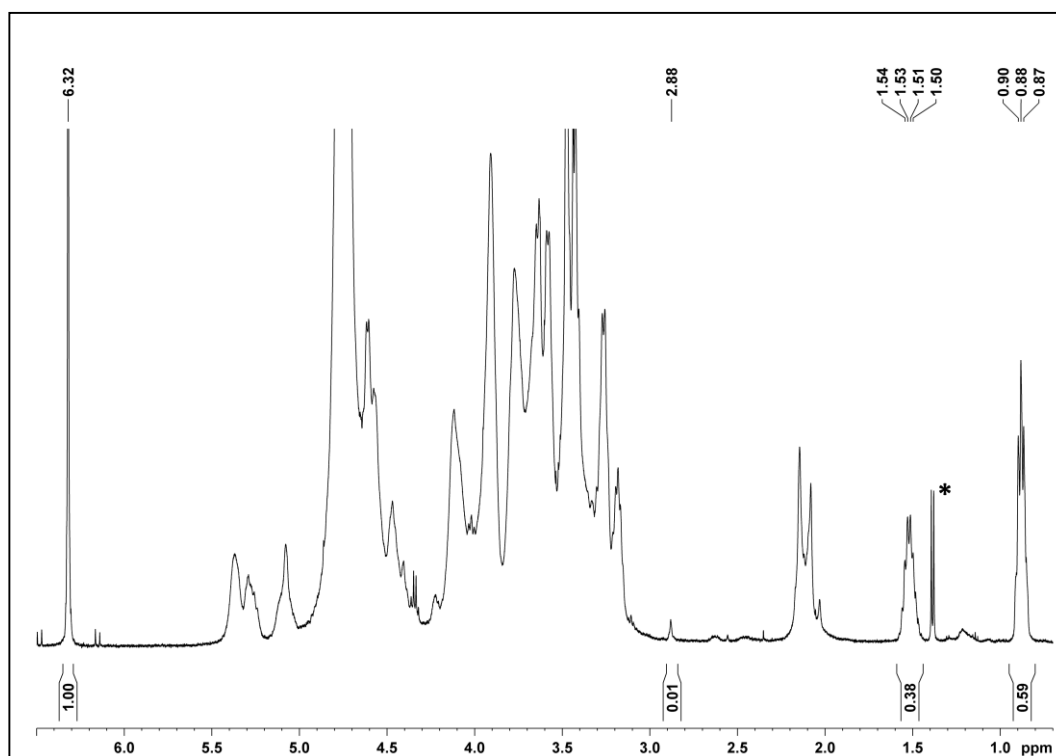
En la **Tabla 3.5** se muestran los factores analizados y los niveles elegidos para cada uno de ellos. Los valores utilizados fueron escogidos teniendo en cuenta la información detallada en la introducción del presente capítulo y asimismo para abarcar un rango relativamente amplio de la región experimental.



**Tabla 3.5.** Factores analizados y niveles estudiados para el diseño factorial  $2^{4-1}$ .

Factor	Nivel inferior	Nivel superior	Punto central
[GB] (% m/m)	0,150	0,500	0,325
pH	4,50	7,00	5,75
Tiempo (h)	2	16	9
Temperatura (°C)	25,0	50,0	37,5

Las respuestas que se buscaron estudiar mediante este diseño factorial fueron el grado de amidación de los polisacáridos y la proporción de productos secundarios formados sobre los ácidos urónicos. Para cuantificar estas respuestas se utilizaron espectros de RMN de  $^1\text{H}$  cuantitativos al igual que se detalló en la **sección 3.2.1.2**. En la **Figura 3.21** se muestra un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del primer producto obtenido DFA-1 (DFA = Diseño Factorial Amidación).



**Figura 3.21.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto DFA-1 en  $\text{D}_2\text{O}$ .

En la **Tabla 3.6** se muestra el diseño factorial completo consignando el orden de corrida en el que fueron realizados los experimentos. Como se puede observar, los primeros 8 experimentos (DFA-1 a DFA-8) son los tratamientos propios de un diseño del tipo  $2^{4-1}$ , mientras que los últimos 3 (DFA-9 a DFA-11) son repeticiones del punto central que se incluyeron para tener una mejor estimación del error de modelo de ajuste.

**Tabla 3.6.** Diseño factorial  $2^{4-1}$  de nivel de resolución IV para analizar cuatro factores: tiempo, temperatura, pH y concentración de **GB\***.

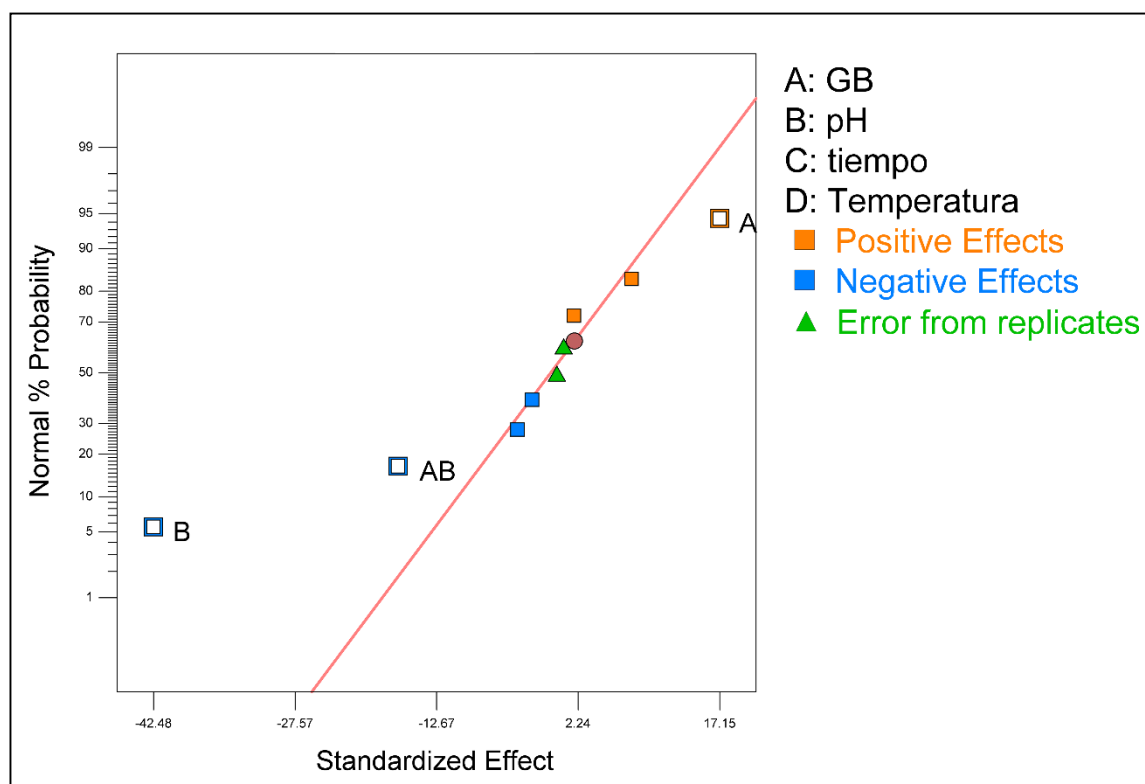
Exp.	Orden de corrida	Factor A: [GB] (% m/m)	Factor B: pH	Factor C: Tiempo (h)	Factor D: Temperatura (°C)	Grado de Amidación (% molar)	Grado de N-acilurea (% molar)
DFA-1	6	0,15	4,5	2	25	40,0	0,6
DFA-2	11	0,5	4,5	2	50	85,9	4,5
DFA-3	5	0,15	7	2	50	24,7	3,6
DFA-4	2	0,5	7	2	25	21,4	1,7
DFA-5	1	0,15	4,5	16	50	56,4	1,1
DFA-6	8	0,5	4,5	16	25	78,3	2,6
DFA-7	10	0,15	7	16	25	20,2	1,5
DFA-8	7	0,5	7	16	50	24,3	2,5
DFA-9	3	0,325	5,75	9	37,5	64,0	3,80
DFA-10	9	0,325	5,75	9	37,5	69,7	3,5
DFA-11	4	0,325	5,75	9	37,5	70,6	4,3

\* Para todas las reacciones se emplearon 10 equivalentes de EDC, 10 equivalentes de NHS y 50 equivalentes de propilamina. La proporción obtenida del producto secundario derivado de  $\beta$ -alanina fue baja.

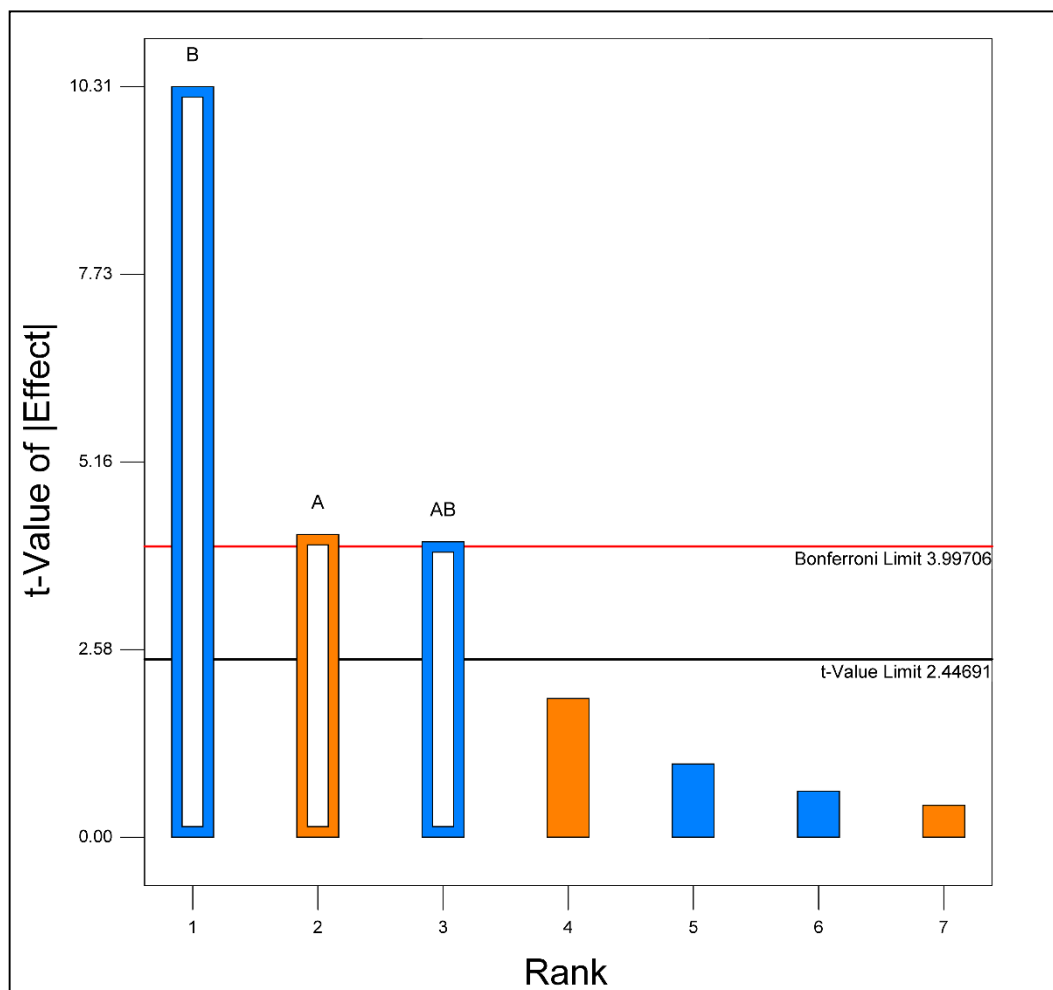
De los resultados obtenidos (**Tabla 3.6**) se puede apreciar que se obtuvieron diferentes grados de amidación, obteniéndose valores máximos de 85,9 %, y mínimos de 20,2 %. Si se observan los resultados obtenidos, el porcentaje de los ácidos urónicos unidos a *N*-acilurea en ningún caso superó el 4,50 % y en algún caso fue inclusive menor al 1%.

Si bien este resultado es favorable, debido a que la proporción obtenida de este producto secundario fue baja, la cuantificación del mismo mediante la integración de la señal correspondiente a los hidrógenos H-a' fue dificultosa, ya que en varios de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H analizados dicha señal presentaba una relación señal/ruido pobre. De todas formas, como se analizará posteriormente, se pudieron determinar con cierto grado de confianza los factores significativos que modulan esta respuesta.

En las **Figuras 3.22 y 3.23** se muestran los gráficos de probabilidad normal y el gráfico de Pareto respectivamente obtenidos para la respuesta estudiada.



**Figura 3.22.** Gráfico de probabilidad normal de los efectos para el grado de amidación. Se identifican sólo los efectos significativos que se alejan de una recta y por lo tanto de un comportamiento normal.



**Figura 3.23.** Gráfico de Pareto. Los efectos que superan el límite de *Bonferroni* y de *t-student* se consideran significativos.

En el gráfico de probabilidad normal (ver **Figura 3.22**) los efectos significativos son aquellos que se alejan de la recta y por lo tanto no presentan un comportamiento normal. Por otra parte, en el gráfico de Pareto (ver **Figura 3.23**), los efectos significativos son aquellos que superan los límites de *Bonferroni* y de *t-student* crítico. Por lo tanto, según se aprecia en dichos gráficos, de los 4 factores en estudio los únicos significativos son la concentración de **GB** (A), el pH (B) y la interacción doble entre estos dos (AB).

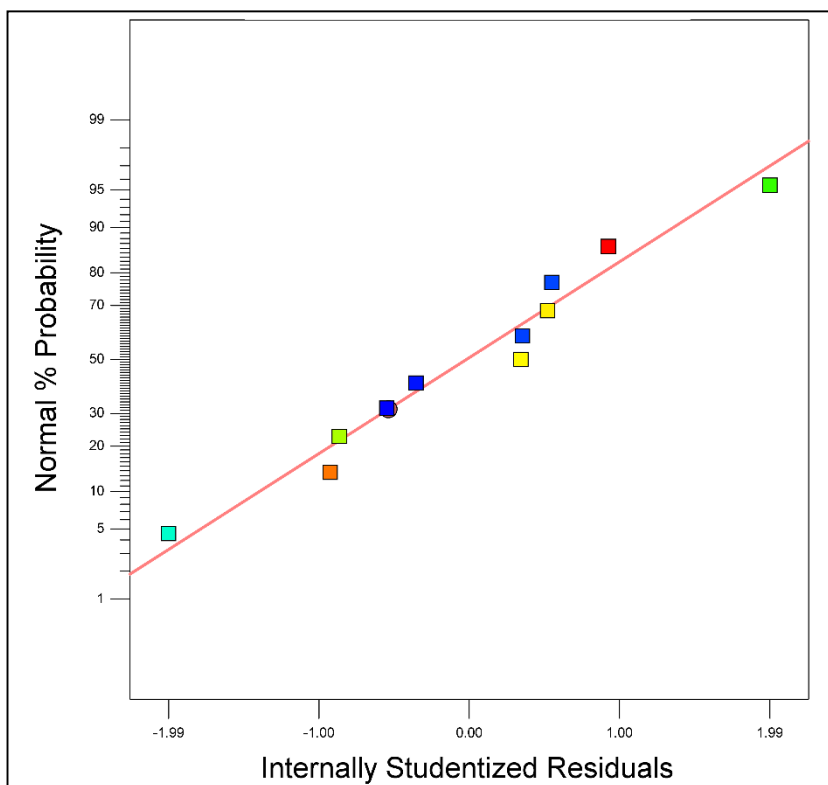
Una vez determinados los factores significativos de los 4 en estudio que influyen sobre el grado de amidación se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para ajustar estos factores con un modelo estadísticamente significativo. Los parámetros obtenidos de este análisis se pueden observar en la **Tabla 3.7**.

**Tabla 3.7.** Parámetros estadísticos obtenidos del ANOVA del modelo ajustado para el grado de amidación

	P valor	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajuste
Modelo	0,0001	0,959	0,938
A-GB	0,0059		Efecto significativo
B-pH	0,0059		Efecto significativo
AB	0,0067		Efecto significativo
Falta de ajuste ( <i>lack of fit</i> )	0,2349		No Significativo

Como se observa en la tabla anterior, los parámetros estadísticos obtenidos para el ANOVA realizado son muy buenos. Los valores de R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup> ajuste son mayores a 0,9, y tanto el modelo como los factores presentan p-valores menores a 0,05. En cuanto a la *falta de ajuste*, para este valor en particular se busca que el p-valor asociado al estadístico sea mayor a 0,05, por lo que se obtuvo un resultado aceptable.

Para validar estos resultados se debe evaluar que se cumplieron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia, lo que se puede observar en las **Figuras 3.24 a 3.26**.



**Figura 3.24.** Gráfico de probabilidad normal de los residuos estudentizados.

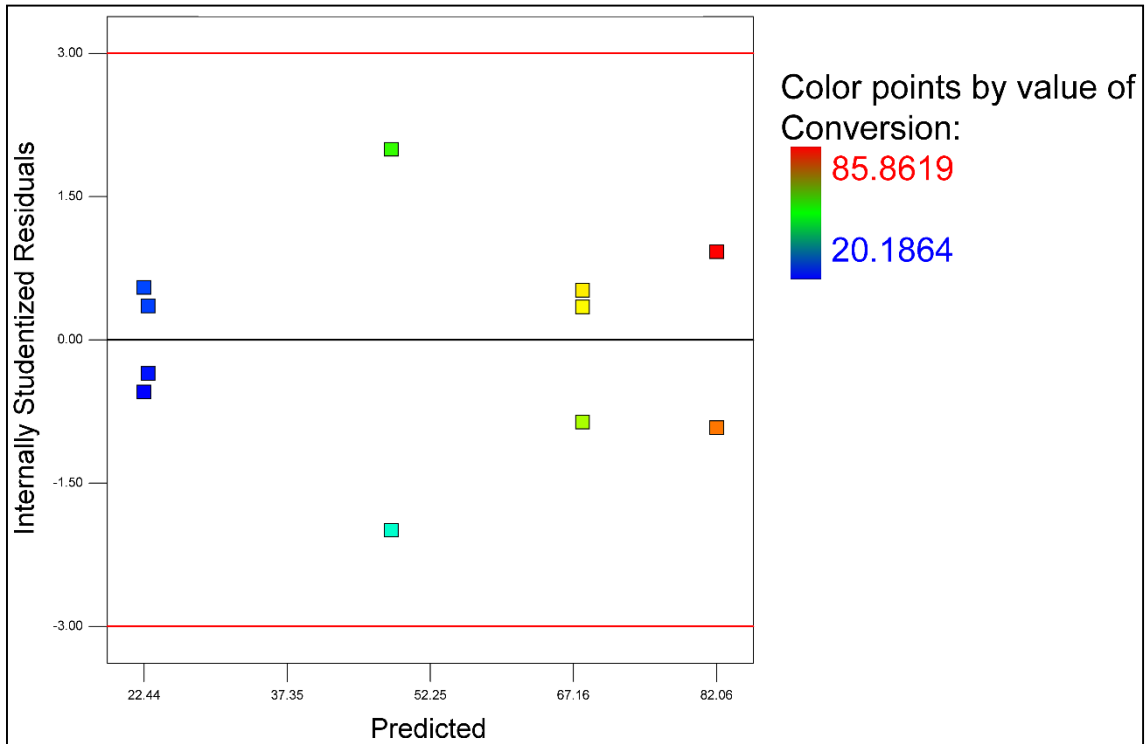


Figura 3.25. Gráfico de residuos estudentizados vs. Valor predicho.

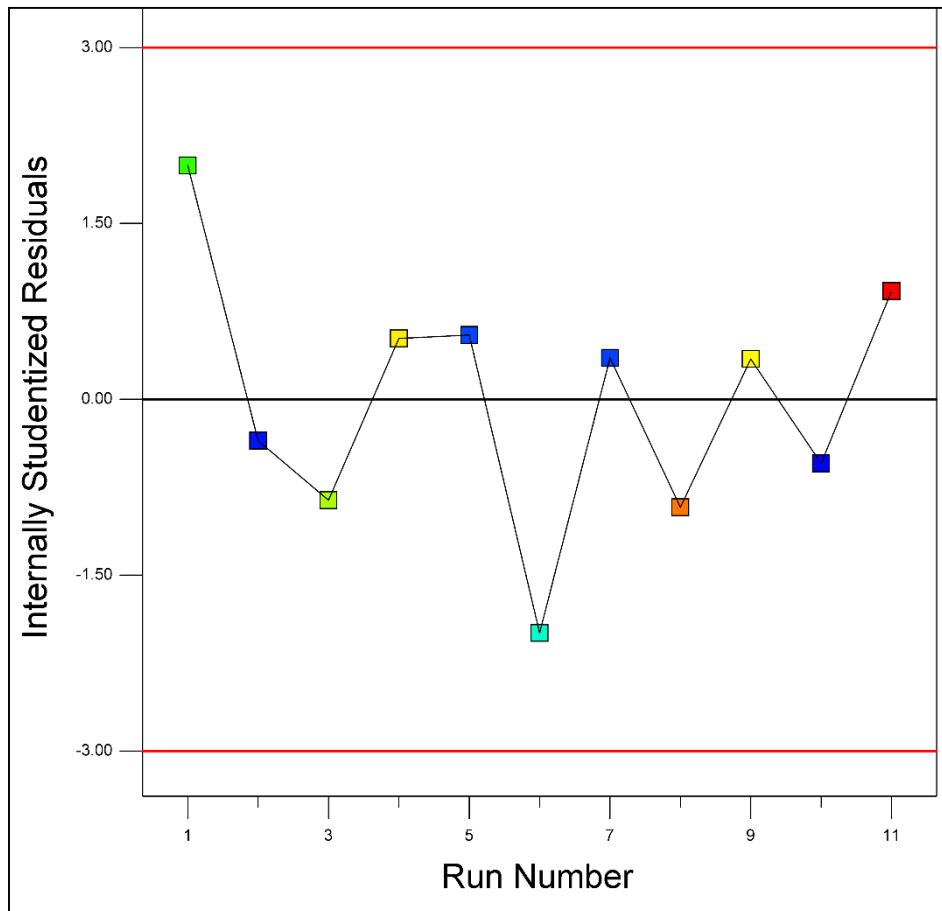


Figura 3.26. Gráfico de residuos vs. Orden de corrida.

En la **Figura 3.24** se puede apreciar que los residuos de acomodan aproximadamente a lo largo de una recta, por lo que se considera que el supuesto de normalidad está satisfecho. Además, en la **Figura 3.25** se puede ver que los residuos presentan una amplitud similar (están dentro del límite del test) y se distribuyen de forma aleatoria, lo que indica que el supuesto de homocedasticidad se satisface. Por último, en la **Figura 3.26** se observa que los residuos se distribuyen aleatoriamente alrededor del cero y no se observa ninguna tendencia, por lo que se considera que se cumple el supuesto de independencia. De esta forma el modelo de ajuste queda validado ya que se cumplen los supuestos del ANOVA.

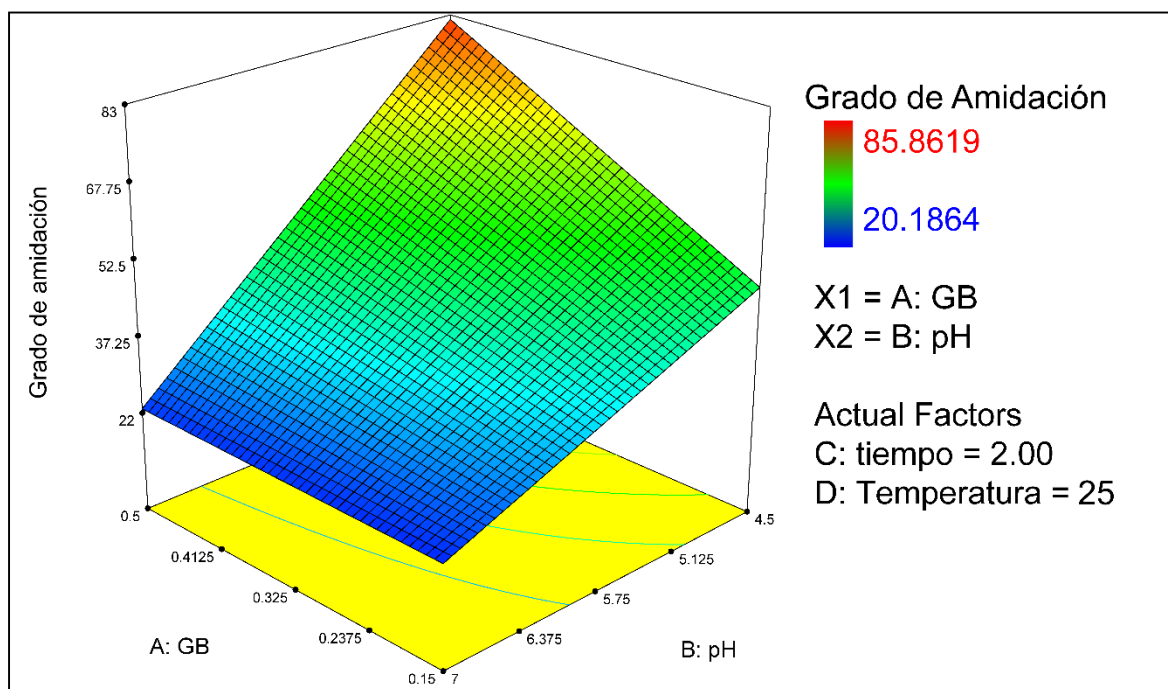
Además de poder determinar los factores significativos, se obtuvo una ecuación del modelo de ajuste que describe el comportamiento de estos efectos:

$$\text{Grado de amidación (\%)} = 268,8 [GB] - 4,6 pH - 38,2 [GB].pH + 54,2$$

Como el estudio realizado no posee el propósito de optimizar los factores analizados, sino de determinar cuáles de ellos resultaban significativos, la utilización de la ecuación obtenida debe realizarse con precaución. Sin embargo, de forma cualitativa se puede apreciar que en cuanto a los efectos principales, los mejores resultados se obtienen a altas concentraciones de **GB** y valores bajos de pH (dentro de la región experimental estudiada). En cuanto al efecto de interacción doble entre estos dos factores (el tercer término de la ecuación), el mismo presenta un comportamiento negativo. No obstante, al utilizar una mayor concentración de **GB** y un pH bajo este término se compensa por lo que no repercute negativamente en grado de amidación conseguido.

En la **Figura 3.27** se muestra un gráfico tridimensional que permite visualizar más fácilmente el comportamiento de los factores significativos descrito por la ecuación anterior. Como se puede observar, los mejores resultados para el grado de amidación se obtienen a una concentración de **GB** de 0,5 % y un pH de 4,5 (los valores de tiempo y temperatura no influyen en el grado de amidación alcanzado). Cabe destacar que no se puede asegurar que a valores mayores de **[GB]** y menores de pH de los estudiados se obtendrían mejores resultados a pesar de que la ecuación obtenida lo indique, ya que no se pueden predecir comportamientos de forma confiable por fuera de la región experimental. De hecho, como se describió en la introducción, se sabe que a un pH menor a 4 la EDC se descompone y se necesita un valor de pH tal que exista una proporción significativa de ácidos carboxílicos como

carboxilatos, por lo que es posible que a valores de pH menores de 4,5 se obtengan peores resultados.



**Figura 3.27.** Gráfico tridimensional que relaciona el Grado de amidación (eje z) con los factores significativos **GB** y **pH**.

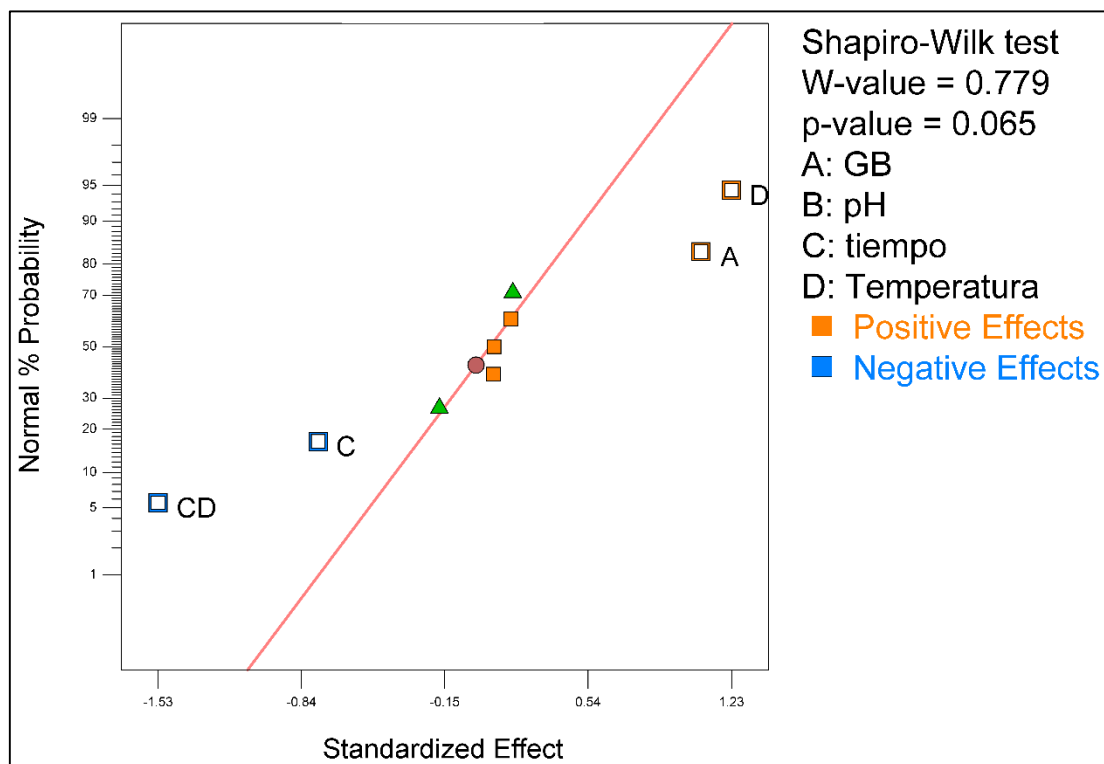
En cuanto a la segunda respuesta estudiada (grado de formación de productos secundarios), se repitió el mismo análisis que el descrito para el grado de amidación. De los gráficos de probabilidad normal y de Pareto se pudieron determinar los factores significativos, como se puede apreciar en las **Figuras 3.28 y 3.29**.

En la **Tabla 3.8** se muestran los parámetros estadísticos obtenidos del ANOVA realizado. Al igual que para la Respuesta 1 se verificaron que se cumplieran los tres supuestos del ANOVA.

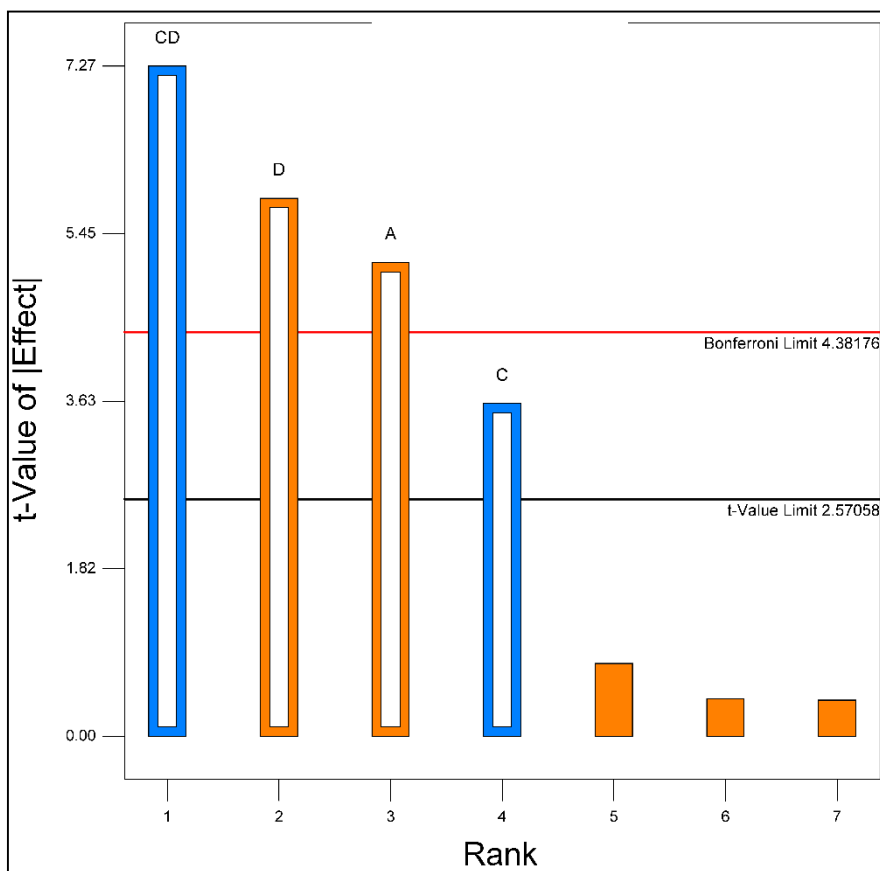
**Tabla 3.8.** Parámetros estadísticos obtenidos del ANOVA del modelo ajustado para el producto secundario del tipo *N*-acilurea.

	<b>P valor</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> ajuste</b>
Modelo	0,0010	0,962	0,932
A-GB	0,0036		Efecto significativo
C-Tiempo	0,0154		Efecto significativo
D-Temperatura	0,0021		Efecto significativo
CD	0,0008		Efecto significativo
Falta de ajuste	0,9179		No significativo





**Figura 3.28.** Gráfico de probabilidad normal de los efectos que modulan los productos secundarios. Se identifican sólo los efectos significativos que se alejan de una recta y por lo tanto de un comportamiento normal.

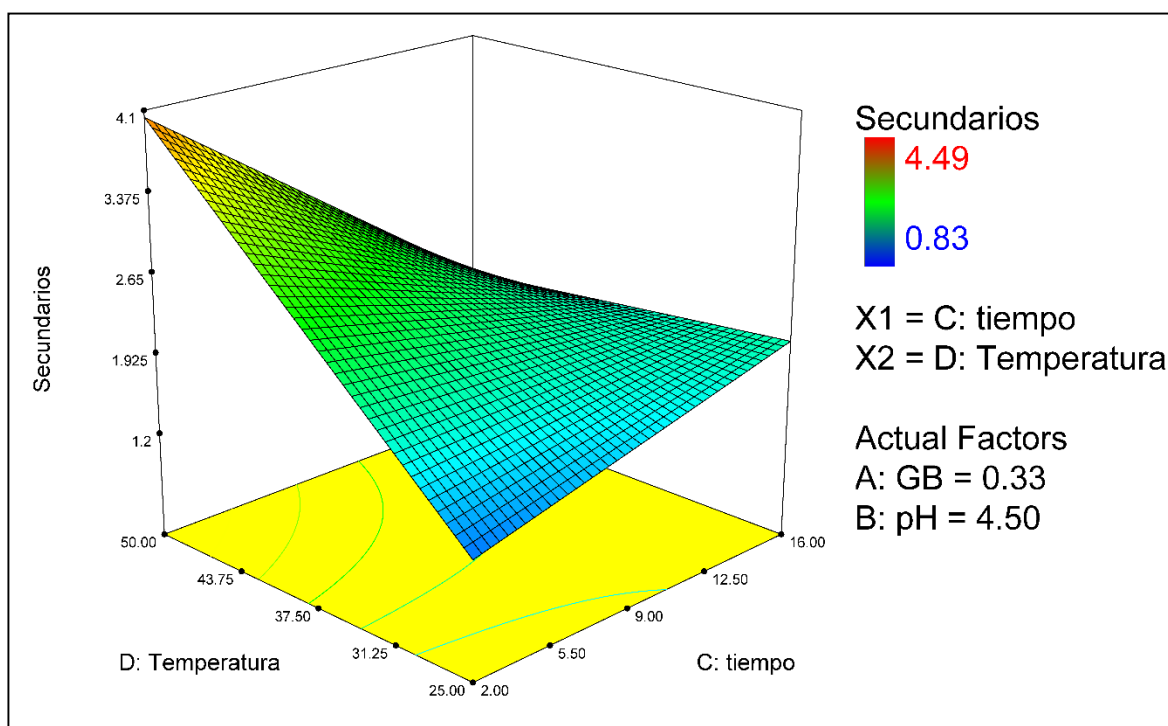


**Figura 3.29.** Gráfico de Pareto para evaluar efectos significativos de la Respuesta 2.

Del análisis de los resultados se pudo establecer que dichos factores son la concentración de **GB**, el tiempo y la temperatura (además de los equivalentes de los reactivos como se mencionó anteriormente). Del modelo ajustado se pudo obtener la ecuación que relaciona los efectos principales y el efecto de interacción doble con la respuesta estudiada:

$$\text{Producto secundario (\%)} = 3,086 [GB] + 0,273 t + 0,128 T - 0,009 t.T - 3,017$$

De la ecuación anterior se puede observar que a mayores concentraciones de **GB** se predicen mayores proporciones de este producto secundario. En cambio, no es tan sencillo visualizar el impacto de los otros dos factores significativos ya que sus efectos principales son positivos para con la respuesta estudiada mientras que su interacción doble presenta el comportamiento opuesto. Para observar más claramente el efecto global se muestra un gráfico tridimensional en la **Figura 3.30** que relaciona el tiempo y la temperatura con la proporción del producto secundario estudiado. Se puede apreciar claramente que a menores valores de tiempo y temperatura se predicen una minimización de este subproducto.



**Figura 3.30.** Gráfico tridimensional que relaciona la proporción del producto secundario estudiado respecto del tiempo y la temperatura.

### 3.2.3 Método de la superficie de respuesta

Luego del experimento de *selección de factores* se pudo establecer que existen 5 factores significativos que modulan el grado de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en **GB**: los equivalentes de EDC, de NHS y de propilamina, la concentración de **GB** y el pH. Mediante el experimento analizado en la sección anterior se pudieron establecer valores de los dos últimos factores que se consideraron lo suficientemente buenos para que no sea necesario realizar experimentos extras de optimización.

Por otro lado, se pudo establecer que además de los reactivos involucrados en la reacción, la concentración de **GB**, el tiempo y la temperatura son factores que influyen significativamente en la proporción del producto secundario que se obtiene por el reordenamiento N→O de la *O*-acilisourea formando una imida estable del tipo *N*-acilurea. Se determinó que al utilizar tiempos de reacción cortos y temperatura ambiente se disminuye la obtención de este producto secundario, por lo que se emplearon estas condiciones experimentales.

Con esta información se realizó un experimento de optimización de los reactivos empleados en la reacción utilizando el *método de la superficie de respuesta*. Para ello se construyó un diseño Box Behnken (ver **sección 3.1.4.3**) para 3 factores con 3 niveles y 3 repeticiones del punto central, dando un total de 15 experimentos. Los niveles utilizados para estos factores se pueden observar en la **Tabla 3.9**. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente por dos horas empleado el protocolo 2, con una [**GB**] de 0,5 % m/m y un pH de 4,5. Al igual que para el diseño factorial, los experimentos se realizaron en un orden aleatorio para disminuir la probabilidad de errores sistemáticos. La cuantificación se realizó por medio de espectros de RMN de <sup>1</sup>H utilizando ácido maleico como estándar interno.

**Tabla 3.9.** Diseño Box Behnken para 3 factores con 3 niveles.

<b>Factor</b>	<b>Nivel inferior</b>	<b>Nivel superior</b>	<b>Punto central</b>
A: eq EDC	1,0	10,0	5,5
B: eq NHS	1,0	10,0	5,5
C: eq Propilamina	3,0	50,0	26,5

Principalmente, la respuesta que se buscó optimizar en este estudio fue el grado de amidación de los polisacáridos de la goma brea. En cuanto a la proporción de los productos secundarios, ya sea los derivados de *N*-acilurea o de  $\beta$ -alanina, el estudio realizado presentó el mismo inconveniente descrito para la *selección de factores*. Debido a que la formación de estos subproductos fue baja, las áreas de las señales en los espectros RMN de  $^1\text{H}$  asociadas era pequeña y por lo tanto la relación señal/ruido resultó muy pobre, por lo que los resultados obtenidos presentan un error asociado posiblemente de la misma magnitud que los valores informados.

En la **Tabla 3.10** se muestra el diseño Box Behnken completo y los resultados obtenidos para las respuestas estudiadas. Se puede apreciar que se obtuvieron resultados muy heterogéneos para estas respuestas, lo que muestra la complejidad con la que los factores en estudio inciden sobre las mismas.

En cuanto al grado de amidación se obtuvieron resultados entre 5,17 a 103,17 %. De forma cualitativa se puede apreciar que los mejores resultados se obtuvieron con niveles crecientes de EDC en combinación con una cantidad importante de amina (26,5 o 50 equivalentes), mientras que al utilizar sólo 3 equivalentes de propilamina (OPA-5, OPA-6, OPA-9 y OPA-10) aún en presencia altos niveles de EDC, el grado de amidación obtenido no superó el 43 %.

Mediante el análisis de la varianza (ANOVA) se pudo encontrar el modelo de ajuste que mejor describe el modo en que los factores en estudio modulan el grado de amidación de los ácidos carboxílicos de **GB**. Los parámetros estadísticos obtenidos se muestran en la **Tabla 3.11**.

**Tabla 3.10.** Diseño Box Behnken completo y resultados obtenidos para las respuestas estudiadas.

Exp. <sup>1,2</sup>	Orden de corrida	Factor A: Eq EDC	Factor B: Eq NHS	Factor C: Eq Propilamina	Respuesta 1: Grado de Amidación (% molar)	Respuesta 2: Grado de N-acilurea (% molar)
OPA 1	11	1	1	26,5	18,6	0,9
OPA 2	5	10	1	26,5	77,8	27,5
OPA 3	8	1	10	26,5	7,8	0,0
OPA 4	6	10	10	26,5	76,6	1,0
OPA 5	7	1	5,5	3	5,2	0,1
OPA 6 <sup>3</sup>	1	10	5,5	3	43,2	7,5
OPA 7	13	1	5,5	50	11,9	0,0
OPA 8	3	10	5,5	50	103,2	6,6
OPA 9	12	5,5	1	3	27,9	23,2
OPA 10	9	5,5	10	3	11,9	1,3
OPA 11	10	5,5	1	50	92,2	18,2
OPA 12	2	5,5	10	50	47,5	0,3
OPA 13	4	5,5	5,5	26,5	62,9	1,0
OPA 14	15	5,5	5,5	26,5	64,8	1,1
OPA 15	14	5,5	5,5	26,5	72,4	1,0

<sup>1</sup> En todos los casos se utilizó una [GB] del 0,5 % m/m y un valor de pH de 4,5.

<sup>2</sup> La proporción obtenida del producto secundario derivado de  $\beta$ -alanina fue entre 0 y 3 % en la mayoría de los casos.

<sup>3</sup> Para este experimento se obtuvo un valor inusualmente alto para los derivados de  $\beta$ -alanina de 34,6 %, el cual puede explicarse debido a la muy baja cantidad de propilamina empleada respecto a los grupos activantes.

**Tabla 3.11.** Parámetros estadísticos obtenidos del modelo de ajuste para el grado de amidación.

	<b>P valor</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> ajuste</b>
Modelo	0,0002	0,866	0,812
A-EDC	<0,0001	Efecto significativo	
B-NHS	0,1021	Valor límite	
C-Propilamina	0,0021	Efecto significativo	
AC	0,0917	Valor límite	
Falta de ajuste	0,0961	No significativo	

La ecuación obtenida del modelo de ajuste más adecuado, en función de los equivalentes de los reactivos es:

**Grado de amidación (%) =**

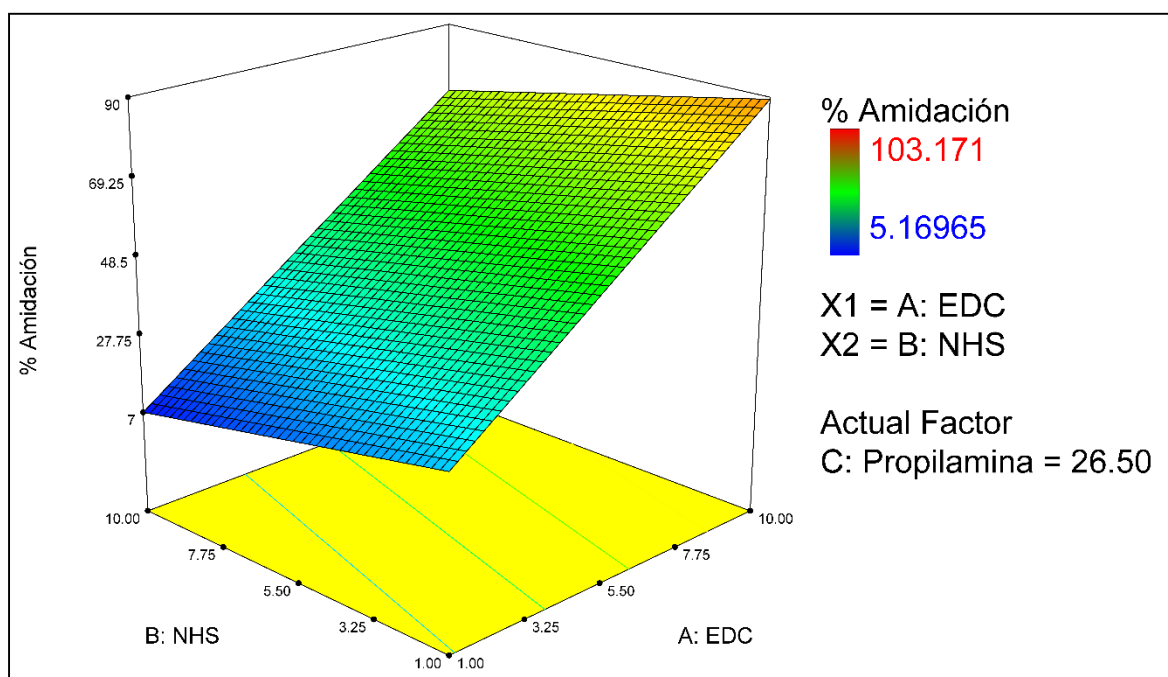
$$3,81 \text{ EDC} - 2,01 \text{ NHS} + 0,19 \text{ Propilamina} + 0,13 \text{ EDC} \cdot \text{Propilamina} + 14,91$$

El resultado de la parametrización del grado de amidación en función de los equivalentes de los reactivos involucrados es interesante. Se puede apreciar que tanto la EDC como la amina utilizada se comportan positivamente, es decir, que al aumentar sus cantidades relativas respecto a la cantidad de ácidos carboxílicos presentes se obtienen mejores resultados. No obstante, se puede ver que la NHS actúa en sentido inverso, y a mayor concentración de NHS en general se obtienen menores rendimientos. Por ejemplo, si se comparan los resultados para los productos OPA-9 y OPA-10 (o entre OPA-1 y OPA-3) la única diferencia en las condiciones experimentales era la cantidad de NHS utilizada (1 Eq OPA-9 vs. 10 Eq OPA-10) y se puede ver que se obtuvo un grado de amidación mayor para el producto con menor cantidad de NHS.

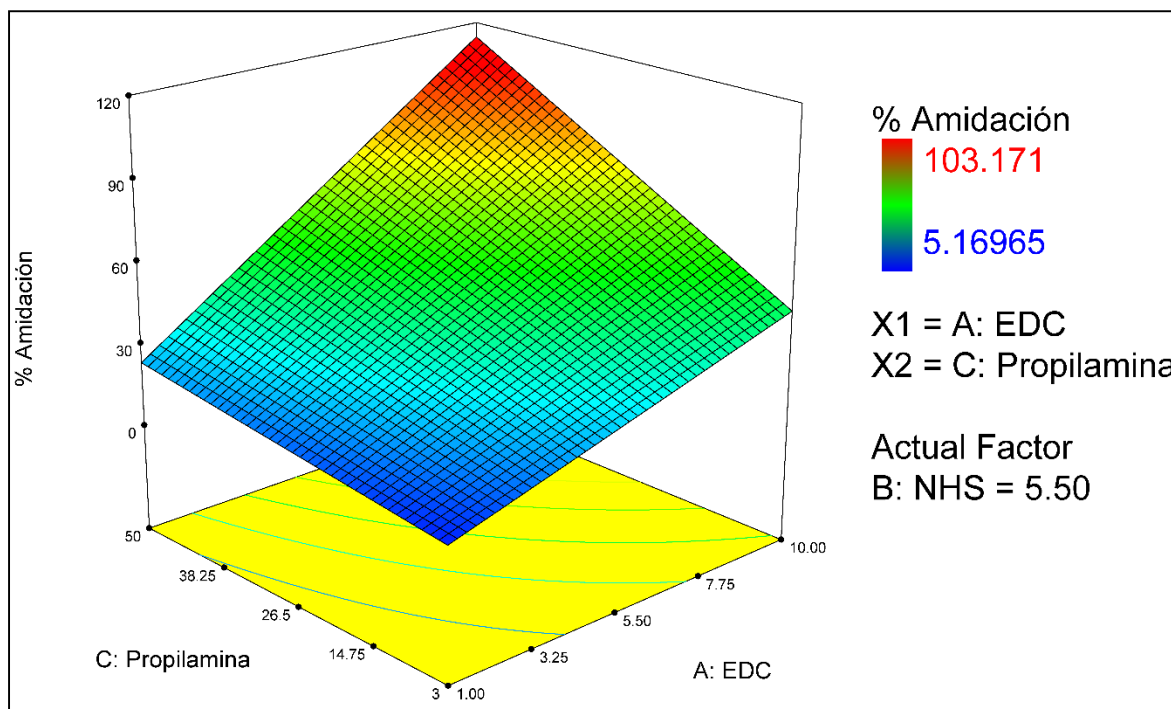
Se debe tener en cuenta que el modelo obtenido se basa en los experimentos realizados y por lo tanto no se pueden anticipar comportamientos que no se encuentren en la región experimental estudiada. En todas las reacciones llevadas a cabo en este diseño se utilizó NHS, por lo que el ajuste no puede predecir lo que ocurriría en ausencia de este reactivo. Es decir, el resultado obtenido indica que la presencia de al menos 1 equivalente de NHS es suficiente para obtener un grado de amidación óptimo. Esto puede explicarse debido a lo comentado en la **sección 3.1.3.1**, donde se analizó que exclusivamente en cuanto a la reacción de amidación

(llevada a cabo con un protocolo “one pot”), este reactivo se comporta como un catalizador, razón por la cual con una cantidad mucho menor que la EDC se obtienen resultados favorables. Sin embargo, se observa claramente comparando los resultados de las reacciones OPA-9 y OPA-10 que la presencia de mayores cantidades de NHS inhibe la formación del derivado tipo *N*-acilurea, aunque un exceso de este reactivo puede favorecer la aparición de los derivados asociados a la reacción entre la EDC y la NHS.

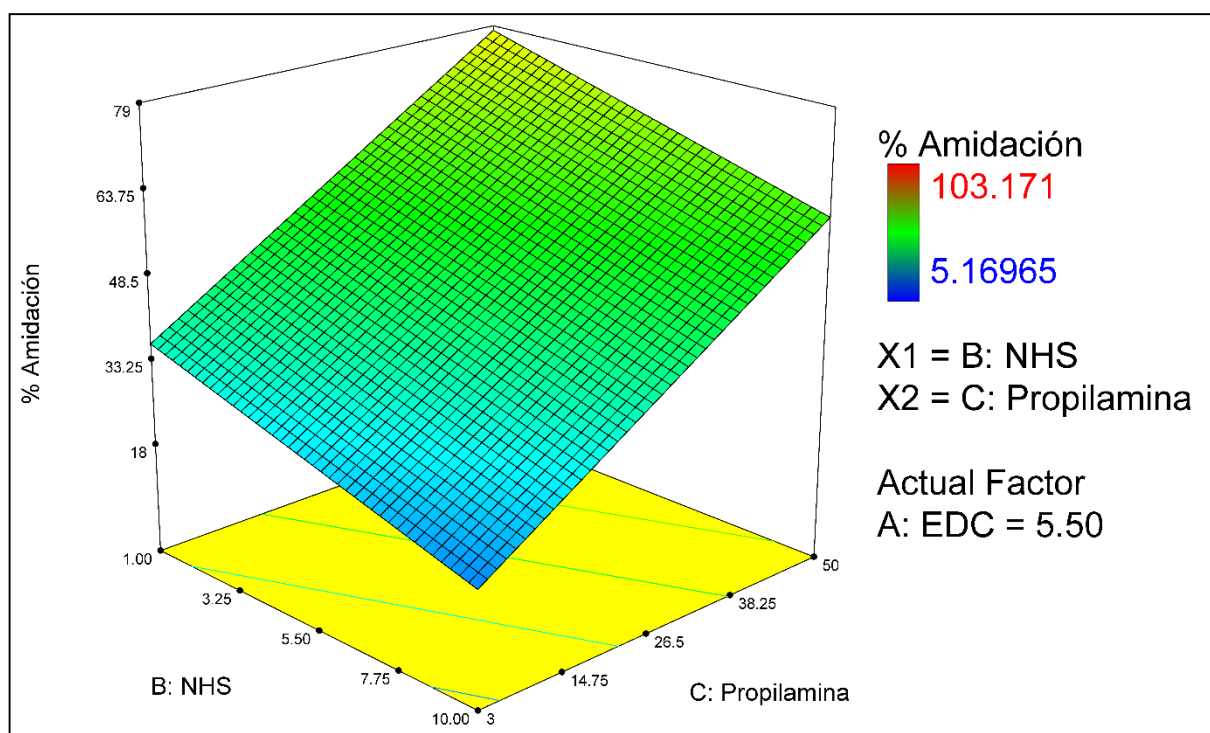
En las **Figuras 3.31 a 3.33** se muestran gráficos tridimensionales en donde se puede observar el comportamiento del grado de amidación obtenido en función de dos de los tres factores en estudio (el restante presenta el valor central del rango experimental estudiado). En estas figuras se puede apreciar claramente que los mejores resultados se obtienen con mayores equivalentes de EDC y propilamina y cantidades bajas de NHS. Ahora bien, como ya se observó cualitativamente tanto en los estudios preliminares como en los resultados mostrados en la **Tabla 3.10**, se sabe que la obtención de productos secundarios depende de la relación que se utilice de los reactivos de partida de una forma compleja. Por lo tanto el desafío es encontrar valores de compromiso para maximizar el grado de amidación de la reacción y al mismo tiempo disminuir estos subproductos.



**Figura 3.31.** Gráfico tridimensional que muestra la relación entre el grado de amidación y los reactivos EDC y NHS con un valor fijo de propilamina.



**Figura 3.32.** Gráfico tridimensional que muestra la relación entre el grado de amidación y los reactivos EDC y propilamina con un valor fijo de NHS.



**Figura 3.33.** Gráfico tridimensional que muestra la relación entre el grado de amidación y los reactivos NHS y propilamina con un valor fijo de EDC.



Al observar los valores obtenidos para la respuesta asociada a la formación de los productos secundarios de *N*-acilurea (ver **Tabla 3.10**) se aprecia que para varios de los tratamientos realizados se obtuvieron respuestas nulas (cero). Si bien estos resultados pueden parecer favorables, a los fines del análisis estadístico del estudio realizado presentan inconvenientes ya que este tipo de diseños necesita que la respuesta en estudio sea continua en toda la región experimental analizada. Si una porción de los valores obtenidos para dicha respuesta presentan como resultado “cero” debido a que la medición no puede arrojar valores negativos (en este caso no se pueden obtener integrales de áreas menores a cero) esta respuesta deja de ser continua. El modelo que se busca ajustar también es continuo y no presenta la posibilidad de tomar valores iguales a cero dada cierta condición.

Cabe destacar que al margen de lo antedicho, los resultados obtenidos para esta respuesta presenta una gran variabilidad (valores separados por más de un orden de magnitud). En estos casos, es aconsejable realizar una transformación de la respuesta aplicando logaritmo (natural o en base 10) a estos resultados. No obstante, esta transformación no presenta una solución a lo mencionado en el párrafo anterior. Por lo tanto, no fue posible encontrar un buen modelo que se ajuste a los datos experimentales para esta respuesta.

Una solución posible para poder optimizar esta respuesta y encontrar modelos que se ajusten mejor es realizar un nuevo diseño evitando las condiciones experimentales que se conoce que no producen estos subproductos. Si bien esto también puede parecer indeseado, si observamos la **Tabla 3.10** podemos apreciar que en los experimentos donde no se obtuvo el producto secundario derivado de *N*-acilurea o se obtuvo un valor muy bajo (OPA-3, OPA-5, OPA-7 y OPA-12) se utilizó 1 equivalente de EDC. Además, para los experimentos OPA-2 y OPA-11 al utilizar 1 eq. de NHS no se obtuvieron derivados de  $\beta$ -alanina (no mostrado en la **Tabla 3.10**) y si bien los grados de amidación alcanzados en estos casos fueron buenos, se obtuvo una proporción alta del producto secundario del tipo *N*-acilurea, lo que indica que estas condiciones experimentales no producen resultados deseables. Por lo tanto, se podría realizar un nuevo diseño donde estos dos factores (EDC y NHS) presenten como valor mínimo 2 o 3 equivalentes.

Por otro lado, cabe destacar que para las condiciones experimentales empleadas en los puntos centrales (5,5 eq. de EDC y NHS y 26,5 eq. de propilamina, OPA-13 a OPA-15) se

obtuvieron buenos grados de amidación, entre 63 a 72 % aproximadamente, y al mismo tiempo una proporción muy baja de subproductos. Además, según el modelo de ajuste obtenido y la evidencia experimental recabada hasta el momento es probable que al utilizar una mayor cantidad de equivalentes de propilamina con esa cantidad de agentes activantes el resultado pueda mejorar. Asimismo, al comparar estos resultados con los del experimento OPA-4 se puede apreciar que fueron muy similares tanto para el grado de amidación como para los subproductos obtenidos, aun cuando en este experimento se emplearon prácticamente el doble de equivalentes de los agentes activantes que en los experimentos OPA-13 a OPA-15 (grado de amidación OPA-4 76,6 % vs. 66,7 % en promedio para OPA-13 a OPA-15).

Para obtener aún mejores resultados, se podrían seleccionar distintas condiciones experimentales que en función de este modelo de ajuste obtenido lleven al máximo grado de amidación posible y llevar a cabo estas reacciones, calcular el grado de amidación y los productos secundarios obtenidos y seleccionar las condiciones experimentales óptimas.

### 3.3. Conclusiones

Se pudo llevar a cabo la reacción de amidación de los ácidos carboxílicos presentes en la goma de forma casi completa utilizando el sistema que emplea una carbodiimida soluble en agua – (EDC) y N-hidroxisuccinimida. Además, se obtuvieron excelentes grados de amidación con distintas aminas primarias como propilamina, 1,4-diaminobutano y 3-dimetilaminopropilamina empleando 10 equivalentes de EDC y NHS y 100 equivalentes de amina para la propilamina y el doble de la cantidad de reactivos para las otras dos aminas.

Mediante el diseño estadístico de experimentos se pudo determinar que los factores significativos que modulan el grado de amidación de estos polisacáridos, en el rango experimental estudiado, son la proporción de los reactivos (EDC, NHS y amina), la concentración de la goma brea y el pH. Para estos dos últimos factores los mejores resultados se obtuvieron empleando una concentración de 0,5 % m/m de **GB** y un pH de 4,5.

Por otro lado, se observó que al aumentar la proporción de equivalentes de N-hidroxisuccinimida se pudo disminuir y hasta eliminar por completo el subproducto que se

obtiene debido al reordenamiento N→O que ocurre en el derivado de *O*-acilisourea formando un derivado estable del tipo *N*-acilurea. Sin embargo, al utilizar mayores equivalentes de NHS se encontraron señales en los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de los productos obtenidos, de las cuales no se había encontrado información en la bibliografía consultada referida a la amidación de polisacáridos. Se encontró que estas señales se originaban en productos secundarios derivados del aminoácido β-alanina que se generaba luego de una serie de reacciones a partir de la formación de un aducto entre la EDC y la NHS. A su vez este aducto podía reaccionar con grupos hidroxilo o carboxilato libres del polisacárido, quedando enlazado a los mismos.

Por otro lado, mediante la *metodología de la superficie de respuesta* (MSR) con un diseño Box Behnken se buscaron optimizar las condiciones experimentales de los reactivos empleados. Se pudo encontrar un modelo de ajuste adecuado para el grado de amidación que permite predecir el comportamiento de esta respuesta en función de los reactivos utilizados en la reacción. Se necesitan estudios adicionales para poder encontrar modelos de ajuste más robustos que permitan modular de mejor manera la cantidad de productos secundarios obtenidos.



# CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LA  
GOMA BREA Y DE PRODUCTOS DERIVADOS



## 4.1. Introducción

Los polisacáridos en solución acuosa pueden alterar enormemente el comportamiento de flujo de las soluciones acuosas aún en concentraciones muy pequeñas<sup>172</sup>. Además, estas soluciones pueden presentar comportamientos intermedios entre sólidos y líquidos, es decir, viscoelásticos<sup>173</sup>. Debido a estas características, los polisacáridos provenientes de distintas fuentes, entre ellas las gomas, se utilizan generalmente en la industria alimentaria como aditivos. Según sus distintas propiedades particulares se los emplea como: agentes espesantes, estabilizantes, gelificantes y/o para alterar las propiedades sensoriales de los alimentos<sup>172</sup>.

Por lo tanto, la caracterización reológica de la goma brea es fundamental para determinar sus posibles aplicaciones industriales y potenciar su utilización.

### 4.1.1 Comportamiento de flujo

El comportamiento de flujo de un sistema es la relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad de la deformación. Si el sistema presenta un comportamiento newtoniano, la relación entre estas magnitudes es lineal y está dada por:

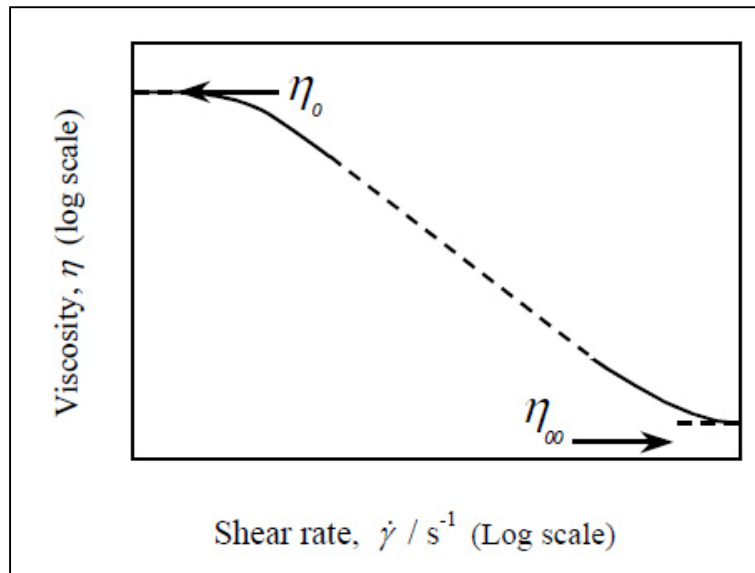
$$\tau(\dot{\gamma}) = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{ec. 4.1})$$

Donde  $\tau$  es el esfuerzo de corte,  $\eta$  es la viscosidad de la solución y  $\dot{\gamma}$  es la velocidad de deformación (o de cizallamiento).

Sin embargo, la mayoría de los polisacáridos en solución acuosa poseen un comportamiento de flujo no newtoniano, es decir que su viscosidad no es constante y depende de la velocidad de deformación. Este comportamiento, denominado pseudoplástico, ocurre debido a que las fuerzas hidrodinámicas a las cuales la solución es sometida, generan que se desarme la red establecida por las cadenas de los polisacáridos en la solución, produciendo una disminución en la viscosidad resultante<sup>172</sup>. En este caso, la relación entre  $\tau$  y  $\dot{\gamma}$  no es lineal, ya que la viscosidad ahora depende de esta última, por lo que se la denomina viscosidad aparente:

$$\tau(\dot{\gamma}) = \eta(\dot{\gamma}) \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{ec.4.2})$$

En particular, en los sistemas pseudoplásticos, la viscosidad aparente presenta un valor inicial constante, luego disminuye al aumentar la velocidad a la cual se hace fluir la solución y finalmente puede alcanzar un nuevo valor de viscosidad que se mantiene constante a altos valores de  $\dot{\gamma}$  (ver **Figura 4.1**)<sup>173</sup>.



**Figura 4.1** Gráfico de viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de deformación (shear rate,  $\dot{\gamma}$ ) en escala logarítmica (adaptado de Barnes<sup>175</sup>).

Existen varios modelos que se utilizan para ajustar los resultados experimentales, de los cuales dos de ellos, el modelo de Carreau y el modelo de Cross son los más utilizados<sup>174,175</sup>. En este trabajo de Tesis se realizaron ajustes con ambos modelos, encontrándose mejores resultados con el modelo de Carreau. La ecuación que describe el comportamiento de la viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para el modelo de Carreau es la siguiente<sup>176</sup>:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{[1 + (\tau \cdot \dot{\gamma})^2]^M} \quad (\text{ec. 4.3})$$

Donde  $\eta_0$  representa la viscosidad de la solución en la zona de velocidades muy pequeñas y se denomina viscosidad newtoniana,  $\eta_{\infty}$  es la viscosidad límite alcanzada por el sistema a velocidades de deformación muy altas,  $\tau$  es el tiempo característico y  $M$  es una constante adimensional.



Lógicamente, las propiedades de flujo no dependen sólo de la velocidad de deformación sino también de otros factores como la temperatura, la fuerza iónica o la concentración de la solución<sup>172</sup>. Este último factor resulta muy relevante ya que a muy bajas concentraciones, las cadenas de los polisacáridos se encuentran muy separadas y no presentan una interacción entre sí, mientras que al ir aumentando su concentración las mismas comienzan a interpenetrarse lo que produce un cambio notable en la viscosidad resultante. Se define concentración crítica ( $C^*$ ) al valor de la concentración de la solución donde se produce dicho cambio, el cual depende del material que se esté estudiando<sup>177</sup>. Este valor es importante ya que puede ser de interés el estudio del sistema en un rango que incluya a dicho valor o en un intervalo superior de concentraciones.

#### 4.1.2 Propiedades viscoelásticas

Como se dijo anteriormente, las soluciones de polisacáridos pueden presentar comportamientos intermedios entre sólidos y líquidos<sup>173</sup>. Uno de los modelos unidimensionales más sencillo pero útil para describir este comportamiento viscoelástico es el modelo de Maxwell<sup>173</sup>. En este modelo se plantea un sistema donde el comportamiento de líquido se asume como un elemento de amortiguación viscoso mientras que la característica de sólido se representa como un resorte elástico. Ambos elementos se encuentran conectados en serie y se considera que la contribución de ambos componentes ante la aplicación de un esfuerzo es aditiva<sup>173</sup>. Habitualmente, la deformación que sufre el sistema no es unidimensional sino que es tridimensional. En estos casos, el modelo sigue siendo válido, pero se plantea una deformación en tres dimensiones, por lo que se define el módulo de cizallamiento  $G$  como<sup>173</sup>:

$$G = \frac{\tau}{\gamma_0} \quad (\text{ec. 4.4})$$

Donde  $\tau$  es el esfuerzo de corte (*shear stress*) y  $\gamma_0$  es la deformación (*shear strain*).

Para evaluar las propiedades viscoelásticas de las soluciones, se realizan ensayos oscilatorios dinámicos de barrido de frecuencia donde el sistema es sometido a una deformación sinusoidal muy pequeña con una dada amplitud  $\gamma_m$  y una frecuencia angular  $\omega$ .

El esfuerzo resultante es también sinusoidal con una amplitud  $\tau_0$  pero se encuentra desfasado un ángulo  $\delta$  con respecto a la deformación. Si la deformación se encuentra en el rango viscoelástico lineal, se puede definir<sup>173</sup>:

$$G^* = G' + iG'' \quad (\text{ec. 4.5})$$

Donde  $G^*$  es el módulo complejo, y las magnitudes  $G'$  y  $G''$  se definen como el módulo de almacenamiento o elástico y el módulo de pérdida o viscoso respectivamente. A su vez, está establecido que<sup>173</sup>:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad (\text{ec. 4.6})$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad (\text{ec. 4.7})$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (\text{ec. 4.8})$$

Cabe destacar que el componente elástico  $G'$  se encuentra en fase con la deformación mientras que el componente viscoso  $G''$  se encuentra desfasado  $90^\circ$  con la misma. La mayoría de los polisacáridos presentan sistemas que se encuentran entre estos dos extremos.

A diferencia de las curvas de flujo, para realizar estos experimentos se necesita de un reómetro oscilatorio. Los resultados de los mismos se visualizan en un gráfico donde se muestran los valores tanto de  $G'$  como de  $G''$  en función de la frecuencia aplicada. Estos gráficos se denominan espectros mecánicos de los materiales, y se realizan con un nivel de deformación del material pequeño donde se asegure que el mismo se encuentra en su rango viscoelástico lineal, el cual debe medirse para cada material en un experimento anterior con el mismo equipo.

En función de las magnitudes de los módulos  $G'$  y  $G''$  obtenidos de los experimentos de barridos de frecuencia, se pueden distinguir tres tipos de sistemas: soluciones, geles débiles y geles<sup>173</sup>. En los sistemas definidos como soluciones (o soluciones diluidas) el módulo  $G''$  es mayor que el módulo  $G'$  a frecuencias bajas y medias. A medida que aumenta la frecuencia del ensayo y/o la concentración del polisacárido puede ocurrir un cruce donde  $G'$  supera a  $G''$  lo que indica que el sistema cambia su comportamiento de un líquido viscoso a un sólido viscoelástico<sup>173</sup>. En cambio, en el espectro mecánico de un material tipo gel,  $G'$  es mayor que  $G''$  para todas las frecuencias y además mientras que  $G''$  aumenta levemente al incrementar

la frecuencia del ensayo<sup>173</sup>,  $G'$  es independiente de la frecuencia. En los sistemas de geles débiles si bien  $G'$  se encuentra por encima de  $G''$  la diferencia entre ellos es más pequeña<sup>173</sup>, y puede observarse una mayor dependencia de estos módulos con la frecuencia y existir una frecuencia donde se produce un cruce.

Cabe destacar que también se caracteriza el comportamiento térmico de estos sistemas al realizar ensayos de barrido de temperatura, donde se trabaja a frecuencia y deformación constante y se varía únicamente la temperatura. Estos ensayos se utilizan para estudiar los efectos de la temperatura en el comportamiento reológico del material viscoelástico, como por ejemplo en el proceso de gelificación y fusión<sup>176</sup>.

## 4.2 Resultados

Como se mencionó en el **Capítulo 1**, a través de los años se han correlacionado las características reológicas de la goma brea con los de la goma arábica. Sin embargo, hasta el momento no se ha publicado un estudio reológico completo de la goma brea ni se ha realizado una comparación global de las características de estas dos gomas. Por estos motivos, en este trabajo de Tesis se decidió realizar un estudio reológico de la goma brea con el objetivo de obtener un perfil reológico completo de la misma, y a su vez se realizaron los mismos ensayos sobre la goma arábica para poder comparar estos resultados y determinar si la goma brea puede ser reemplazo local de la goma arábica.

### 4.2.1 Caracterización química y espectroscópica de la goma arábica

La goma arábica (**GA**) empleada para realizar los estudios comparativos fue donada por la empresa GelFix S.A. (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) y fue caracterizada en nuestro laboratorio para corroborar su identidad y su pureza.

En la **Tabla 4.1** se muestra la composición y el peso molecular a tope de pico (kDa) de la **GA** utilizada, la cual se encuentra en concordancia con la información bibliográfica<sup>1,5,9,10</sup>.

**Tabla 4.1.** Composición (%<sup>a</sup>) y peso molecular de la **GA**.

	<b>GA</b>
Carbohidratos	83
Grupos acetilo (-COCH <sub>3</sub> )	0
Ácidos Urónicos	14
Peso molecular a tope de pico (kDa)	220
Dispersión Mw/Mn	2,38

<sup>a</sup> Expresados en porcentajes m/m.

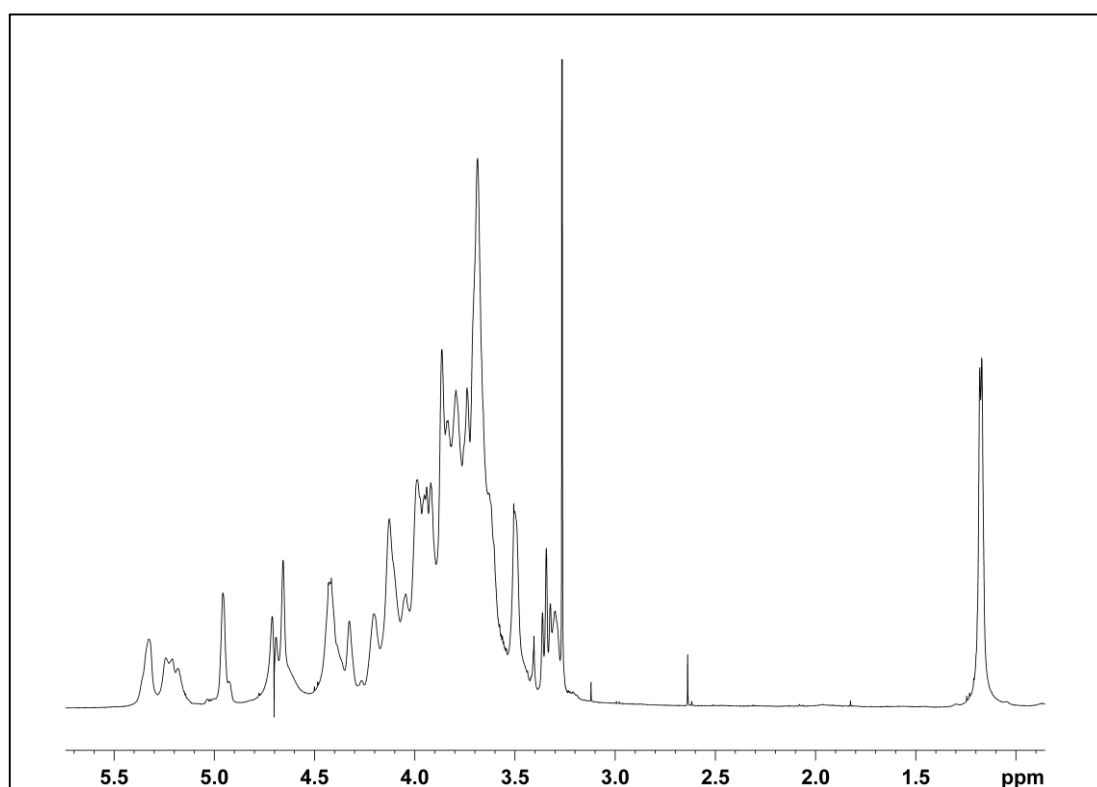
Por otro lado, los azúcares componentes se determinaron como alditoles peracetilados de la **GA** previamente reducida e hidrolizada y se analizaron por cromatografía gaseosa (CG). Los resultados se muestran en la **Tabla 4.2**, y son similares a los informados por Williams<sup>9</sup>.

**Tabla 4.2.** Azúcares componentes de la **GA** (moles/100 moles).

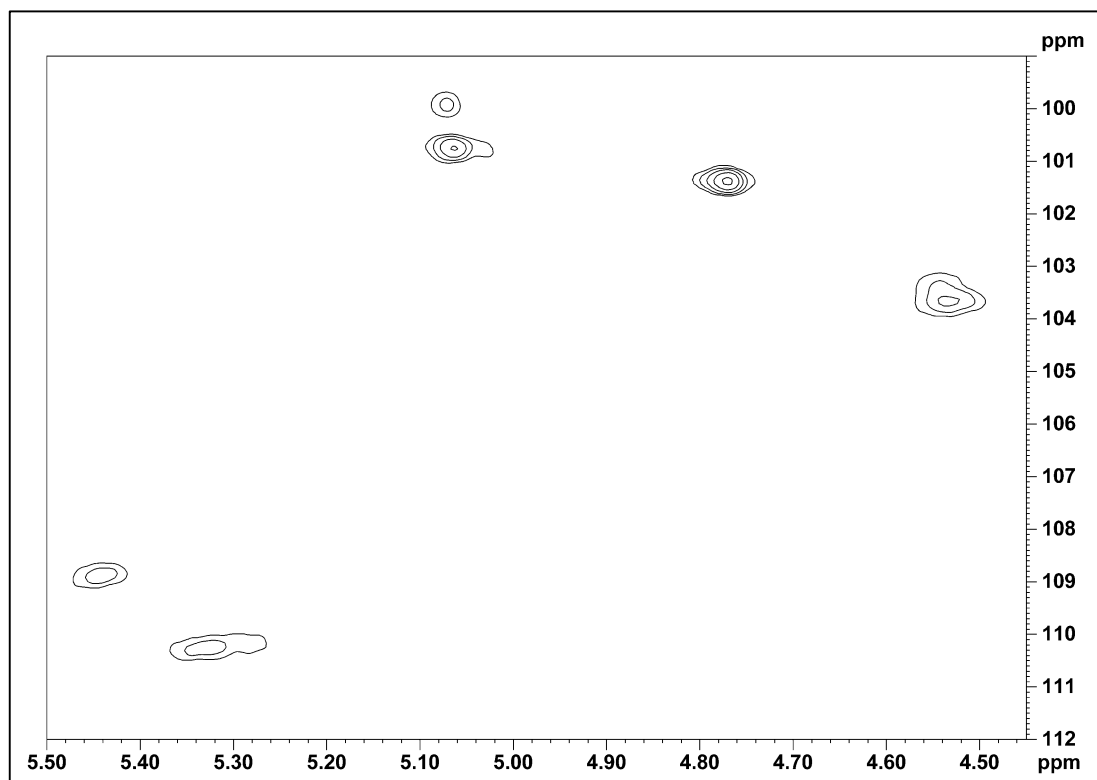
<b>Azúcar</b>	<b>GA</b>
Ramnosa	12
Arabinosa	34
Galactosa	43
Ácido (4-O-Me)-glucurónico	11

En las **Figuras 4.2 y 4.3** se muestran los espectros de RMN obtenidos para **GA** de <sup>1</sup>H y la ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC respectivamente. En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H se observa una señal a 1,2 ppm que es típica del grupo metilo de la ramnosa.

Según datos de bibliografía<sup>178</sup>, las señales a 99,7/5,07 y 100,7/5,06 ppm podrían estar originadas en los C-1 y H-1 de las unidades terminales de  $\beta$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ) y  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ) respectivamente. Las señales con desplazamientos químicos a 110,1/5,32 y 108,8/5,45 ppm se corresponderían a unidades de  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ) y  $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ ) respectivamente<sup>14</sup>. Por otro lado, la señal a 101,3/4,77 ppm estaría originada en  $\alpha$ -D-Rhap-(1 $\rightarrow$ ). 103,4/4,54, 103,5/4,53. Finalmente, la señal ancha con  $\delta$  de 103,4/4,53 ppm podría estar originada por distintos residuos como  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ ),  $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ ),  $\rightarrow$ 3,4-Galp-(1 $\rightarrow$ ) y  $\rightarrow$ 3,6-Galp-(1 $\rightarrow$ )<sup>14</sup>. Cabe destacar además que el espectro HSQC obtenido para **GA** en la zona anomérica coincide plenamente con el reportado por Nie *et al.*<sup>14</sup>



**Figura 4.2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de **GA** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.



**Figura 4.3.** Ampliación de la zona anomérica del espectro HSQC de **GA** obtenido en  $D_2O$  a temperatura ambiente.

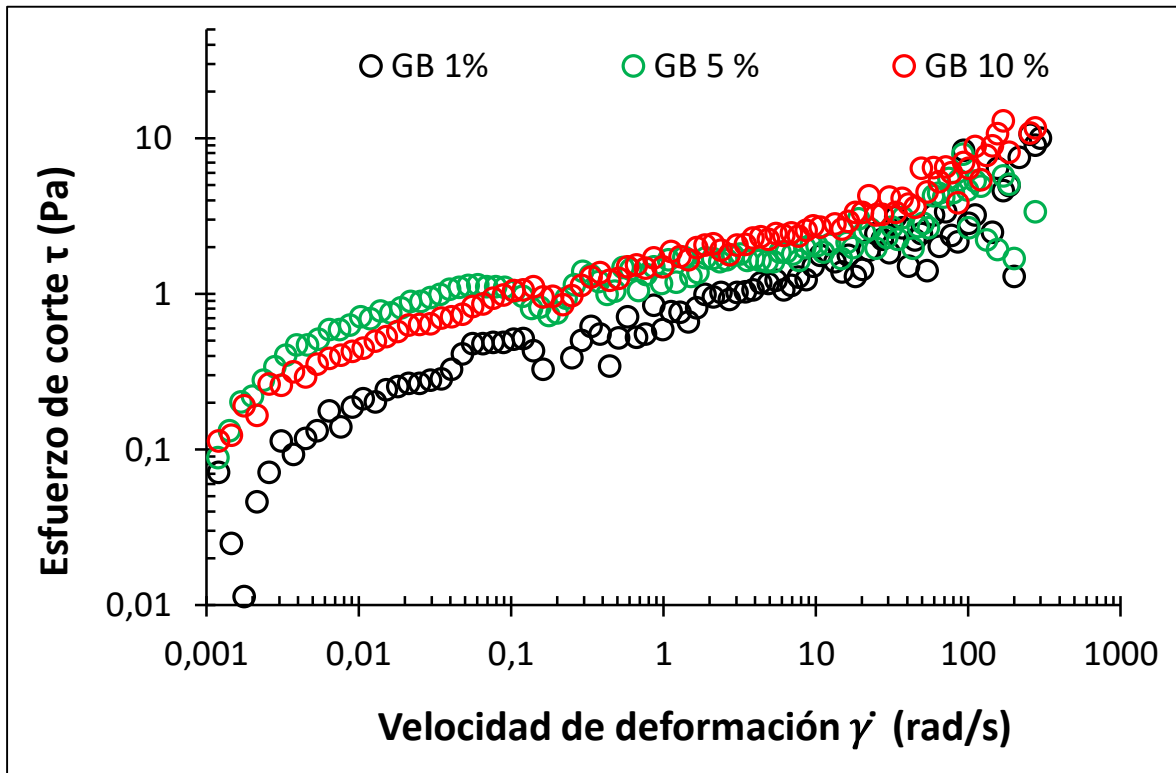
#### 4.2.2 Estudios de comportamiento de flujo

Los experimentos que se incluyen en el presente capítulo de este trabajo de Tesis se realizaron con la colaboración de la Dra. Ana María Rojas, Profesora e Investigadora del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Estos estudios se realizaron empleando un reómetro MCR 300 Paar Physica utilizando una punta de platos paralelos.

Para comenzar el estudio reológico de la goma brea se realizó una caracterización del comportamiento de flujo de la fracción **GB** obtenida por precipitación del extracto original **GBC** (ver Capítulo 2, sección 2.1.1). Se emplearon un amplio rango de concentraciones, de 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, 17,5 % y 35 % m/v a 20 °C, y además, se realizó el mismo estudio sobre la **GA**.

En la **Figura 4.4** se muestran a modo de ejemplo las curvas del esfuerzo de corte (Pa) vs. velocidad de deformación (rad/s) para las soluciones de la fracción **GB** a 1 %, 5 % y 10 % m/v, obtenidas luego de 24 h de hidratación. Como se puede observar, las soluciones estudiadas

presentan un comportamiento claramente pseudoplástico, donde la relación entre el esfuerzo de corte y  $\dot{\gamma}$  no es lineal, sino que aumenta rápidamente a valores de velocidad bajos y luego se estabiliza a valores más altos. Cabe destacar que este comportamiento se observó para todas las concentraciones estudiadas.

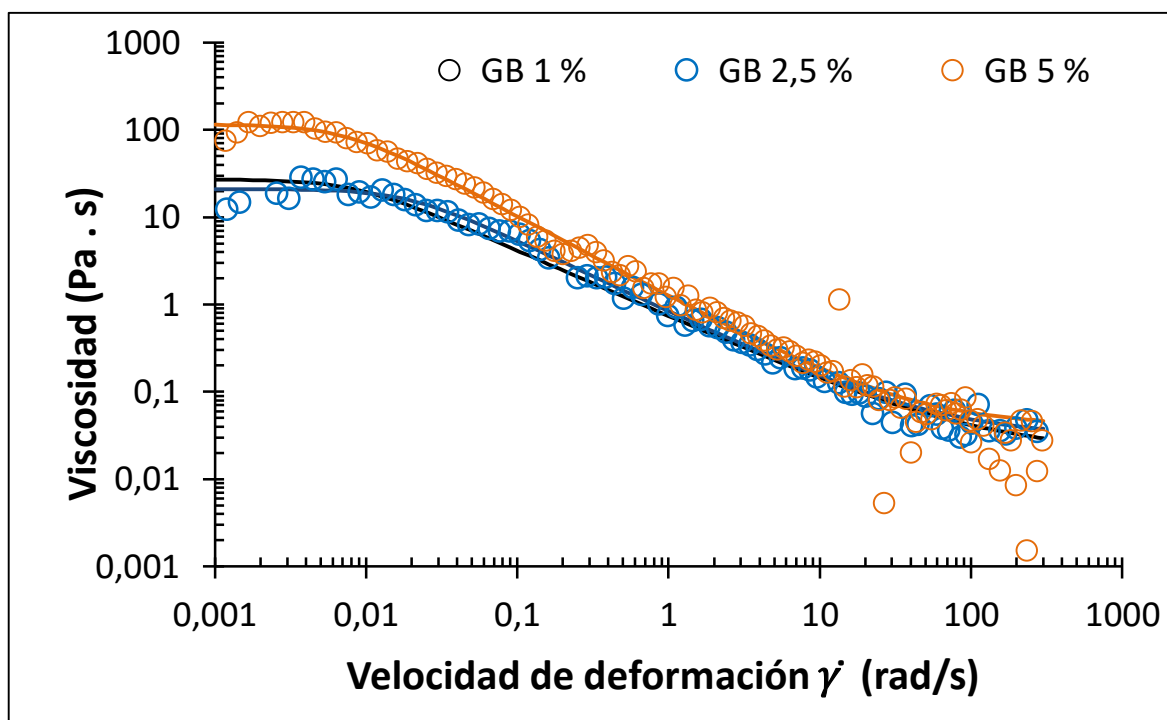


**Figura 4.4.** Gráfico de esfuerzo de corte (Pa) vs. velocidad de deformación (rad/s) para soluciones de **GB** con concentraciones de 1 %, 5 % y 10 % a 20 °C.

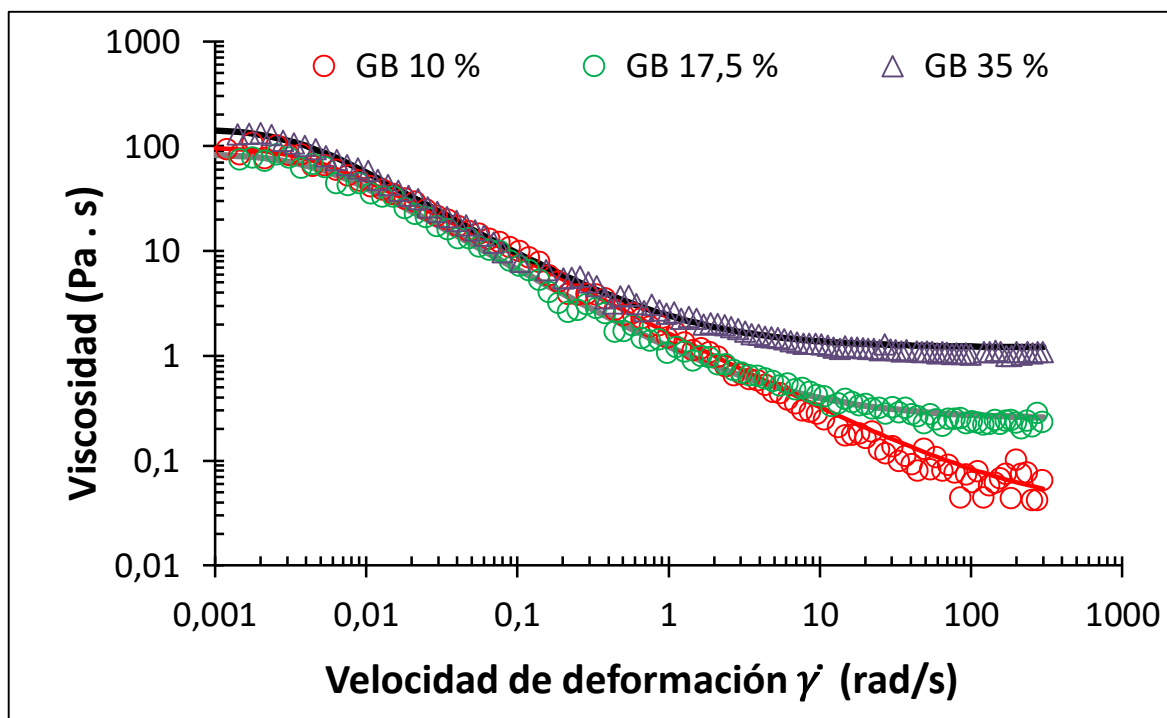
Por otro lado, se observa que a valores de velocidades de deformación mayores a 1  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$  al aumentar la concentración de la solución de **GB** aumenta el esfuerzo de corte, mientras que a  $\dot{\gamma}$  más bajas la tendencia no es tan clara.

En las **Figuras 4.5 y 4.6** se presentan las curvas de viscosidad aparente obtenidas para todas las concentraciones estudiadas de **GB** en un amplio espectro de  $\dot{\gamma}$ , desde  $0,001 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta  $300 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ . La medición de estas curvas en un rango amplio de velocidades de deformación es muy importante ya que brinda información muy útil sobre el comportamiento del material en distintos procesos industriales como extrusión, flujo a través de una cañería, agitación, secado por spray, etc y además sobre experiencias sensoriales vinculadas a la

alimentación como la deglución<sup>176</sup>. Se presenta en conjunto con los puntos experimentales la curva obtenida del ajuste realizado con el modelo de Carreau (ver **sección 4.1.1**, ecuación 4.3).



**Figura 4.5.** Gráfico de viscosidad aparente vs.  $\dot{\gamma}$  para soluciones de **GB** con concentraciones de 1 %, 2,5 % y 5 % a 20 °C.



**Figura 4.6.** Gráfico de viscosidad aparente vs.  $\dot{\gamma}$  para soluciones de **GB** con concentraciones de 10 %, 17,5 % y 35 % a 20 °C.



Como se esperaba del comportamiento pseudoplástico evidenciado en la Figura 4.4, al graficar las curvas de viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación se observa un comportamiento que se puede dividir en 3 zonas, tal como se discutió en la introducción de este Capítulo (Figuras 4.5 y 4.6). A velocidades de cizallamiento muy bajas, donde el material se encuentra prácticamente en reposo, la viscosidad presenta un valor inicial alto, que se corresponde al valor de la región de viscosidad newtoniana ( $\eta_0$ ). En esta región las macromoléculas hidratadas se encuentran prácticamente en reposo y presentan interacciones fuertes entre sí. Al comenzar el movimiento del fluido, la viscosidad disminuye alcanzando valores intermedios hasta los 10  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$  aproximadamente donde se comienza a estabilizar la viscosidad llegando a alcanzar el valor más bajo o límite cuando el sistema se somete al cizallamiento máximo a 300  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ , conocido como viscosidad infinito ( $\eta_\infty$ ). En esta región se encuentra el valor mínimo de viscosidad ya que se destruye por completo la red formada por la interacción entre las cadenas de los polisacáridos.

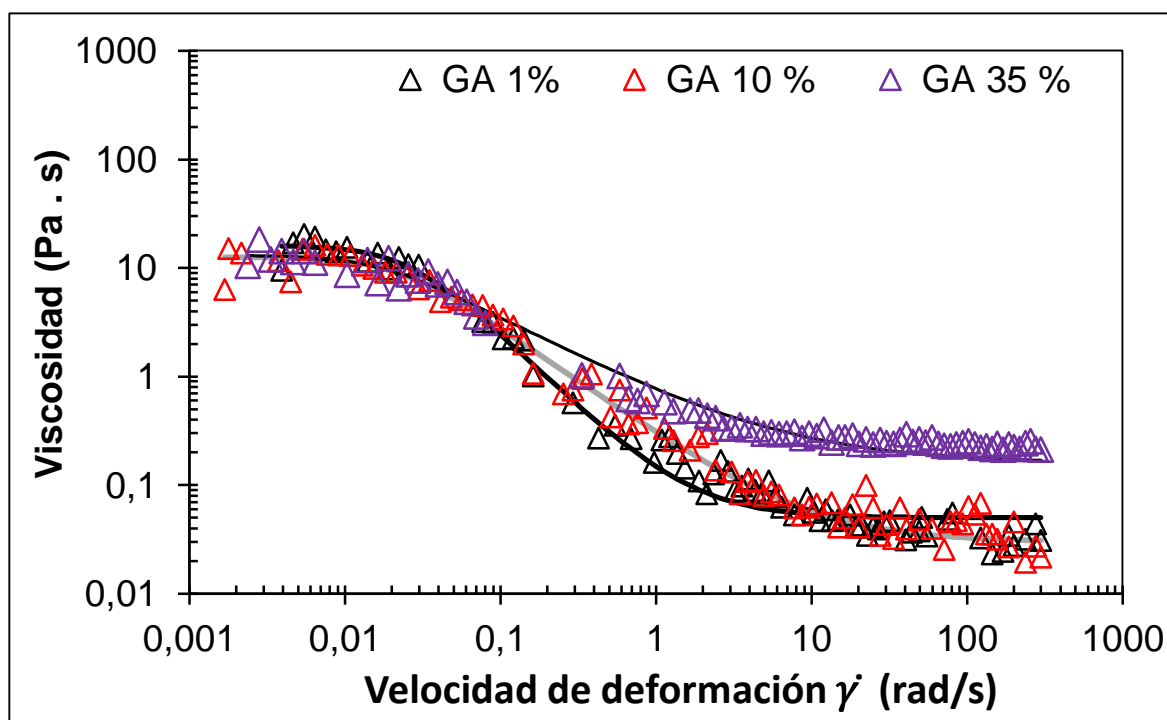
En este punto es importante señalar que si bien este comportamiento es el esperado para la enorme mayoría de los polisacáridos en solución acuosa, en reportes anteriores donde se realizó una caracterización parcial del comportamiento reológico de la goma brea se informaron resultados distintos. Por ejemplo, Bertuzzi *et al.*<sup>34</sup> en un trabajo publicado en 2012 midieron curvas de flujo de soluciones de la goma brea utilizando un viscosímetro rotatorio e informaron que las soluciones de la misma, hasta una concentración de 10 % m/v presentaban comportamiento newtoniano hasta velocidades de deformación de 1,5  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$  aproximadamente. Si bien en este trabajo utilizaron la goma sin realizar un proceso de purificación, cabe mencionar que aunque no se presentan en este trabajo de Tesis, para la fracción **GBC** (ver **Capítulo 2, sección 2.1.1**), similar a la utilizada en el trabajo citado, se encontraron resultados coincidentes con los de la fracción purificada **GB**.

En la **Figura 4.7** se muestra el gráfico de viscosidad aparente en función de la velocidad de cizallamiento de las soluciones de **GA**, con concentraciones de 1 %, 10 % y 35 % m/v, ya que las mismas resultaron representativas del comportamiento en todo el rango de concentraciones estudiado. En primer lugar, se puede apreciar que para las tres concentraciones mostradas la viscosidad presenta el mismo comportamiento que el descrito anteriormente para **GB**. En segundo lugar, se observa de forma cualitativa que a diferencia de lo visto para las soluciones de **GB**,  $\eta_0$  es prácticamente igual para las tres concentraciones

mostradas (y como se verá posteriormente en detalle para todas las soluciones de goma arábica en el rango de concentraciones ensayado). Sin embargo, se aprecia que al aumentar la concentración de **GA** el valor de  $\eta_{\infty}$  aumenta ligeramente.

Cabe recordar que las soluciones de polisacáridos con concentraciones más altas que la concentración crítica ( $C^*$ ) dan origen a comportamientos no newtonianos donde las macromoléculas individuales se interpenetran de tal manera en los dominios de las demás que se producen cambios en las propiedades de flujo, reflejados en un aumento más pronunciado tanto de la viscosidad newtoniana  $\eta_0$  como de la dependencia de la viscosidad aparente con la velocidad de deformación<sup>177</sup>. Por lo tanto, de acuerdo con lo observado en las **Figuras 4.5 a 4.7**, todos los sistemas acuosos evaluados en el rango de concentración de 1-35% m/v tanto de **GB** como de **GA** se encontraban por encima de su respectivo valor de  $C^*$ . Es decir que incluso a una concentración de 1% m/v, las macromoléculas hidratadas de estas gomas ya se encontraban interactuando entre ellas.

En la **Tabla 4.3** se presentan los parámetros obtenidos del ajuste con el modelo de Carreau de todas las concentraciones estudiadas para las soluciones tanto de **GB** como de **GA**.



**Figura 4.7.** Gráfico de Viscosidad aparente vs. velocidad de deformación para soluciones de **GA** con concentraciones de 1 %, 10 % y 35 % a 20 °C.

**Tabla 4.3.** Valores obtenidos para el ajuste con el modelo de Carreau de las curvas de viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación de las soluciones de **GB** y de **GA**.

Concentración (% m/v)	pH	$\eta_0$ (Pa s)	$\eta_\infty$ (Pa s)	$\tau$ (s)	M	R <sup>2</sup>
<b>GB</b>						
1	4,26	27 ± 1	0,02 ± 0,3	118 ± 23	0,380 ± 0,05	0,955
2,5	4,11	21 ± 0,7	0,03 ± 0,35	53 ± 13	0,410 ± 0,08	0,931
5	4,04	115 ± 2	0,04 ± 0,55	139 ± 13	0,460 ± 0,03	0,984
10	3,98	98 ± 2	0,03 ± 0,46	256 ± 24	0,370 ± 0,02	0,987
17,5	3,88	84 ± 2	0,25 ± 0,27	228 ± 18	0,410 ± 0,02	0,991
35	3,77	147 ± 1	1,20 ± 0,2	307 ± 10	0,417 ± 0,008	0,999
<b>GA</b>						
1	5,06	16,2 ± 0,6	0,050 ± 0,17	38 ± 9	0,70 ± 0,2	0,955
2,5	4,85	19,5 ± 0,2	0,016 ± 0,06	169 ± 10	0,40 ± 0,02	0,995
5	4,68	11,7 ± 0,4	0,030 ± 0,17	31 ± 7	0,50 ± 0,1	0,953
10	4,62	12,6 ± 0,4	0,030 ± 0,19	45 ± 11	0,50 ± 0,1	0,936
17,5	4,44	4,9 ± 0,1	0,090 ± 0,06	8 ± 3	1,00 ± 0,4	0,950
35	4,27	13,1 ± 0,5	0,160 ± 0,17	62 ± 15	0,37 ± 0,07	0,945

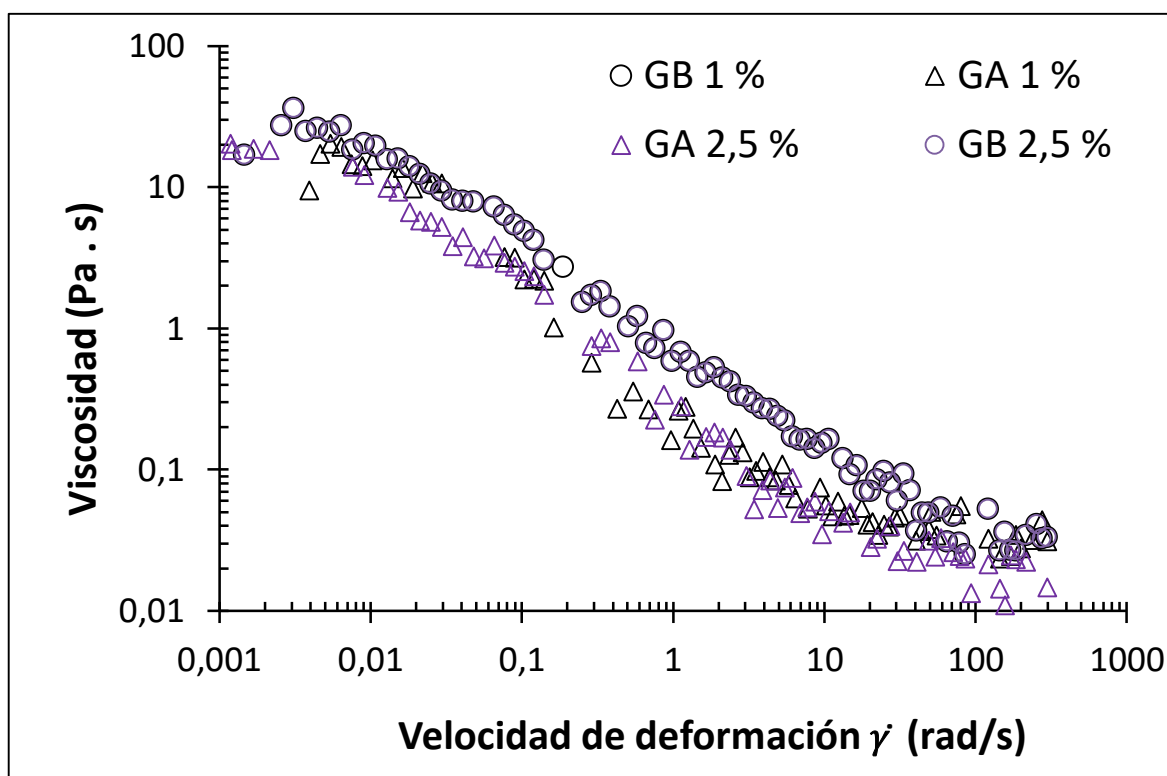
Al observar los resultados obtenidos para las soluciones de **GB** en la **Tabla 4.3**, se aprecia que la viscosidad newtoniana ( $\eta_0$ ) se encuentra en un rango entre 21 y 147 Pa.s, y aumenta al incrementar la concentración de las soluciones de la goma, con algunas excepciones. Claramente las soluciones más diluidas (1 y 2,5 %) tienen los menores valores de  $\eta_0$  y son similares entre sí. Luego, se observa que el valor obtenido para la solución de 5 % m/v es ligeramente mayor que el correspondiente a las soluciones de 10 % y 17,5 % m/v, aunque los valores determinados para estas tres concentraciones se asumen similares en torno a 100 Pa.s. Finalmente la solución más concentrada es la que posee mayor  $\eta_0$ .

Por otro lado, los valores de viscosidad correspondientes a velocidades de deformación muy altos ( $\eta_\infty$ ) son muy similares para las soluciones de 1 a 10 % m/v y se encuentran entre 0,02 y 0,04 Pa.s, es decir, entre 3 y 4 órdenes de magnitud menores que  $\eta_0$ . Además,  $\eta_\infty$  aumenta sólo en las soluciones de mayor concentración (17,5 % y 35 % m/v) alcanzado valores de 0,25 y 1,20 Pa.s respectivamente. Cabe destacar que al observar las curvas de viscosidad aparente mostradas en las **Figuras 4.5** y **4.6** se observa que para una

velocidad de  $0,1 \text{ rad.s}^{-1}$  la viscosidad de las soluciones mostradas es muy similar, en torno a  $10 \text{ Pa.s}$ .

En cuanto a los resultados obtenidos para la goma arábica, se observa un comportamiento distinto. A diferencia de **GB**, los valores de  $\eta_0$  se mantienen prácticamente constantes en el rango de concentraciones estudiado, con valores entre  $11,7$  y  $19,5 \text{ Pa.s}$  a excepción de la solución de  $17,5 \text{ \% m/v}$  que presenta un valor más bajo de  $4,9 \text{ Pa.s}$ . Por otro lado, los valores de  $\eta_\infty$  se encuentran entre  $0,016$  y  $0,16 \text{ Pa.s}$  y presentan un comportamiento similar al descrito para **GB**. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado en la bibliografía consultada<sup>11</sup>.

Al comparar los resultados obtenidos para **GB** y **GA** se puede apreciar en líneas generales que para cada concentración estudiada los valores de viscosidad aparente son menores para la goma arábica, especialmente a bajas velocidades de deformación. A altas valores de  $\dot{\gamma}$ , los valores de  $\eta_\infty$  son similares, fundamentalmente a concentraciones menores a  $10 \text{ \% m/v}$ . Sin embargo, para las concentraciones de  $1$  y  $2,5 \text{ \%}$ , los valores tanto de  $\eta_0$  como de  $\eta_\infty$  de las dos gomas analizadas son semejantes. De hecho, como se observa en la **Figura 4.8**, las curvas de viscosidad en función de la velocidad de deformación para ambas gomas en estas concentraciones son similares.



**Figura 4.8.** Comparación de las curvas de las soluciones de 1 % y 2,5 % de viscosidad aparente vs. velocidad de deformación de **GB** y **GA**.

Por otro lado, podemos observar comparando las **Figuras 4.5 a 4.7** que la región newtoniana  $\eta_0$  es más extensa para **GA** respecto de **GB**. Este resultado se ve reflejado en los valores del tiempo característico  $\tau$  obtenidos al ajustar las curvas con el modelo de Carreau (ver **Tabla 4.3**), los cuales para **GA** se encuentran entre 8 y 62 s mientras que para **GB** se obtuvieron valores entre 118 y 307 s. Esta diferencia indica que el sistema conformado por **GB** es más estructurado y por lo tanto más sensible a los cambios de  $\dot{\gamma}$ , por lo que la viscosidad de estas soluciones decrece más rápido con el aumento de la misma<sup>179</sup>.

Si se extiende la comparación de la viscosidad aparente de las soluciones obtenidas para **GB** respecto de otras gomas se puede apreciar que **GB** presenta generalmente una viscosidad menor, especialmente a velocidades de deformación medias y altas. En la **Tabla 4.4** se muestra la viscosidad reportada en bibliografía<sup>30,180,181</sup> para distintas gomas a diferentes valores de concentración y de velocidad de deformación en conjunto con los resultados obtenidos para las soluciones de **GB** en las mismas condiciones o muy similares.

**Tabla 4.4.** Viscosidad de distintas gomas a diferentes valores de concentración y velocidad de deformación.

Goma	Concentracion % m/v	$\dot{\gamma}$ (s <sup>-1</sup> )	$\eta$ (Pa.s)
<b>GB</b>	1	0,1	4,88
	1	300	0,02
	2,5	1	0,74
	5	1	1,50
	10	1	1,50
	17,5	1	1,07
	17,5	300	0,25
<b>Goma xántica</b> <sup>180</sup>	1	0,1	1000
		300	0,5
<b>Goma guar</b> <sup>181</sup>	3	1	0,5
	6	1	10,0
	9	1	50,0
<b>Goma ghatti</b> <sup>30</sup>	15	1-1000 <sup>a</sup>	0,1

<sup>a</sup> Esta goma presenta un comportamiento prácticamente newtoniano por lo que la viscosidad es muy similar en un amplio rango de velocidades.

Como se puede observar en la tabla anterior, tanto la goma guar como la goma xántica presentan una viscosidad igual o mayor que **GB** al comparar las soluciones de similar concentración y a la misma velocidad de deformación. En particular, las solución de goma xántica al 1 % m/v presenta una viscosidad aproximadamente 250 veces mayor que **GB** a 0,1 rad.s<sup>-1</sup>, mientras que a velocidades altas la diferencia se achica y es de 25 veces. En cuanto a la comparación con la goma guar, se observa que la solución al 3 % m/v de la misma presenta una viscosidad levemente menor que la **GB** al 2,5 % m/v a  $\dot{\gamma}$  de 1 rad.s<sup>-1</sup> (0,50 Pa.s vs. 0,74 Pa.s), mientras que al incrementar la concentración de las soluciones de la goma guar se aprecia que estas presentan una viscosidad de 7 a 30 veces mayor aproximadamente que soluciones de concentraciones similares de **GB**. La única goma de las mostradas que presenta una viscosidad menor que **GB** es la goma ghatti, cuyas soluciones son prácticamente newtonianas y la solución al 15 % m/v de esta goma presenta una viscosidad de 10 a 2,5 veces menor que la solución de **GB** al 17,5 % m/v.

Por lo tanto, los resultados obtenidos del análisis del comportamiento de flujo de la **GB** indican que la misma presenta una viscosidad levemente mayor que la goma arábica, aunque

la viscosidad de sus soluciones es en la mayoría de los casos menor que las de otras gomas comerciales, en un rango amplio de concentraciones y velocidades de deformación.

### 4.2.3 Ensayos oscilatorios dinámicos

#### 4.2.3.1 Espectros mecánicos

Una vez establecido el comportamiento pseudoplástico de **GB** y de **GA** por medio de ensayos de flujo (ver **sección 4.2.2**), se decidió analizar sus propiedades viscoelásticas. Para ello se evaluaron los espectros mecánicos de soluciones de estas gomas en el mismo rango de concentraciones que fue estudiado anteriormente, entre 1 % y 35 % m/v. Los espectros se registraron a 20°C.

En las **Figuras 4.9** y **4.10** se muestran los espectros mecánicos obtenidos para las soluciones de **GB** en todo el rango de concentraciones estudiado, donde se puede observar que tanto los valores del módulo de almacenamiento o módulo elástico ( $G'$ ) como del módulo de pérdida o módulo viscoso ( $G''$ ) dependen de la frecuencia aplicada. Para las soluciones de 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 % y 17,5 % m/v  $G'$  se encontraba por arriba de  $G''$  en todo el rango de frecuencias evaluado, lo que indica que este espectro se corresponde al de un material que forma un “gel débil”<sup>174</sup>. Por otro lado, como se observa en la **Figura 4.10**, para la solución de 35 % las curvas de  $G'$  y  $G''$  presentan un punto de cruce a una frecuencia más baja (a 1,25 Hz) lo que implica que esta solución presenta un comportamiento que se corresponde más con el de una “solución concentrada” que el de un gel débil.

La mayor dependencia de la frecuencia para los módulos dinámicos que caracteriza los espectros mecánicos de los “geles débiles” sugiere la existencia de procesos de relajación que ocurren en escalas de tiempo cortas (frecuencias más altas)<sup>174</sup>. Por lo tanto, los reordenamientos moleculares de los arabinoglucuronoxilanos hidratados en **GB** entre 1 y 17,5 % m/v fueron importantes en la escala de tiempo evaluada, mientras que la diferencia pequeña entre los valores de  $G'$  y  $G''$  ( $G' > G''$ ) indicó que se recuperó una pequeña proporción de la energía almacenada<sup>174</sup>.

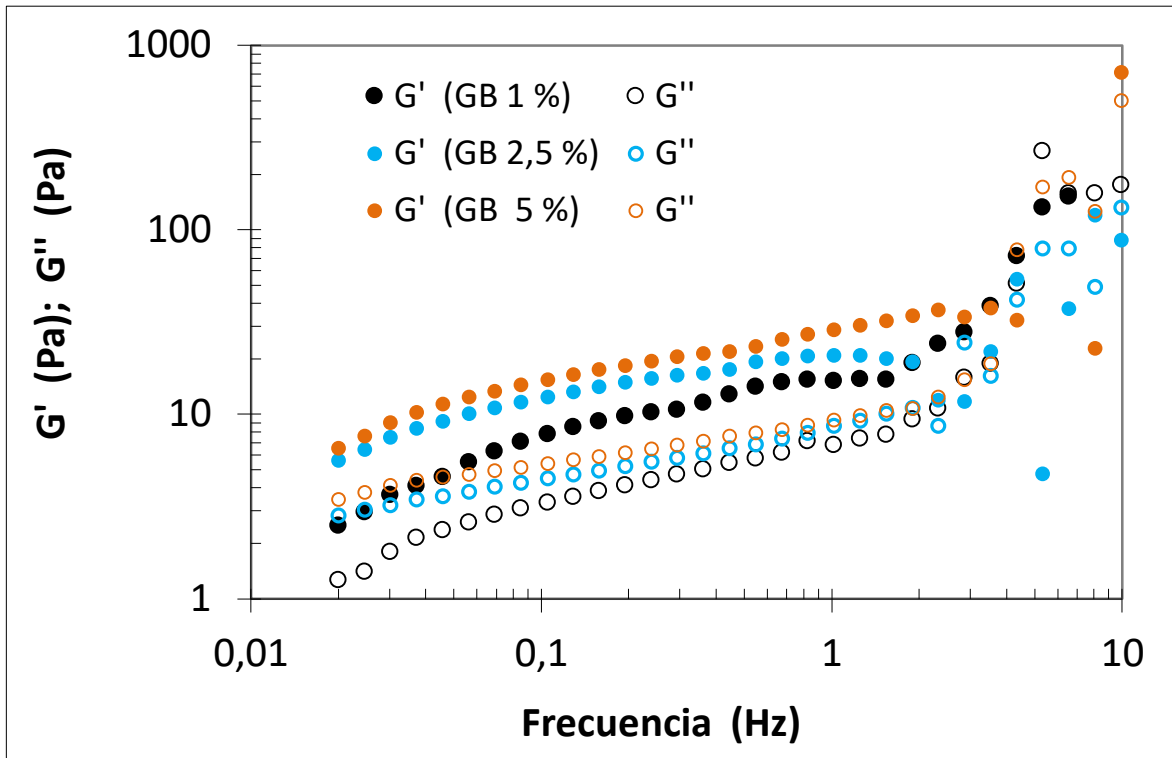


Figura 4.9. Espectros mecánicos de las soluciones de GB al 1 %, 2,5 % y 5 % m/v a 20 °C. Los círculos llenos se corresponden con el módulo  $G'$  mientras que los círculos vacíos se corresponden con  $G''$ .

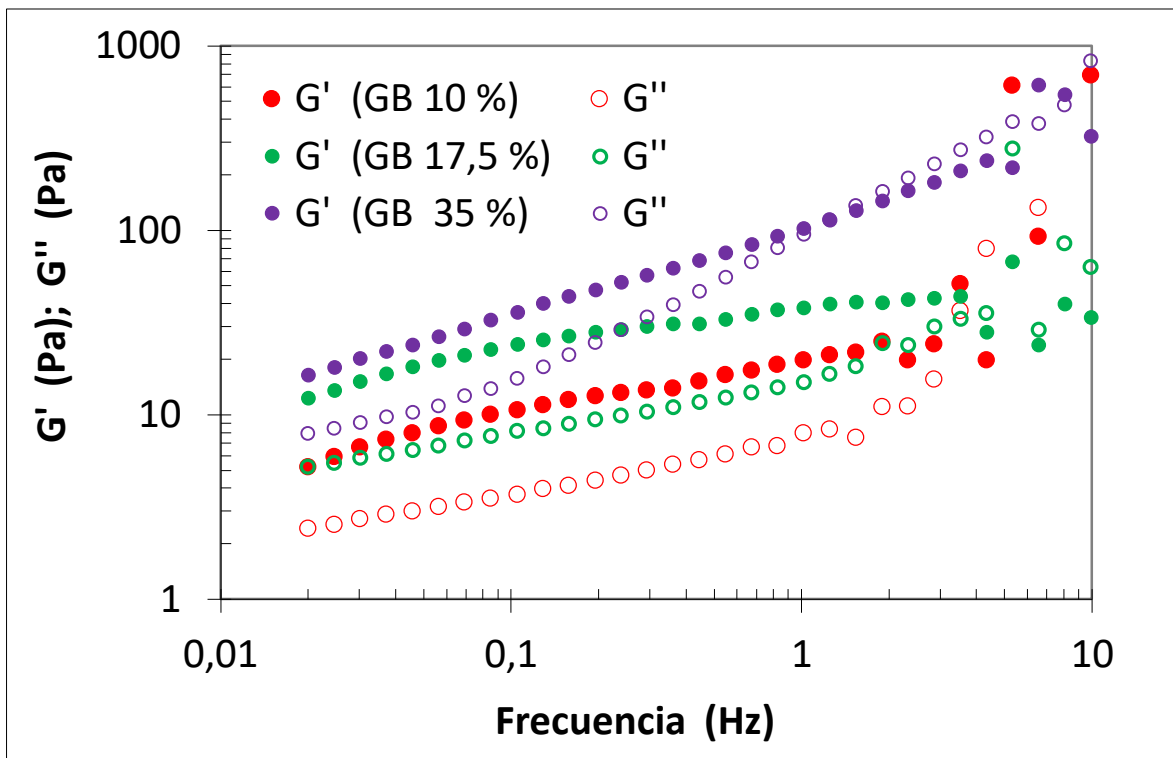


Figura 4.10. Espectros mecánicos de las soluciones de GB al 10 %, 17,5 % y 35 % m/v a 20 °C. Los círculos llenos se corresponden con el módulo  $G'$  mientras que los círculos vacíos se corresponden con  $G''$ .



El hecho de que la solución de **GB** de 35 % m/v presente una solución menos estructurada que las soluciones con concentraciones entre 1 % y 17,5 % m/v se puede explicar teniendo en cuenta que probablemente en esa solución las cadenas de los polisacáridos estén significativamente menos hidratadas que a concentraciones más bajas, por lo que las características de las redes formadas en este caso seguramente sean distintas que en soluciones más diluidas. Una menor proporción de agua disponible podría haber determinado un comportamiento diferente en el caso de **GB** al 35 % debido a un debilitamiento de la red polimérica producto de un menor número de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua.

En la **Figura 4.12** se presentan los espectros mecánicos obtenidos de las soluciones de **GA** al 1 %, 10 % y 35 % m/v. Se puede apreciar para todas las concentraciones una gran dependencia tanto del módulo  $G'$  como  $G''$  con la frecuencia. Además, al contrario de lo observado para las soluciones de **GB**, el módulo de pérdida  $G''$  se encuentra en general por encima del módulo de almacenamiento  $G'$  a frecuencias bajas, observándose un cruce a una frecuencia de 0,7 Hz aproximadamente. Por lo tanto, las características de estas curvas indican que las soluciones de **GA** en el rango de concentraciones estudiado se comportan como “soluciones diluidas a semidiluidas”. Asimismo cabe destacar que los valores obtenidos para ambos módulos en las curvas de **GA** se encuentran uno o dos órdenes de magnitud por debajo de los correspondientes a **GB**, especialmente a frecuencias bajas.

El comportamiento de la goma arábiga en solución acuosa ha sido extensamente estudiado y se relaciona íntimamente con su composición. Como se describió en el Capítulo 1, la goma arábiga está compuesta por tres fracciones: un arabinogalactano (AG; 88 %), un complejo arabinogalactano—proteína (AGP; 10 %) y una glicoproteína (2 %). Se ha establecido que las redes formadas por la goma arábiga en solución acuosa resultan de la yuxtaposición de dos bloques estructurales<sup>182</sup>. Uno de estos bloques corresponde a polisacáridos hiperramificados, los cuales constituyen estructuras esféricas porosas multiescala<sup>182</sup>. La otra estructura resulta de la existencia de cadenas polipeptídicas que en solución acuosa adoptan una conformación al azar que se conoce como cadenas gaussianas. Estos dos bloques estructurales se encuentran unidos y presentan una estructura global compatible con el aspecto de las flores de las acacias<sup>182</sup> (ver **Figura 4.11**).



Figura 4.11. Fotografía de flores de una acacia.

Debido a esta estructura, la dispersión coloidal resultante muestra una viscosidad mucho más débil que si tuviera una estructura de un polímero lineal<sup>182</sup>. Esto explica por qué goma arábica presenta una gran solubilidad en agua y al mismo tiempo no se produce un aumento en la viscosidad de la solución a altas concentraciones<sup>182</sup>. A su vez, los espectros mecánicos observados en la **Figura 4.12** se pueden explicar por el mismo fenómeno.

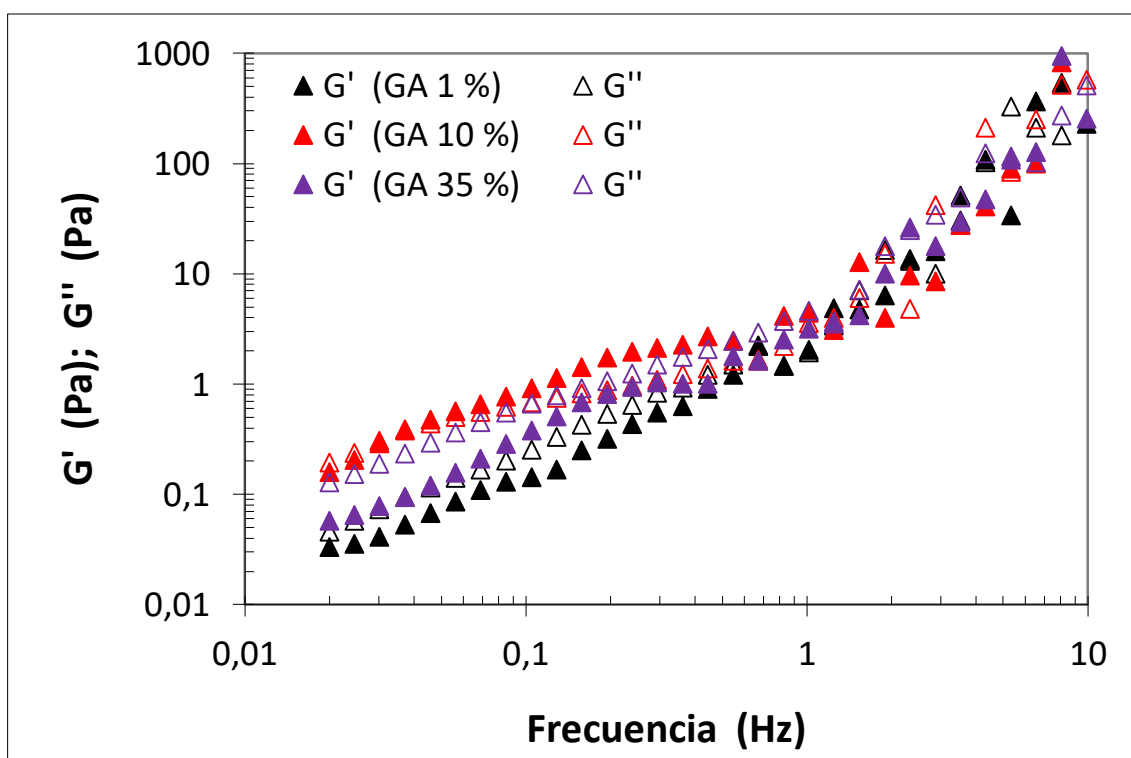


Figura 4.12. Espectros mecánicos de las soluciones de GA al 1 %, 10 % y 35 % m/v. Los triángulos llenos se corresponden con el módulo  $G'$  mientras que los triángulos vacíos se corresponden con  $G''$ .

Por otro lado, es común que exista una relación entre el valor del módulo de almacenamiento  $G'$  y la concentración del polisacárido en solución. El módulo  $G'$  es directamente proporcional al número de uniones físicas formadas y generalmente aumenta con la concentración de la solución. Es habitual que esta relación responda a un comportamiento que se modela con la ley de la potencia ( $G' = A \cdot C^t$ )<sup>183</sup> donde es  $C$  la concentración,  $A$  una constante y  $t$  es el tiempo. Por este motivo, se tomó el valor de  $G'$  a 0,4 Hz de cada espectro mecánico obtenido a partir de las soluciones de **GB** y **GA** y se graficaron los resultados en función de la concentración de la solución. Los resultados obtenidos se pueden observar en las **Figuras 4.13** y **4.14** correspondientes a las soluciones de **GB** y de **GA** respectivamente.

En primer lugar, se puede apreciar que para las soluciones de **GB** no se pueden ajustar los datos experimentales con una única ecuación lineal. Visualmente se puede apreciar que existen dos zonas diferenciadas, la primera entre 1 % y 5 % y la segunda entre 10 % y 35 %, las cuales fueron ajustadas utilizando la ley de la potencia por separado, obteniendo dos ecuaciones distintas con muy buenos coeficientes de ajuste ( $R^2$ ) en cada caso. Este mismo comportamiento inusual ha sido reportado por otros autores<sup>183,184</sup>. Por ejemplo, Gunasekaran y Yoon<sup>183</sup> al estudiar mezclas de goma garrofín y goma xántica 1:1 en concentraciones entre 0,1 y 3 % m/v diferenciaron dos zonas con curvas de ajuste distintas.

Al analizar los ajustes obtenidos, se puede apreciar que el exponente correspondiente a la zona de mayores concentraciones es mayor (1,024 vs. 0,401), lo que indica que  $G'$  presenta una mayor dependencia de la concentración en las soluciones más concentradas.

Por otro lado, como se puede apreciar en la Figura 4.14, los valores del módulo  $G'$  para las soluciones de **GA** presentan valores del mismo orden de magnitud, aproximadamente de 1 Pa, a excepción de la solución más diluida donde el valor es 0,25 Pa. Como se explicó anteriormente<sup>182</sup>, este comportamiento se debe a que existe una interacción leve entre las partículas coloidales hidratadas que componen la goma arábiga, por lo que la interacción entre las mismas no contribuye de forma importante a la respuesta elástica de las soluciones de esta goma, las cuales constituyen esencialmente sistemas fluidos.

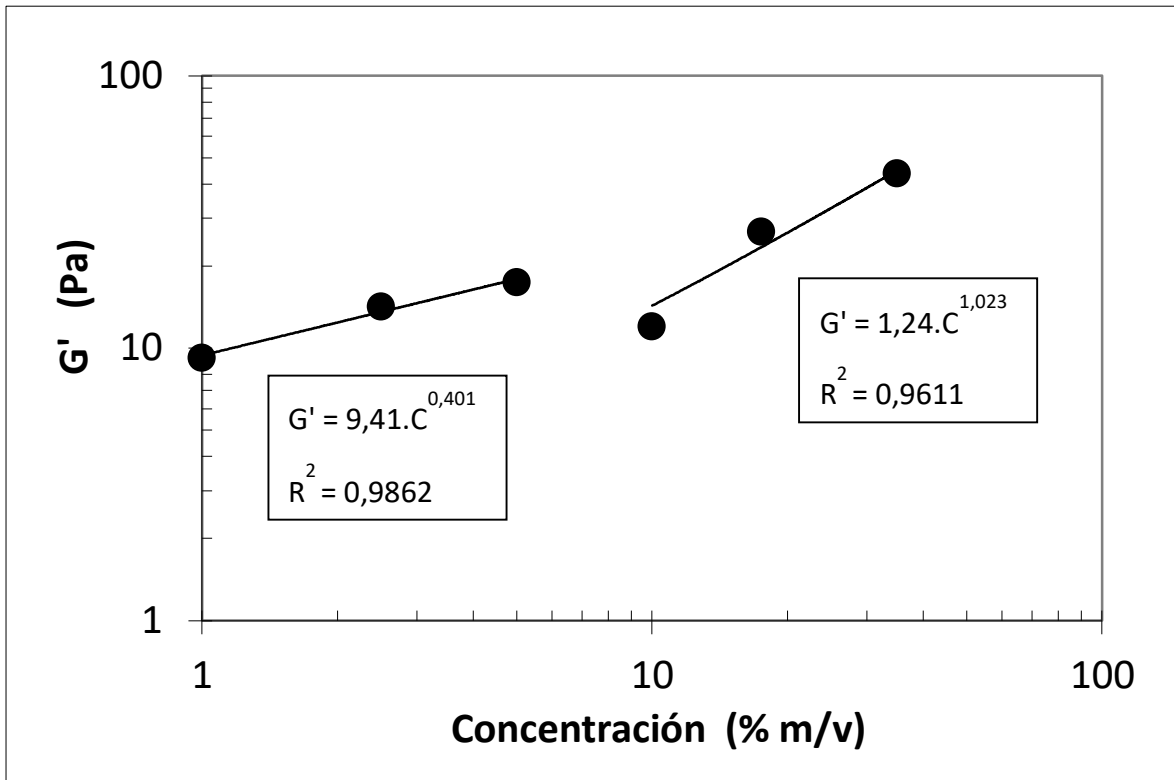


Figura 4.13. Gráfico de  $G'$  en función de la concentración (% m/v) de la solución para GB.

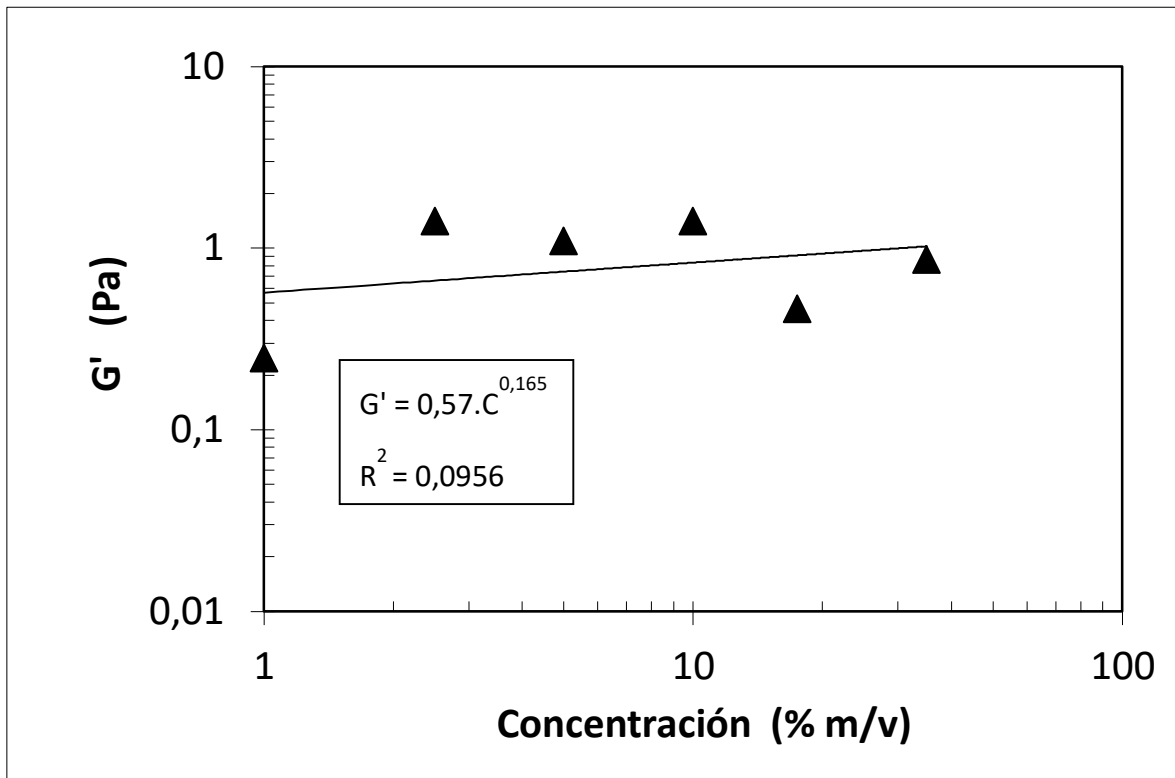


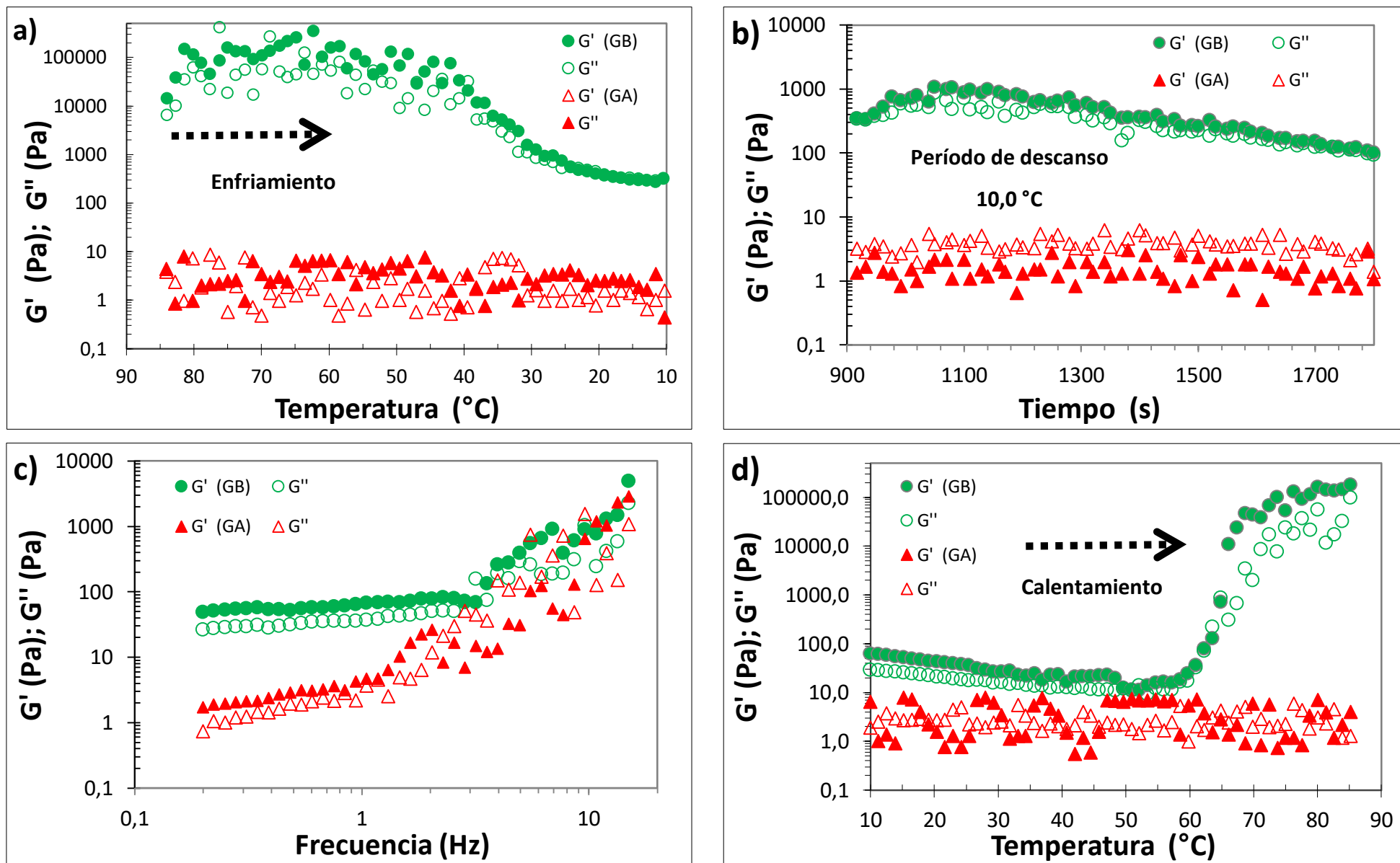
Figura 4.14. Gráfico de  $G'$  en función de la concentración (% m/v) de la solución para GA.

#### 4.2.3.2 Ensayos dinámicos con temperatura

Se realizó un ciclo de ensayos dinámicos a distintas temperaturas para evaluar la respuesta térmica de una solución de **GB** a 17,5 % m/v y de una solución de **GA** al 10 % m/v. Para ello se comenzó con la medición de los módulos  $G'$  y  $G''$  a 1 Hz con una temperatura inicial de 85 °C y una rampa de enfriamiento de 5 °C/min (ver **Figura 4.15 a** ). Luego de esta primera etapa, se midieron ambos módulos también a 1 Hz por 900 s a una temperatura constante de 10 °C (**Figura 4.15 b** ). En una tercera etapa, se registró el espectro mecánico del sistema a 10 °C (ver **Figura 4.15 c** ). Finalmente, se sometió el sistema a una rampa de calentamiento de 5 °C/min para evaluar la temperatura de fusión del sistema comenzando a 10 °C hasta 85 °C (ver **Figura 4.15 d** ).

Como se puede observar en la **Figura 4.15 a**) durante la rampa de enfriamiento realizada a 1 Hz de frecuencia constante, se observó en la curva de **GB** un punto a 26,8 °C donde  $G'$  cruza por debajo de  $G''$ , lo que se conoce como temperatura de gelificación. En cambio, para la curva correspondiente a **GA** no se observa una temperatura de gelificación ya que los módulos  $G'$  y  $G''$  se mantienen relativamente constantes, con valores entre 1 y 10 Pa aproximadamente.

Además, en esa misma figura se observó un comportamiento particular en la curva correspondiente a **GB** donde  $G'$  disminuyó varios ordenes de magnitud al enfriarse la solución, desde  $\approx 262$  kPa a 85 °C hasta  $\approx 0,29$  kPa a 10 °C. Teniendo en cuenta que los enlaces de hidrógeno se rompen con el aumento de temperatura y se vuelven a formar al enfriarse, los valores más altos de  $G'$  a las temperaturas más altas significan que cuando se rompen los enlaces de hidrógeno entre el agua y las cadenas de los polisacáridos, las interacciones que prevalecen entre las cadenas son de tipo hidrofóbicas<sup>185</sup>, las cuales a alta temperatura resultaron muy intensas para **GB**.



**Figura 4.15.** Gráficos de  $G'$  y  $G''$  obtenidos del ciclo de temperatura. Los círculos en verde se corresponden con **GB** al 17,5 % mientras que los triángulos en rojo se corresponden con **GA** al 10 %. a) Curva de enfriamiento; b) Período de descanso; c) Espectro mecánico a  $10^{\circ}\text{C}$ ; d) curva de calentamiento.

La solución de **GA** mostró valores bajos de  $G'$  ( $\approx 1,5$  Pa) durante el período de reposo isotérmico de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Figura 4.15 b**), y además los mismos estuvieron siempre por debajo de los valores de  $G''$ . Por otro lado, se observó lo inverso para la solución de **GB**, es decir que los valores de  $G'$  siempre se encontraron por encima pero muy cercanos a los de  $G''$  durante el mismo período. Sin embargo, los valores de ambos módulos de **GB** disminuyeron con el aumento del tiempo, período en el que ocurrió una estructuración de la red de biopolímeros. Este hecho podría indicar que los enlaces de hidrógeno de las cadenas de los polisacáridos con las moléculas de agua no serían una interacción predominante durante el período de reposo.

Por otro lado, en el espectro mecánico de la solución de **GB** registrado a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  después del tiempo de reposo de  $900\text{ s}$  (**Figura 4.15 c**) se observa que los valores del módulo de almacenamiento  $G'$  siempre se encuentran cercanos pero por encima de los correspondientes al módulo  $G''$ . Además, los valores de ambos módulos presentan dependencia con la frecuencia, al igual que se observó anteriormente en los espectros mecánicos de las **Figuras 4.9 y 4.10**, lo que apunta a una estructura de tipo “gel débil”.

En cuanto al espectro mecánico registrado para la solución de **GA**, se puede apreciar que el módulo  $G'$  es ligeramente mayor que  $G''$  a frecuencias bajas, y que a su vez luego de  $1\text{ Hz}$  ambos módulos presentan una importante dependencia con la frecuencia. Estas características son compatibles con un sistema del tipo “solución semiconcentrada”. Cabe destacar que si bien las curvas de **GB** y de **GA** en esta figura parecen similares, la diferencia entre los módulos  $G'$  y  $G''$  es mucho mayor para **GB** (escala de los gráficos logarítmica), lo que evidencia un sistema más estructurado.

Finalmente, se puede apreciar que durante la rampa de calentamiento de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y frecuencia constante de  $1\text{ Hz}$  (ver **Figura 4.15 d**) los módulos  $G'$  y  $G''$  de la curva de **GA** presentan valores bajos que oscilan entre  $1$  y  $10\text{ Pa}$ , y por lo tanto la misma no presenta una temperatura de fusión, lo cual es consistente con el hecho de que estos polisacáridos se comportan como un sistema fluido.

En cambio, para la curva correspondiente a **GB**, se puede observar que tanto  $G'$  como  $G''$  comienzan a aumentar a partir de una temperatura de  $47,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aunque no puede determinarse con claridad una temperatura de fusión. Además, entre  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  el módulo de almacenamiento  $G'$  se encuentra por sobre el módulo viscoso  $G''$ . Al igual que en la curva de enfriamiento a), el comportamiento térmico de **GB** durante el calentamiento indica que las

interacciones que prevalecen entre las cadenas son de tipo hidrofóbicas ya que al aumentar la temperatura se rompen los enlaces de hidrógeno<sup>185</sup>. Cabe destacar que el comportamiento observado durante la etapa de calentamiento, donde los módulos de  $G'$  y  $G''$  aumentan alcanzando valores similares a los iniciales, indica que el sistema de gel débil formado por los polisacáridos de **GB** es termorreversible.

Un comportamiento térmico similar al observado para **GB** fue reportado por Li<sup>185</sup> en un trabajo publicado en 2002 sobre metilcelulosa. El autor informó que cuando el sistema formado por este polisacárido era calentado, parte de la energía se consumía para destruir los enlaces de hidrógeno, primero con las moléculas del agua y luego los establecidos entre las mismas cadenas de la metilcelulosa, lo que habilitaba a que se estableciera una asociación intermolecular entre las cadenas por interacciones hidrofóbicas. En este sentido, Medronho *et al.*<sup>186</sup> indicaron que la insolubilidad de la celulosa en agua podía explicarse por una interacción hidrofóbica entre las cadenas que superaba la intensidad de los enlaces de hidrógeno que se pudieran formar entre las mismas y con el agua. Los autores propusieron que estas interacciones de tipo hidrofóbicas podían ocurrir por un apilamiento en el sentido axial de los anillos glucopiranosicos, debido a que los grupos hidroxilo de los mismos se encuentran ecuatoriales y direccionados hacia afuera, permitiendo dicha interacción. En el caso de la **GB**, la conformación de las unidades de  $\beta$ -D-xilosa es similar a la de los residuos de  $\beta$ -D-glucosa en la celulosa por lo que las cadenas de los polisacáridos podrían interactuar entre sí de forma análoga, vía interacción hidrofóbica axial<sup>187</sup>. Por lo tanto, esto podría explicar el aumento abrupto del módulo  $G'$  en los ensayos con temperatura, ya que al aumentar la temperatura y removerse las moléculas de agua los arabinoglucuronoxilanos podían interactuar entre sí de esta manera.



#### 4.2.4 Curvas de flujo de productos derivados de GB

Una vez caracterizada la goma brea, se realizaron curvas de flujo a algunos de los productos obtenidos a partir de la misma para poder analizar el impacto de las modificaciones químicas en las propiedades reológicas. En particular, se estudió el comportamiento de flujo del producto reducido **GBR** al 5 % m/v, el desacetilado **GBD** al 10 % m/v y un derivado amidado con propilamina con un grado de amidación de 90 % que se denominó **GB-APr-90** al 5 % m/v. Las curvas de viscosidad aparente vs. velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) obtenidas de estos productos en conjunto con la de **GB** al 5 % m/v se muestran en la **Figura 4.16**. Cabe destacar que para realizar cada ensayo se necesita una cantidad de masa importante (mínimo 100 mg) por lo que la cantidad de ensayos y muestras analizadas quedó limitada por las posibilidades de obtención de dichos materiales.

Al analizar las curvas mostradas en la **Figura 4.16**, se puede apreciar que para todos los productos obtenidos a partir de **GB**, la viscosidad es menor que para la solución de **GB** al 5 %, en particular a valores de velocidad de deformación bajos y medios. Además, se puede observar que las curvas obtenidas para dichos productos son similares entre sí. Estos resultados indican que tanto la modificación de los ácidos carboxílicos por reducción o amidación de los mismos, como la desacetilación de los polisacáridos alteran de forma similar las propiedades de flujo de los polisacáridos de la goma brea, volviendo menos viscosas a las soluciones de estos productos.

En la **Tabla 4.5** se presentan los parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de viscosidad empleando el modelo de Carreau en conjunto con los resultados obtenidos para la **GB** al 5 % y la **GA** al 5 % y al 10 % m/v.

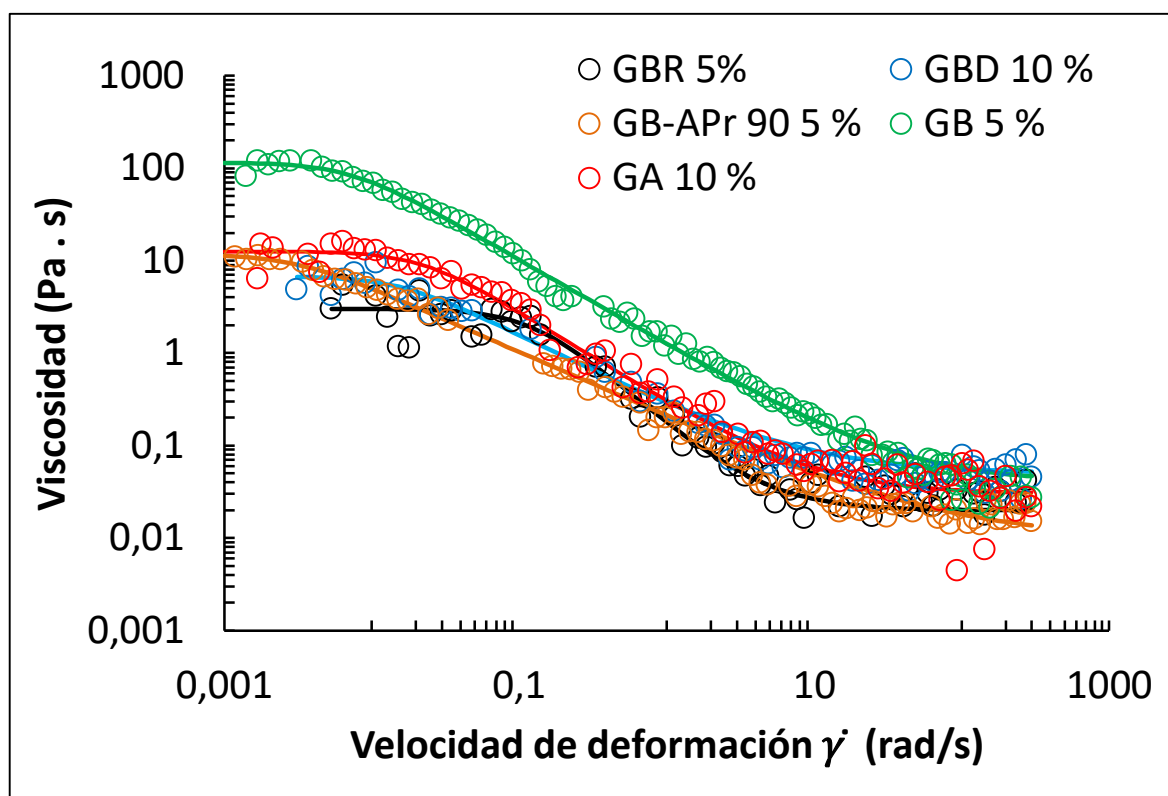


Figura 4.16. Curvas de viscosidad vs. velocidad de deformación de **GB**, de los derivados **GBR**, **GBD** y **GB-APr-90** y de **GA**.

Tabla 4.5. Valores obtenidos del ajuste con el modelo de Carreau de los distintos productos derivados de **GB**.

Muestra	$\eta_0$ (Pa s)	$\eta_\infty$ (Pa s)	$\tau$ (s)	M	R <sup>2</sup>
GB 5 %	115 ± 2	0,04 ± 0,55	139 ± 13	0,460 ± 0,03	0,984
GBR 5 %	3,0 ± 0,2	0,02 ± 0,11	8 ± 5	0,7 ± 0,4	0,801
GBD 10 %	6,8 ± 0,4	0,05 ± 0,11	64 ± 23	0,4 ± 0,1	0,910
GB-APr-90 5 %	11,6 ± 0,2	0,01 ± 0,03	322 ± 21	0,35 ± 0,01	0,997
GA 5 %	11,7 ± 0,4	0,030 ± 0,17	31 ± 7	0,50 ± 0,1	0,953
GA 10 %	12,6 ± 0,4	0,030 ± 0,19	45 ± 11	0,50 ± 0,1	0,936

Al analizar los parámetros de ajuste obtenidos se puede reafirmar lo visto gráficamente en la **Figura 4.16**. El valor de  $\eta_0$  del producto **GB-APr-90** es diez veces menor que el correspondiente a **GB**, mientras que los obtenidos para los productos **GBR** y **GBD** son 20 y 40 veces menores respectivamente. En contraposición, se aprecia que los valores de  $\eta_\infty$  son similares en todos los casos. Por otro lado, si se observan los valores obtenidos para el tiempo característico  $\tau$  se aprecia que el mismo presenta valores muy disímiles según el producto que

se analice. El valor obtenido para el producto amidado **GB-APr-90** es 322 s mientras que el correspondiente al producto reducido **GBR** es mucho menor, de 8 s, lo que se evidencia en la mayor sensibilidad a la velocidad de cizallamiento de la viscosidad del derivado amidado.

Si se comparan los valores obtenidos para estos productos con los correspondientes a **GA** al 5 % y al 10 % m/v se aprecia que son del mismo orden, por lo que los mismos presentan un comportamiento de flujo muy parecido al de esta goma. Incluso, los valores  $\eta_0$  de estos derivados de **GB** son menores que los de **GA**. La mayor diferencia observada es el resultado del tiempo característico  $\tau$ , el cual como ya se dijo presenta valores muy variables según el producto.

### 4.3. Conclusiones

El sistema de arabinoglucuronoxilanos altamente ramificados que constituyen **GB** presentó un comportamiento de flujo pseudoplástico (no newtoniano) en concentraciones entre 1 % y 35 % m/v. Al comparar los resultados con la goma arábica, se pudo ver que en soluciones de igual concentración, **GB** presentaba generalmente valores de viscosidad aparente un orden de magnitud mayores que los de esa goma, especialmente a velocidades de deformación bajas o medias, a excepción de las concentraciones de 1 % y 2,5 % m/v cuyo comportamiento era similar. A altos valores de  $\dot{\gamma}$ , los valores de viscosidad aparente y especialmente de  $\eta_\infty$  resultaron parecidos. Se pudo establecer que en comparación con otras gomas comerciales, **GB** presenta valores de viscosidad menores aún a concentraciones mayores, a excepción de la goma ghatti. Cabe destacar que **GB**, al igual que la goma arábica, presenta una alta solubilidad en agua.

Al estudiar el comportamiento mecánico de **GB**, se observó que estos polisacáridos formaron una red tipo "gel débil" cuando se disolvieron en agua hasta una concentración de 17,5 % m/v. En cambio, a una concentración de 35% m/v, el comportamiento observado por **GB** constituía una "solución concentrada". En contraposición, las soluciones de goma arábica presentaron un comportamiento tipo solución "semi diluida".

Al estudiar el efecto de la temperatura sobre estas gomas, se pudo apreciar que **GB** presentaba un gran aumento del módulo de almacenamiento  $G'$  a mayores temperaturas, lo

cual indicaba la importancia de las interacciones hidrofóbicas en este sistema. Además, se pudo ver que el sistema tipo “gel débil” formado por **GB** era termorreversible, mientras que el comportamiento de la goma arábica no variaba con los cambios de temperatura.

Además, se pudo constatar que los productos obtenidos a partir de **GB** por desacetilación, por reducción de los ácidos urónicos o por amidación con propilamida de estos ácidos presentaban una menor viscosidad aparente que la fracción original, tomando valores similares y en varios casos menores que los de la goma arábica a igual concentración.

En resumen, en base a la caracterización realizada en este trabajo de Tesis y a estudios anteriores que establecieron sus propiedades emulsionantes, se puede afirmar que la goma brea presenta un comportamiento reológico muy interesante. Si bien sus propiedades reológicas no son idénticas a las de la goma arábica, cuando se compara con otras gomas comerciales, ambas muestran un comportamiento cercano, lo que abre la posibilidad de que la goma brea pueda funcionar como sustituto de la goma arábica.

# CAPÍTULO 5

## MATERIALES Y MÉTODOS



## 5.1 Consideraciones generales.

Se utilizaron agitadores magnéticos FAC AM20, Thermolyne Nuova II y Cole-Parmer modelo 4658.

Para las centrifugaciones se utilizaron las centrífugas Sargent S-15700 trabajando a 3400 rpm y Sigma Laboratory Centrifuge 4K15C a 9000-11000 rpm y 10 °C.

Las evaporaciones se realizaron en un evaporador rotatorio Büchi 10566 a presión reducida, con temperaturas del baño de agua inferiores a 45 °C.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad en liofilizador Rificor.

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa (Spectra Por o Sigma) seleccionando el diámetro según el volumen a dializar. El corte de peso molecular empleado fue el que se detalla en cada caso, entre 3500 Da o 6000-8000 Da. Las diálisis se efectuaron 48 h en sistema abierto contra agua corriente y 24-48 h más en sistema cerrado contra agua destilada, en este último caso renovando el agua tres o cuatro veces.

Las determinaciones colorimétricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) empleando celdas de 1 cm de recorrido óptico.

Para las mediciones de pH se utilizó un pHmetro Adwa AD1030 con un electrodo de vidrio AD1131B. Para las reacciones de amidación se utilizó un electrodo Sartorius PY-P22-2s de punta fina.

Los polisacáridos de corallinas fueron obtenidos por el Dr. Diego A. Navarro<sup>90</sup>.

La goma arábiga (Roller Dried) fue donada por la empresa Gelfix S.A.

## 5.2 Obtención de las fracciones GBC y GB

### 5.2.1 Obtención de material

El exudado fue obtenido de los cortes realizados a árboles de *Cercidium praecox* ubicados en la Provincia de Santiago del Estero (Argentina) y secado a temperatura ambiente por varios días para obtener un material seco. Al momento de utilizarlo se lo suspendió en agua hasta alcanzar una concentración aproximada de 50 g/L y se separó por filtración con

papel de filtro Whatman de 2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro el material insoluble, obteniéndose un filtrado que posteriormente fue liofilizado para obtener la fracción **GBC**.

A la fracción **GBC** se la disolvió en agua a una concentración de 50 g/L y los biopolímeros constituyentes fueron precipitados a 4-8 °C por agregado de isopropanol hasta alcanzar una concentración final de 80 % del alcohol. La solución se dejó 24 h a 4 °C y posteriormente el producto precipitado fue separado por centrifugación a 11000 rpm y 10 °C. Se separó y descartó el sobrenadante y posteriormente se secó el precipitado por agregado de acetona y posterior centrifugación en las mismas condiciones. El material obtenido se secó y se denominó **GB**.

### 5.3 Métodos generales

#### 5.3.1 Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales

Se empleó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la técnica descrita por Dubois *et al*<sup>70</sup>.

##### REACTIVOS

- Solución de fenol al 5 % (m/v). Esta solución es estable a temperatura ambiente durante varios meses conservada a temperatura ambiente.
- Ácido sulfúrico 98 % grado analítico.

##### PROCEDIMIENTO

A 0,5 mL de solución conteniendo hasta 70  $\mu\text{g/mL}$  de hidratos de carbono se le agregaron 0,5 mL de fenol al 5 %, se mezcló la solución y se dejó reposar 10 min. Luego se adicionaron 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo. Los tubos se agitaron en un vórtex y se dejaron enfriar por 20 min a temperatura ambiente. En forma paralela se preparó un blanco con agua destilada. Finalmente se leyó la absorbancia del color desarrollado a 480 nm (máximo de absorción de la xilosa).

Teniendo en cuenta que los coeficientes de absorción de los diferentes azúcares son distintos, se calcularon factores de corrección del resto de los azúcares neutros referidos a la xilosa. Por lo tanto, para cuantificar el contenido de hidratos de carbono totales se calcularon



los coeficientes de absorptividad de los derivados de los posibles azúcares neutros que contenían las muestras (arabinosa, glucosa y xilosa). Luego se calcularon los factores de corrección teniendo en cuenta las fracciones molares de cada componente obtenidos por CGL y la relación de los coeficientes de absorptividad, según<sup>86</sup>:

$$f = \sum_i \frac{x_i \varepsilon_i}{\varepsilon_{xil}}$$

Donde  $x_i$  es la fracción molar de cada azúcar,  $\varepsilon_i$  es el coeficiente de absorptividad del mismo azúcar y  $\varepsilon_{xil}$  es el coeficiente de absorptividad de la xilosa.

El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro y se realizó una corrección iterativa teniendo en cuenta el coeficiente de absorptividad de los ácidos urónicos.

### 5.3.2 Determinación de ácidos urónicos

Se realizó siguiendo la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita<sup>69</sup> del método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen<sup>188</sup>.

#### REACTIVOS

- Solución A: ácido sulfámico/ sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6).
- Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.
- Solución C: *m*-hidroxidifenilo (0,15 %) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5 %.

#### PROCEDIMIENTO

Alícuotas de una solución de la muestra conteniendo hasta 200 nmol de un ácido hexurónico se diluyeron con agua hasta 0,5 mL, posteriormente se les agregaron 40  $\mu$ L de la Solución A y se agitaron en vórtex. Sobre los tubos colocados en baño de hielo se adicionaron 2,5 mL de la Solución B. Nuevamente se agitaron los tubos, y se llevaron a un baño de agua a 100 °C durante 30 min. Luego se colocaron sobre hielo para alcanzar la temperatura ambiente y se les agregaron 80  $\mu$ L de la Solución C con inmediata agitación. Los tubos se dejaron reposar entre 5 y 10 minutos, y a continuación se midieron las absorbancias a 525 nm. El color permanece estable por 20 a 30 minutos.

El blanco se preparó con agua destilada y se utilizó D-glucuronolactona de concentración 80 µg/mL como patrón.

En los cálculos se considera que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros es 1/40 de la que produce el ácido glucurónico.

El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro y se realizó una corrección iterativa teniendo en cuenta que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros es 1/40 de la que produce el ácido glucurónico.

### 5.3.3 Determinación cuantitativa de proteínas totales

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Lowry *et al.*<sup>189</sup>

#### REACTIVOS

- Solución A: solución de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0,1 M.
- Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 % en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %.
- Solución C: mezcla de 50 mL de la Solución A y 1 mL de la Solución B. Esta solución debe ser utilizada dentro de las primeras 24 h luego de su preparación.
- Solución D: dilución al medio de un volumen del reactivo comercial de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser usada.

#### PROCEDIMIENTO

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra conteniendo hasta 500 µg de proteínas por mL y se llevaron a un volumen final de 0,4 mL con agua destilada. Luego se añadieron a cada tubo 2 mL de la Solución C, se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 10 min. A continuación se agregaron rápidamente 0,2 mL de la Solución D y se agitaron dentro de los 2 s. Las muestras se mantuvieron durante 30 min en reposo, y luego se midieron las absorbancias a 500 nm. Paralelamente se preparó un blanco con agua destilada y una curva patrón con solución de albúmina de suero bovino de hasta 500 µg/mL.

#### 5.3.4 Determinación cuantitativa de grupos acetilos

Se lleva a cabo por el método colorimétrico de Hestrin<sup>74</sup>.

##### REACTIVOS

- Solución A: Cloruro de hidroxilamina 2 M. Debe conservarse en frío.
- Solución B: Hidróxido de sodio 3,5 M.
- Solución C: Mezcla de partes iguales de las soluciones A y B.
- Solución D: Ácido clorhídrico 3,97 M (dilución 1:3)
- Solución E: Cloruro férrico 0,37 M en ácido clorhídrico 0,1 M.

##### PROCEDIMIENTO

Cada vez que se realiza el ensayo se prepara la solución C mezclando partes iguales de las soluciones A y B. Esta solución debe dejarse 3 horas a temperatura ambiente.

Se agregaron 2 mL de la solución C a un tubo de ensayos conteniendo 1,00 mL de la solución acuosa del material a analizar. Transcurrido al menos 1 minuto se agregó 1,00 mL de la solución D para llevar el pH a 1,2, y luego se añadió 1,00 mL de la solución E y se mezcló. En forma paralela se preparó un blanco con agua destilada y una curva patrón con solución de cloruro de acetilcolina 0,004M en buffer acetato de sodio 0,001M a pH 4,5. Se midieron las absorbancias a 540 nm y se corrigió la absorbancia inespecífica de la muestra por agregado de los reactivos en el orden opuesto al descrito. El resultado se expresa como % m/m de grupos acetilo.

#### 5.3.5 Hidrólisis de azúcares furanósicos

Para realizar la hidrólisis de los azúcares furanósicos se tomaron 30 mg de la fracción **GB** y se agregaron 5 mL de TFA 0,02 M en un vial con tapa cerrada. Se llevó a estufa a 100 °C por 2 h. El producto se aisló por diálisis con una bolsa de poro de 3500 Da. Posteriormente se obtuvo el producto **GBH** seco por liofilización.

### 5.3.6 Desacetilación de los polisacáridos

La desacetilación de la fracción **GB** se realizó siguiendo la metodología de Bhattacharjee *et al.*<sup>105</sup>

Se disolvieron hasta 150 mg de **GB** en 50 mL de NaOH 0,1 M a 37°C por 4 h. Posteriormente se neutralizó con ácido acético hasta pH 7 y el producto se purificó por diálisis con una bolsa de poro de 3500 Da y se liofilizó obteniendo el producto **GBD**.

### 5.3.7 Degradación de Smith

La degradación de Smith se realizó según el procedimiento modificado descrito por Cardoso *et al.*<sup>94</sup>

Entre 50 y 100 mg de la fracción **GB** se oxidaron con 40 mL de NaIO<sub>4</sub> 0,05 M en oscuridad a 25 °C por 48 h. Luego se adicionaron 4 mL de 1,2-etanodiol para eliminar el exceso de periodato de sodio y la solución se dializó con bolsa de poro de 3500 Da por 48 h contra agua destilada. La solución se concentró en rotavapor hasta un volumen de 4 mL y se redujo con NaBH<sub>4</sub> en exceso por 15 h a temperatura ambiente. Se acidificó la solución con ácido acético concentrado y se dializó nuevamente. Finalmente la solución se hidrolizó con TFA 1 M por 20 h a temperatura ambiente y se neutralizó con NaOH 1 M. Se dializó el producto hidrolizado y se liofilizó para obtener **GBS**.

### 5.3.8 Determinación del peso molecular por GPC

La determinación del peso molecular de los polisacáridos se realizó por cromatografía de permeación en geles en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (GPC-HPLC). Se utilizó una bomba Shimadzu LC-20AT y un detector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. El análisis se realizó utilizando dos columnas conectadas en serie: una Progel-TKS G4000 y una Waters Ultrahydrogel 250 (ambas de 300 × 7.8 mm) y como solvente de elución una solución de NaNO<sub>3</sub> 0,05 M conteniendo 0,02 % de NaN<sub>3</sub> preparada con agua de calidad HPLC (Sigma-Aldrich). Se trabajó a flujo constante de 0,6 mL/min. Se inyectaron 100 µL de una solución de 5 mg/mL del polisacárido disuelto en el solvente de corrida y filtrado a través de

una membrana fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,22  $\mu\text{m}$  (GV, Millipore). La columna se calibró usando dextranos de pesos moleculares conocidos como estándares. El rango de peso molecular utilizado para la calibración estuvo entre los 6 kDa y los 500 kDa.

## **5.4 Determinación de los azúcares componentes**

Se realizó analizando por cromatografía gaseosa los monosacáridos derivatizados conseguidos de los polisacáridos hidrolizados.

### **5.4.1 Hidrólisis ácida total**

De 1 a 3 mg de muestra se colocaron en viales provistos de cierre de teflón, y se adicionaron 1 mL de TFA (ácido trifluoro acético) 2 M, y colocaron en estufa a 121 °C durante 90 min. Luego se evaporó el solvente bajo corriente de aire. Los hidrolizados fueron disueltos nuevamente en agua y se evaporó nuevamente el solvente; este tratamiento se realizó las veces necesarias para eliminar totalmente el ácido. Las muestras se colocaron en un desecador al vacío durante una noche.

### **5.4.2 Preparación de los alditoles peracetilados**

A las muestras secas provenientes de las hidrólisis contenidas en los viales se les agregaron 0,5 mL de hidróxido de amonio 1 M y se redujeron con 5 mg de  $\text{NaBH}_4$  durante al menos 2 h a temperatura ambiente. En un paso posterior se adicionaron gotas de ácido acético diluido para destruir el exceso de agente reductor (hasta cese de la efervescencia). Luego se intercambiaron los cationes  $\text{Na}^+$  (u otros) de la solución por agregado de resina AmberLite IR-120 ( $\text{H}^+$ ). Las soluciones se filtraron para separar la resina, y se evaporaron hasta sequedad. El ácido bórico generado se eliminó como borato de metilo mediante 5 agregados de 0,5 mL de metanol y evaporación a sequedad en cada oportunidad. Se dejaron en desecador al vacío durante una noche y la mezcla de alditoles obtenida se acetiló con 1 mL de anhídrido acético-piridina (1:1) a 100 °C durante 45 min. Una vez que las soluciones alcanzaron

la temperatura ambiente, se realizó una extracción de las mismas con una mezcla cloroformo-agua. La fase acuosa se extrajo nuevamente con cloroformo. Los extractos clorofórmicos recuperados se juntaron y se lavaron tres veces con 1 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con 1 mL de agua destilada. Finalmente los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y llevaron a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se inyectó en el cromatógrafo gaseoso.

#### 5.4.3 Preparación de los aldononitrilos peracetilados

A las muestras secas provenientes de las hidrólisis (**sección 5.4.1**) contenidas en viales se les adicionaron 10 mg de clorhidrato de hidroxilamina y 0,5 mL de piridina. Se calentaron en estufa a 85 °C durante 30 min. Luego se dejaron enfriar, y se les agregó 0,5 mL de anhídrido acético. Nuevamente se colocaron en estufa a la misma temperatura por 30 min más. Los derivados fueron purificados como se describe en la **sección 5.4.2**.

#### 5.4.4 Preparación de 1-amino-1-desoxialditoles

Se efectuó mediante la técnica descripta por Cases *et al.*<sup>81</sup>

##### REACTIVOS

Solución A: Solución 1:8 (v/v) de (S)-1-amino-2-propanol en metanol.

Solución B: Solución 1:4 (v/v) de ácido acético glacial en metanol.

Solución C: Solución de cianoborohidruro de sodio en metanol al 3 % (p/v).

##### PROCEDIMIENTO

A los polisacáridos hidrolizados (**sección 5.4.1**) se les agregaron en forma consecutiva, por cada mg de muestra: 20 µL de la solución A, 17 µL de la solución B y 13 µL de la solución C. A continuación los viales se llevaron a estufa a 65 °C durante 1-2 h. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se les agregó, bajo campana, TFA 3 M hasta alcanzar pH 1-2. Tras evaporación, se les agregó agua destilada (3 x 0,5 mL) y metanol (5 x 0,5 mL), con evaporaciones intermedias. Los residuos se dejaron por una noche en desecador en vacío.

Finalmente, los productos se acetilaron con 1 mL de piridina-anhídrido acético (1:1), a 100 °C durante 45 min y se enfriaron. Los aminoalditales peracetilados se extrajeron con cloroformo. Los extractos clorofórmicos se lavaron 2 veces con solución saturada de bicarbonato de sodio (1 mL) y 2 veces con agua destilada (1 mL). Los mismos se secaron mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro y se llevaron a sequedad. Los derivados se tomaron con cloroformo para ser inyectados en el cromatógrafo gaseoso.

Para determinar la configuración absoluta de la arabinosa, la aminación reductiva se efectuó utilizando (*S*)- $\alpha$ -metilbencilamina según la técnica descrita por Cases *et al.*<sup>81</sup>.

#### REACTIVOS

Solución A: Solución 1:8 (v/v) de (*S*)- $\alpha$ -metilbencilamina en metanol.

Solución B: Solución 1:4 (v/v) de ácido acético glacial en metanol.

Solución C: Solución de cianoborohidruro de sodio en metanol al 3 % (p/v).

#### PROCEDIMIENTO

El procedimiento fue idéntico al indicado para los derivados de (*S*)-1-amino-2-propanol a excepción del volumen de la solución A que se utilizaron 32  $\mu$ l.

### 5.5 Reducción de los ácidos urónicos

La reacción de reducción de los ácidos urónicos se llevó a cabo siguiendo la técnica de Taylor y Conrad<sup>77</sup> con modificaciones menores.

A una solución de 10 mL conteniendo 100  $\mu$ equiv de ácidos carboxílicos se le agregó 1 mmol de EDC (clorhidrato de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y se mantuvo la solución con agitación por 2 h a un pH de 4,75 a 5 por agregado de HCl 0,1 M. Transcurridas 2 h se realizó un agregado gota a gota de 20 mL de una solución 0,2 g/mL (50 mmol) NaBH<sub>4</sub> para realizar la reducción de los ácidos carboxílicos activados. Se dejó transcurrir la reacción por 1 h a un pH entre 8,5 y 9. Finalmente la reacción se cortó llevando a pH 6-7 con HCl y se purificó por diálisis en una bolsa de 3500 Da para obtener el producto **GBR**.

## 5.6 Estudios de alquilación

La alquilación (metilación y etilación) de los polisacáridos se realizó utilizando las condiciones y reactivos propuestos por Ciucanu y Kerek<sup>92</sup>. Previamente los ácidos carboxílicos se protonaron por tratamiento con una resina de intercambio catiónico AmberLite IR-120 (H<sup>+</sup>).

Una solución con 5 mg de polisacáridos se pasó por la resina de intercambio catiónico previamente acondicionada con HCl al 5 % y lavada con abundante agua hasta reacción negativa de cloruros en los eluidos. Los polisacáridos se recuperaron de la columna por elución con agua y posterior liofilización.

### 5.6.1 Metilación

Los polisacáridos con sus ácidos carboxílicos protonados (~5 mg) se disolvieron con agitación en aproximadamente 0,5 mL de DMSO anhidro. Posteriormente se agregaron 100 mg de hidróxido de sodio pulverizado, y se agitó la mezcla durante 30 min. A continuación la solución se colocó en baño de hielo, se le añadieron 0,5 mL de yoduro de metilo y se agitó durante 30 min más. Para finalizar la reacción se agregaron 3 mL de agua. Los productos permetilados se purificaron y recuperaron por diálisis (bolsa de poro 3500 Da) y liofilización.

### 5.6.2 Etilación

Los polisacáridos con sus ácidos carboxílicos protonados (~5 mg) fueron tratados de igual manera que al realizar la metilación, pero utilizando en este caso yoduro de etilo (IEt) como agente alquilante. Como la reacción es más lenta, se realizaron dos agregados de NaOH y dos de IEt, separados cada uno por 30 min. El proceso de purificación y obtención fue el mismo que el descrito para los productos de metilación.

Los productos alquilados fueron posteriormente hidrolizados y derivatizados para cromatografía gaseosa, tal como se describió en la **sección 5.4.2**.



## 5.7 Cromatografía gas-líquido

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador.

### 5.7.1 Análisis de alditoles y aldononitrilos acetilados

Los monosacáridos componentes de los polisacáridos y de sus productos de alquilación derivatizados como alditoles o aldononitrilos fueron analizados utilizando una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20  $\mu\text{m}$  de espesor de film. Se empleó una presión de cabeza de columna de 15 psi y una relación de split cercana a 80:1. En todos los casos la temperatura del inyector y detector fue de 240 °C.

Para los azúcares provenientes del polisacárido nativo se emplearon los siguientes programas:

- Programa **A** para alditoles peracetilados: 200  $\rightarrow$  230 °C a 2 °C/min, 230 °C durante 20 min.
- Programa **B** para aldononitrilos peracetilados: isotérmico a 220 °C durante 40 min.

Para los azúcares provenientes del polisacárido metilado o etilado se empleó el siguiente programa de temperatura:

- Programa **C**: 160  $\rightarrow$  210 °C a 2 °C/min, 210  $\rightarrow$  240 °C a 5 °C/min, 240 °C durante 20 min.

### 5.7.2 Análisis de los 1-amino-1-desoxialditoles

Los productos provenientes de derivatización por aminación reductiva fueron analizados con una columna Ultra 2 (Hewlett-Packard) con las siguientes dimensiones: 50 m, 0,36 mm de diámetro interno y 0,17  $\mu\text{m}$  de espesor de film. Se utilizó una presión de cabeza de columna de 11 psi y una relación de split cercana a 80:1

Los programas utilizados fueron dependientes de la amina quiral con que se realizó la derivatización:

- Programa **D** para los 1-desoxi-1-(2'-hidroxipropilamino) alditoles peracetilados: 180 → 220 °C a 4 °C/min, 220 °C durante 2 min, 220 → 250 °C a 1 °C/min, 250 °C durante 20 min. Temperatura del inyector y del detector 270 °C.
- Programa **E** para los 1-desoxi-1-(1'-metilbencilamino) alditoles peracetilados: 180 → 220 °C a 4 °C/min, 220 °C durante 2 min, 220 → 270 °C a 1 °C/min, 270 °C durante 20 min. Temperatura del inyector y del detector 270 °C.

## 5.8 Métodos espectroscópicos

### 5.8.1 Espectrometría de masas

Para las muestras analizadas por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa se utilizó un cromatógrafo Shimadzu GC17A conectado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMS QP5050 A con potencial de ionización de 70 eV y helio como gas carrier. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas que las descritas en la **sección 5.6**. El análisis de los espectros de masas se realizó con el software GCMSolutions 1.21.

Los ácidos aldobiurónicos se analizaron por espectrometría de masas por inyección directa con un equipo Bruker micr-OTOF-Q II equipado con una fuente de ionización de electrospray empleada en modo negativo. El voltaje del capilar de entrada fue de 3 kV, el "end plate offset" de -500 V, se utilizó N<sub>2</sub> como gas de secado con un flujo de 4 mL/min a 200 °C y la presión del nebulizador fue de 0,4 bar.

### 5.8.2 Análisis por RMN

Los espectros se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance II y en un espectrómetro Bruker Avance Neo, ambos a 500,13 (<sup>1</sup>H) y 125,77 (<sup>13</sup>C) MHz utilizando tubos de 5 mm a temperatura ambiente. Se utilizó acetona como estándar interno (referido al DSS (4,4-dimetil-4-silapentanosulfonato de sodio) y el grupo metilo de la acetona se calibró en 31,1 ppm en <sup>13</sup>C y en 2,22 ppm en <sup>1</sup>H).

### 5.8.2.1 Experimentos de RMN monodimensionales

Para los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , 10-15 mg de muestra se disolvieron en 0,7 mL de  $\text{D}_2\text{O}$  99,9 %. La muestra se filtró y se dispuso en tubos de 5 mm de diámetro. Se añadió acetona como estándar interno.

Se utilizó un valor de TD (tamaño de la fid) de 65536, un NS (número de scans) de 16 y un “relaxation delay” de 1 s.

En el caso de los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 30 mg de muestra se disolvieron en  $\text{D}_2\text{O}$  hasta lograr 0,7 mL. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: TD de 65536, NS de 2800 y un “relaxation delay” de 0,1 s.

### 5.8.2.2 Experimentos bidimensionales

El armado de las muestras para realizar los espectros bidimensionales fue el mismo que para los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con la salvedad de que se utilizaron generalmente entre 15 y 20 mg de muestra.

Los espectros HSQC se realizaron con la secuencia “hsqcetgpsi2” con los siguientes parámetros: TD de 1532 x 512, NS de 16, y un tiempo de relajación de 1,52 s.

Los espectros TOCSY se realizaron con las secuencias “mlevphpr2” o “mlevgpplrpf” empleando un TD de 2048 x 512, NS de 12, un tiempo de relajación de 2,4 s y un “mixing time” de 150 ms.

Los espectros NOESY se realizaron con la secuencia “noesygpplr” empleando un TD de 2048 x 512, NS de 16, un tiempo de relajación de 2,4 s y un “mixing time” de 300 ms.

Los espectros COSY se realizaron utilizando la secuencia “cosygpqr”, un TD de 2048 x 256, NS de 4 y un tiempo de relajación de 1,48 s.

Por último, para los experimentos HMBC se utilizó la secuencia “hmbcgpplrpdqr” y se probaron distintos valores de la constante J (CH) de largo alcance entre 6 y 10 Hz, no pudiéndose conseguir buenos resultados en ninguno de los casos.



- El Mr ácido urónico promedio se calculó realizando un promedio pesado de las masas molares de ácido glucurónico y el ácido 4-*O*-metil-glucurónico en **GB**.

Para cuantificar los subproductos de *N*-acilurea se utilizó la señal a 2,86 ppm correspondiente a los 6 hidrógenos metilínicos Ha'. En el caso de los subproductos de  $\beta$ -alanina se realizó la integración de las señales entre 2,4 y 2,7 ppm teniendo en cuenta que las mismas estaban asociadas a 2 hidrógenos.

## 5.9 Métodos depolimerizantes

### 5.9.1 Hidrólisis para la obtención de ácidos aldobiurónicos

Aproximadamente 30 mg de **GB** se colocaron en un vial con 5 mL de TFA 2 M en estufa por 60 min a 120 °C. Luego de evaporar el TFA remanente, la solución se reconstituyó con agua miliQ y se pasó por una resina de intercambio aniónico fuerte AmberLite IRA-410 previamente lavada con NaOH 4 % y agua miliQ hasta neutralidad y acondicionada con ácido acético al 10 %. La muestra se pasó lentamente y se recogieron en primer lugar los azúcares neutros que fueron descartados. Seguidamente se eluyeron los ácidos aldobiurónicos de la resina con HCl 1 M. Finalmente se evaporó el HCl llevando a sequedad la solución la cantidad de veces que fuese necesario con el agregado de agua miliQ.

Los ácidos así obtenidos se analizaron por espectrometría de masas como fue descripto en la **sección 5.7.1**.

Para obtener los ácidos aldobiurónicos reducidos en su extremo reductor (fracción **GBAR**) se realizó un tratamiento con NaBH<sub>4</sub> del hidrolizado, previo a la separación por la resina de intercambio aniónico.

### 5.9.2 Tratamiento enzimático

Se efectuó mediante los procedimientos descriptos por Bailey *et al.*<sup>120</sup> y Thomas *et al.*<sup>121</sup>. Se utilizaron dos enzimas distintas: una enzima endo (1→4)- $\beta$ -xilanasas aislada de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma Aldrich) y una hemicelulasa aislada de *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich).

Los tratamientos enzimáticos se realizaron con una relación de sustrato a enzima de 30 a 1, a pH 5,5, 45 °C por 24 h. La solución se centrifugó y se separó el precipitado del sobrenadante.

Sobre el sobrenadante se chequeó la liberación de monosacáridos por cromatografía en capa delgada de sílica gel con fase móvil de isopropanol-H<sub>2</sub>O-NH<sub>3(c)</sub> 4,5:0,5:1 utilizando un patrón de xilosa, con un revelador de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol al 10 %.

El precipitado fue sometido a hidrólisis y posterior derivatización para la obtención de alditoles peracetilados para ser analizados por cromatografía gaseosa según los procedimientos descritos en **5.4.1** y **5.6.1**.

## **5.10 Obtención de productos modificados por reducción, hidrólisis y desacetilación a partir de la goma brea**

Para la obtención de los polisacáridos con más de una modificación química **GBRH**, **GBRD**, **GBHD** y **GBRHD** se utilizaron los procedimientos descritos en las **secciones 5.3.5**, **5.3.6** y **5.5**. El orden de las modificaciones es el especificado en la **Figura 2.16** del **Capítulo 2**, en primer lugar la reducción de los ácidos urónicos, posteriormente la hidrólisis de los azúcares furanósicos y finalmente la desacetilación de los polisacáridos.

## **5.11 Amidación de los ácidos carboxílicos**

### **5.11.1 Protocolo de amidación**

Las reacciones de amidación de los polisacáridos de **GB** se realizaron siguiendo tres protocolos similares pero con algunas modificaciones. El protocolo 2 fue seleccionado como el óptimo.

#### **PROTOCOLO 2**

Se pesaron entre 20 y 100 mg de **GB** en un vaso de precipitados de 25 mL y se adicionaron 7 mL de agua destilada. Se agitó la solución con barra magnética hasta disolución

completa de la goma, posteriormente se adicionó la amina y se llevó la solución a pH 5 con la adición de HCl 4 M.

En paralelo se pesaron el clorhidrato de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y la N-hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente se disolvieron en 500  $\mu$ L de agua destilada y se transfirieron cuantitativamente a la solución que contenía la **GB** y se reajustó el pH a 5 con HCl 1 M. Se dejó en agitación por 16 h, debiendo controlar el pH con agregado de soluciones de HCl o NaOH en las primeras horas de la reacción.

#### PROTOCOLO 1

La reacción se realizó de forma similar al Protocolo 2 pero posteriormente a la disolución de **GB** se agregó la EDC y se dejó en agitación por 2 h. Luego se agregaron la NHS y la amina utilizada y se dejó con agitación por 2 h más, siempre controlando el pH con agregado de soluciones de HCl o NaOH en las primeras horas de la reacción.

#### PROTOCOLO 3

La reacción se realizó de forma similar al Protocolo 2 pero seguidamente a la disolución de **GB** se agregaron conjuntamente la EDC y la NHS. Se llevó la solución a pH 5 y se dejó por 15 min. Posteriormente se agregó la amina y se ajustó la mezcla de reacción al pH deseado con el agregado de soluciones de HCl o NaOH 0,1 M, 1 M o 4 M. Se dejó por 16 h, debiendo controlar el pH con agregado de soluciones de HCl o NaOH en las primeras horas de la reacción.

### 5.11.2 Diseño estadístico de experimentos

Los experimentos de selección de factores y de metodología de superficie de respuesta se realizaron y se analizaron con el software Design Expert 7.0.0 facilitado por el Dr. Héctor Goicoechea.

Para la selección de factores se llevó a cabo un diseño factorial de tipo  $2^{4-1}$  con 3 puntos centrales, con un nivel de resolución IV.

Para la optimización de los reactivos por el método de la superficie de respuesta se utilizó un diseño Box Behnken para 3 factores con 3 niveles y 3 repeticiones del punto central.

### 5.11.3 Estudio computacional de la energía libre de reacción

El estudio de las distintas reacciones se realizó utilizando el software Gaussian 09. Los cálculos se realizaron en todos los casos con un método DFT B3LYP utilizando una base 6-31G (d,p) y usando un modelo de solvente continuo del tipo campo de reacción auto consistente, en particular SMD – agua.

## 5.12 Estudios reológicos

La caracterización reológica de la goma brea y de la goma arábica se realizó con un reómetro MCR 300 Paar Physica (Anton Paar) con una geometría de platos paralelos rugosos (PP25/P2) de 25 mm de diámetro. La temperatura se controló con una placa peltier Viscotherm VT2 Physica. Se utilizó un gap de 1,10 mm.

Para las mediciones se prepararon 5 mL de cada muestra a analizar en tubos de vidrio graduados empleando concentraciones de 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, 17,5 % y 35 % m/v. Las muestras se prepararon pesando la cantidad de sólido necesaria y agregando aproximadamente 4 mL de agua destilada. Las soluciones se dispersaron totalmente con la ayuda de vórtex, se calentaron en un baño de agua a 70 °C y se dejaron en reposo por 24 h. Posteriormente se llevaron a volumen y se homogeneizaron con vórtex.

El pH se midió con un medidor de pH Mettler S220 Kit con un electrodo de vidrio de punta fina LE422 Mettler Toledo.

El análisis de los resultados obtenidos se realizó con el software GraphPad Prism 8.

### 5.12.1 Curvas de flujo

Las curvas de flujo se midieron durante 50 min a temperatura constante de 20 °C en el rango de velocidad de deformación de 0,001 a 300 s<sup>-1</sup> y se tomaron 100 puntos. Los resultados obtenidos se ajustaron utilizando el modelo de Carreau:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{[1 + (\tau \cdot \dot{\gamma})^2]^M}$$



Donde  $\eta_0$  representa la viscosidad de la solución en la zona de velocidades muy pequeñas y se denomina viscosidad Newtoniana,  $\eta_\infty$  es la viscosidad límite alcanzada por el sistema a velocidades de cizalla muy altas,  $\tau$  es el tiempo característico y  $M$  es una constante adimensional.

## **5.12.2 Ensayos dinámicos oscilatorios**

### **5.12.2.1 Espectros mecánicos**

El rango viscoelástico lineal se determinó midiendo los módulos de almacenamiento  $G'$  y de pérdida  $G''$  en función del esfuerzo de corte a una frecuencia de 1 Hz y 20 °C. Posteriormente, los espectros mecánicos se registraron a una deformación constante de 0,02 % a frecuencia entre 0,01 y 10 Hz a 20 °C.

### **5.12.2.2 Barridos de temperatura**

Los módulos de almacenamiento  $G'$  y de pérdida  $G''$  se registraron en función de la temperatura con el siguiente procedimiento: a) 85,0 °C por 6 s (sin medición); b) rampa de enfriamiento desde 85,0 °C hasta 10,0 °C con rampa de 5,0 °C/min (1 Hz y 0,02 % de esfuerzo de corte); c) a 10,0 °C por 900 s (1 Hz y 0,02 % de esfuerzo de corte); d) barrido de frecuencia desde 0,02 a 15 Hz en el rango de viscoelasticidad lineal (0,02 % de esfuerzo de corte); y e) rampa de calentamiento desde 10,0 °C hasta 85,0 °C a 5 °C/min (1 Hz y 0,02 % de esfuerzo de corte).



# RESUMEN FINAL



Este trabajo de Tesis tuvo como objetivo principal el estudio estructural de los polisacáridos que conforman la goma brea. Asimismo, se realizaron modificaciones químicas controladas sobre dichos polisacáridos y luego se caracterizaron reológicamente tanto la goma brea como sus productos modificados. Además se compararon sus propiedades reológicas con las de la goma arábica. Este trabajo de Tesis incluye un capítulo introductorio, tres capítulos de resultados y uno que contiene los materiales y métodos utilizados para la realización de este trabajo. A continuación, se resume la información detallada en cada uno de los capítulos y los principales resultados obtenidos.

En el **Capítulo 1** se presenta una introducción general sobre las gomas más utilizadas en el mundo que se obtienen como exudados de plantas. Se presentan sus características estructurales en conjunto con sus principales usos industriales. Además, se presentan el árbol *Cercidium praecox* de donde se extrae la goma brea y los antecedentes bibliográficos existentes al momento de esta Tesis sobre esta goma.

El **Capítulo 2** contiene los resultados del estudio estructural de los polisacáridos de la goma brea tanto por métodos químicos como métodos espectroscópicos. Los resultados obtenidos mostraron que los polisacáridos de la goma brea son arabinoglucuronoxilanos de un peso molecular promedio de 122 kDa, compuestos por una cadena central de unidades de 4)- $\beta$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ . Estas xilosas de cadena se encuentran altamente sustituidas principalmente en C-2 con unidades de  $\beta$ -D-xilopiranososa,  $\alpha$ -L-arabinopiranososa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -L-arabinofuranosa, ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico y grupos acetilo. Las unidades de arabinosa furanósica se encuentran formando pequeñas cadenas laterales como sustituyentes de la cadena principal mientras que el ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico y ácido  $\alpha$ -D-glucurónico se encuentran como unidades terminales no reductoras o bien como cadenas cortas con las unidades de arabinosa piranósica como sustituyentes en la posición C-2. Asimismo, se pudo determinar que los grupos acetilo se encuentran principalmente enlazados al C-3 de las unidades de xilosa de cadena cuya posición C-2 tiene unidos a los ácidos urónicos.

En el **Capítulo 3** se presentan los resultados obtenidos de la reacción de amidación de los ácidos carboxílicos de los ácidos urónicos que forman parte de los polisacáridos de la goma brea. Se utilizó el sistema que emplea una carbodiimida soluble en agua (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Se obtuvieron excelentes grados de amidación con distintas aminas primarias como propilamina, 1,4-diaminobutano y 3-dimetilaminopropilamina.

Mediante el diseño estadístico de experimentos se pudo determinar que los factores significativos que modulan el grado de amidación de estos polisacáridos, en el rango experimental estudiado, son la proporción de los reactivos (EDC, NHS y amina), la concentración de la goma brea y el pH.

Por otro lado, se observó que al aumentar la proporción de equivalentes de *N*-hidroxisuccinimida se podía disminuir y hasta eliminar por completo el subproducto del tipo *N*-acilurea que se obtiene debido al reordenamiento  $N \rightarrow O$  que ocurre en el intermediario de *O*-acilisourea. Al utilizar mayores equivalentes de NHS se encontraron señales adicionales en los espectros de RMN de  $^1H$  de los productos obtenidos, de las cuales no se había encontrado información en la bibliografía consultada referida a la amidación de polisacáridos. Se encontró que estas señales se originaban en productos secundarios derivados del aminoácido  $\beta$ -alanina que se generaba luego de una serie de reacciones a partir de la formación de un aducto entre la EDC y la NHS. Por medio de grupos hidroxilo o carboxilato libres del polisacárido, estos subproductos podían quedar enlazados a los mismos.

Mediante la *metodología de la superficie de respuesta* (MSR) con un diseño Box Behnken se buscaron optimizar las condiciones experimentales de los reactivos empleados. Se pudo encontrar un modelo de ajuste adecuado para el grado de amidación que permite predecir el comportamiento de esta respuesta en función de los reactivos utilizados en la reacción.

En el **Capítulo 4** se exponen los resultados obtenidos de la caracterización reológica de la fracción **GB** y de algunos de los productos obtenidos a partir de la misma, y fueron comparados con las propiedades reológicas de la goma arábica. El sistema de arabinoglucuronoxilanos altamente ramificados que constituyen **GB** presentó un comportamiento de flujo pseudoplástico (no newtoniano) en soluciones acuosas de concentraciones entre 1 % y 35 % m/v. Al comparar los resultados con la goma arábica, se pudo determinar que en soluciones de igual concentración, **GB** presentaba generalmente valores de viscosidad aparente un orden de magnitud mayores que los de esa goma, especialmente a velocidades de deformación bajas o medias, a excepción de las concentraciones de 1 % y 2,5 % m/v cuyo comportamiento era similar. A altos valores de  $\dot{\gamma}$ , los valores de viscosidad aparente y especialmente de  $\eta_{\infty}$  resultaron parecidos. Se pudo establecer que en comparación con otras gomas comerciales, **GB** presenta valores de

viscosidad menores aún a concentraciones mayores, a excepción de la goma ghatti. Cabe destacar que **GB**, al igual que la goma arábica, presenta una alta solubilidad en agua.

Al estudiar el comportamiento mecánico de **GB**, se observó que estos polisacáridos formaron una red tipo "gel débil" cuando se disolvieron en agua hasta una concentración de 17,5 % m/v. En cambio, a una concentración de 35% m/v, el comportamiento observado por **GB** constituía una "solución concentrada", posiblemente por no haber suficiente cantidad de moléculas de agua para una hidratación completa de los polisacáridos. En contraposición, las soluciones de goma arábica presentaron un comportamiento tipo solución "semi diluida".

Al estudiar el efecto de la temperatura sobre las soluciones de estas gomas, se determinó que **GB** presentaba un gran aumento del módulo de almacenamiento  $G'$  a mayores temperaturas, lo cual indicaba la importancia de las interacciones hidrofóbicas en este sistema. Además, se pudo ver que el sistema tipo "gel débil" formado por **GB** era termorreversible, mientras que el comportamiento de la goma arábica no variaba con los cambios de temperatura.

Además, se determinó que los productos derivados de **GB** por desacetilación, reducción o amidación con propilamina de los ácidos urónicos presentaban una menor viscosidad aparente que la fracción original, tomando valores similares y en varios casos menores que los de la goma arábica a igual concentración.

Si bien las propiedades reológicas de la goma brea no son idénticas a las de la goma arábica, cuando se compara con otras gomas comerciales, ambas muestran un comportamiento cercano, lo que abre la posibilidad de que la goma brea pueda funcionar como sustituto de la goma arábica.

En el **Capítulo 5** se especifican los materiales utilizados en conjunto con los métodos aplicados y desarrollados en el desarrollo de la Tesis.

Hasta el momento, las distintas partes de este trabajo de Tesis dieron lugar a la siguiente publicación:

Frank Sznaider, Ana M. Rojas, Carlos A Stortz, Diego A. Navarro. "Chemical structure and rheological studies of arabinoglucuronoxylans from the *Cercidium praecox* exudate brea gum". *Carbohydr. Polym.* **2020**, 228, 115388. Doi:10.1016/j.carbpol.2019.115388.



# BIBLIOGRAFÍA



- 1) Nussinovitch, A. *Plant Gum Exudates of the World: Sources, Distribution, Properties, and Applications*. CRC Press, **2009**.
- 2) Coppen, J.J.W. *Gums, Resins and Latexes of Plant Origin*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **1995**.
- 3) Reyes, H., Támara, A.M. *Entre Cienc. e Ing.* **2018**, *18*, 9-15.
- 4) Yamashita, S., Mizuno, M., Hayashi, H., Yamaguchi, H., Miyagi-Inoue, Y., Fushihara, K., Koyama, T., Nakayama, T., Takahashi, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, *82*, 1011-1020. Doi:10.1080/09168451.2017.1401913
- 5) Barak, S., Mudgil, D., Taneja, S. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 2828-2835. Doi:10.1002/jsfa.10302
- 6) Verbeken, D., Dierckx, S., Dewettinck, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *63*, 10-21. Doi:10.1007/s00253-003-1354-z
- 7) Fahn, A. *New Phytol.* **1988**, *108*, 229-257. Doi:10.1111/j.1469-8137.1988.tb03729.x
- 8) Glicksman, M. *Gum Technology in the Food Industry*. Academic Press, **1969**.
- 9) Williams, P.A. *Structural Characteristics and functional properties of gum arabic*. En: *Gum Arabic*. RSC Publishing, **2011**, 179-187.
- 10) Randall, R.C., Phillips, G.O., Williams, P.A. *Top. Catal.* **1989**, *3*, 65-75. Doi:10.1016/S0268-005X(89)80034-7
- 11) Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C., Lefebvre, J. *Food Hydrocoll.* **2002**, *16*, 257-267. Doi:10.1016/S0268-005X(01)00096-0
- 12) Wang, Q., Burchard, W., Cui, S.W., Huang, X., Phillips, G.O. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1163-1169. Doi:10.1021/bm7011696
- 13) Street, C.A., Anderson, D.M.W. *Talanta* **1983**, *30*, 887-893. Doi:10.1016/0039-9140(83)80206-9
- 14) Nie, S.P., Wang, C., Cui, S.W., Wang, Q., Xie, M.Y., Phillips, G.O. *Food Hydrocoll.* **2013**, *31*, 42-48. Doi:10.1016/j.foodhyd.2012.09.014
- 15) Goycoolea, F.M., Morris, E.R., Richardson, R.K., Bell, A.E. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *27*, 37-45. Doi:10.1016/0144-8617(95)00031-2

- 16) Mothé, C.G., Rao, M.A. *Food Hydrocoll.* **1999**, *13*, 501-506. Doi:10.1016/S0268-005X(99)00035-1
- 17) Li, X., Zhang, H., Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., & Nishinari, K. *Rheological properties of gum arabic solution: The effect of arabinogalactan protein complex (AGP)*. En: *Gum Arabic*. The Royal Society of Chemistry, **2012**, 229-238.
- 18) Montenegro, M.A., Boiero, M.L., Valle, L., Borsarelli, C.D. *Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier*. En: *Products and Applications of Biopolymers*. InTech, **2012**.
- 19) Williams, P.A. *Gums: Properties and Uses*. En: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Ltd., **2016**, 283-289.
- 20) Lujan-medina, G.A., Ventura, J., Lara-Ceniceros, A.C., Ascacio-Valdés, J. a., Boone-Villa, V.D., Aguilar, C.N. *Macromol. an Indian J.* **2013**, *9*, 2013.
- 21) Nejatian, M., Abbasi, S., Azarikia, F. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *160*, 846-860. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.214
- 22) Whistler, R.L., BeMiller, J.N. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives*. Academic Press, **2012**.
- 23) Azarikia, F., Abbasi, S. *Food Hydrocoll.* **2016**, *59*, 35-44. Doi:10.1016/j.foodhyd.2015.10.018
- 24) Balaghi, S., Mohammadifar, M.A., Zargaraan, A., Gavlighi, H.A., Mohammadi, M. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25*, 1775-1784. Doi:10.1016/j.foodhyd.2011.04.003
- 25) Azarikia F., Abbasi S., Hamidi Z., A.M.H. *Iran. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *13*, 1-14.
- 26) Williams, P.A., Phillips, G.O. *Handbook of Hydrocolloids*. CRC Press, **2009**.
- 27) Tischer, C.A., Iacomini, M., Gorin, P.A.J. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1647-1655. Doi:10.1016/S0008-6215(02)00023-X
- 28) Ahmadi Gavlighi, H. *Tesis Doctoral: "Tragacanth Gum: Structural Composition, Natural Functionality and Enzymatic Conversion as Source of Potential Prebiotic Activity."* Technical University of denmark, **2013**.
- 29) Deshmukh, A.S., Setty, C.M., Badiger, A.M., Muralikrishna, K.S. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 980-986. Doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.099

- 30) Kang, J., Cui, S.W., Chen, J., Phillips, G.O., Wu, Y., Wang, Q. *Food Hydrocoll.* **2011**, 25, 1984-1990. Doi:10.1016/j.foodhyd.2010.12.011
- 31) Kang, J., Cui, S.W., Phillips, G.O., Chen, J., Guo, Q., Wang, Q. *Food Hydrocoll.* **2011**, 25, 1999-2007. Doi:10.1016/j.foodhyd.2010.11.020
- 32) Kang, J., Cui, S.W., Phillips, G.O., Chen, J., Guo, Q., Wang, Q. *Food Hydrocoll.* **2011**, 25, 1991-1998. Doi:10.1016/j.foodhyd.2010.11.021
- 33) Subsecretaría de planificación y política ambiental. Dirección de Bosques. *Goma Brea Características y Aprovechamiento Sustentable.*, **2015**.
- 34) Bertuzzi, M.A., Slavutsky, A.M., Armada, M. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, 47, 768-775. Doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02907.x
- 35) A.R. Von Müller, R.O. Coirini, U.O.K. *Multequina* **2007**, 83-98.
- 36) Arturo Burkart, A.C. *Darwiniana* **1976**, 20, 305-311.
- 37) Bertuzzi, M.A., Slavutsky, A.M. *Brea Tree ( Cercidium praecox ) Exudate Gum*. En: *Emerging Natural Hydrocolloids: Rheology and Functions*. Razavi SMA, ed. John Wiley & Sons Ltd., **2019**, 347-370.
- 38) Losano, M., Dottori, N., Cosa, M. *An. del Inst. Biol. Univ. Autónoma México* **2000**, 71, 1-9.
- 39) FAO. Conjunto de Herramientas para la Gestión Forestal Sostenible (GFS). <http://www.fao.org/sustainable-forest-management/toolbox/modules/agroforestry/basic-knowledge/es/>.
- 40) FAO. *Agroforesteria Para La Restauración Del Paisaje*, **2017**.
- 41) Alesso, S.P., Publio Araujo, R.T. *Posibilidades de la producción de goma de brea (cercidium praecox) en el Noroeste de Argentina*. En: XII World Forestry Congress, **2016**, 1-5.
- 42) von Müller, A.R., López, C.B., Eynard, A.R., Guzmán, C.A. *Drug Chem. Toxicol.* **2009**, 32, 307-311. Doi:10.1080/01480540902976903
- 43) *Incorporación Goma Brea Al Código Alimentario Argentino*. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, **2012**.

- 44) Castel, V., Rubiolo, A.C., Carrara, C.R. *Food Hydrocoll.* **2017**, *63*, 170-177. Doi:10.1016/j.foodhyd.2016.08.039
- 45) Cecchini, J.P., Spotti, M.J., Piagentini, A.M., Milt, V.G., Carrara, C.R. *Food Sci. Technol. Int.* **2017**, *23*, 371-381. Doi:10.1177/1082013217695170
- 46) Alesso, S.P., Araujo, P., Tapias, R. *Quebracho - Rev. Ciencias For.* **2003**, 60-70.
- 47) Cerezo, A.S., Stacey, M., Webber, J.M. *Carbohydr. Res.* **1969**, *9*, 505-517. Doi:10.1016/S0008-6215(00)80035-X
- 48) De Pinto, G.L., Martínez, M., Rivas, C. *Carbohydr. Res.* **1994**, *260*, 17-25. Doi:[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)80018-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)80018-9)
- 49) Castel, V., Zivanovic, S., Jurat-Fuentes, J.L., Santiago, L.G., Rubiolo, A.C., Carrara, C.R., Harte, F.M. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4345-4350. Doi:10.1002/jsfa.7642
- 50) Aspinall, G.O. *The Polysaccharides Volume 2*. Academic Press, **1983**.
- 51) Kamerling, J.P. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology.*, **2007**.
- 52) Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T. *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use*. Springer, Advances in Polymer Science, **2005**.
- 53) Ebringerová, A., Heinze, T. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 542-556. Doi:10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7
- 54) Hsieh, Y.S.Y., Harris, P.J. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, 1-9. Doi:10.3390/POLYM11020354
- 55) Shatalov, A.A., Evtuguin, D. V, Neto, C.P. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 93-99.
- 56) Dahlman, O., Teleman, A., Stålbrand, H., Lundqvist, J., Tjerneld, F. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 807-815. Doi:10.1016/S0008-6215(00)00249-4
- 57) Uhliaríková, I., Vršanská, M., McCleary, B. V., Biely, P. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 3365-3372. Doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.011
- 58) Hoffmann, R.A., Leeﬂang, B.R., de Barse, M.M.J., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G. *Carbohydr. Res.* **1991**, *221*, 63-81. Doi:10.1016/0008-6215(91)80049-S
- 59) Hoffmann, R.A., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G. *Carbohydr. Res.* **1992**, *226*, 303-311. Doi:10.1016/0008-6215(92)84078-7

- 60) Dervilly, G., Leclercq, C., Zimmermann, D., Roue, C., Thibault, J.F., Saulnier, L. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *47*, 143-149. Doi:10.1016/S0144-8617(01)00172-2
- 61) Delcour, C.J.A.V. and J.A. *J. Cereal Sci.* **1996**, *24*, 1-14.
- 62) Das, D., Maiti, S., Maiti, T.K., Islam, S.S. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1243-1248. Doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.052
- 63) Capek, P., Šutovská, M., Barboríková, J., Kazimierová, I., Fraňová, S., Kopačová, M. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *165*, 842-848. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.246
- 64) Peña, M.J., Kulkarni, A.R., Backe, J., Boyd, M., O'Neill, M.A., York, W.S. *Planta* **2016**, *244*, 589-606. Doi:10.1007/s00425-016-2527-1
- 65) Höjje, A., Sandström, C., Roubroeks, J.P., Andersson, R., Gohil, S., Gatenholm, P. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2959-2966. Doi:10.1016/j.carres.2006.10.008
- 66) Dutton, G.G.S., Kabir, S. *Carbohydr. Res.* **1973**, *28*, 187-200. Doi:10.1016/S0008-6215(00)82775-5
- 67) Lelliott, C., Atkins, E.D.T., Juritz, J.W.F., Stephen, A.M. *Polymer (Guildf)*. **1978**, *19*, 363-367. Doi:10.1016/0032-3861(78)90238-0
- 68) Maurer-Menestrina, J., Sasaki, G.L., Simas, F.F., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1843-1850. Doi:10.1016/S0008-6215(03)00276-3
- 69) Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C. *Anal. Biochem.* **1991**, *197*, 157-162. Doi:10.1016/0003-2697(91)90372-Z
- 70) Dubois, M., Gillies, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350. Doi:10.1021/ac60111a017
- 71) Salato, G.S., Ponce, N.M.A., Raffo, M.D., Vicente, A.R., Stortz, C.A. *Postharvest Biol. Technol.* **2013**, *84*, 66-73. Doi:10.1016/j.postharvbio.2013.04.009
- 72) Shui, G., Leong, L.P. *Food Chem.* **2006**, *97*, 277-284. Doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.048
- 73) Anderson, D.M.W., Weiping, W., Lewis, G.P. *Biochem. Syst. Ecol.* **1990**, *18*, 39-42. Doi:10.1016/0305-1978(90)90030-J
- 74) Hestrin, S. *J. Biol. Chem.* Published online 1949, 249-262. Doi:10.1016/S0021-

- 9258(18)56740-5
- 75) Masuelli, M., Slatvustky, A., Ochoa, A., Bertuzzi, M. *Colloids and Interfaces* **2018**, 2, 72. Doi:10.3390/colloids2040072
- 76) Bemiller, J.N. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1967**, 22, 25-108. Doi:10.1016/S0096-5332(08)60151-4
- 77) Conrad, R.L.T. and H.E. *Biochemistry* **1972**, 11, 1383-1388. Doi:10.1021/bi00758a009
- 78) Green, J.W. *The Glycofuranosides*. En: *Advances in Carbohydrate Chemistry*. Elsevier Ltd., **1967**, 95-142.
- 79) Lindberg, B., Lönngrén, J., Svensson, S. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1975**, 31, 185-240. Doi:10.1016/S0065-2318(08)60297-8
- 80) Slavutsky, A.M., Bertuzzi, M.A. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 123, 784-791. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.038
- 81) Cases, M.R., Cerezo, A.S., Stortz, C.A. *Carbohydr. Res.* **1995**, 269, 333-341. Doi:10.1016/0008-6215(94)00370-U
- 82) Prehm, P. *Carbohydr. Res.* **1980**, 78, 372-374. Doi:10.1016/0008-6215(80)90018-X
- 83) J.K.N. JonesAnd, D.G.L. *Can. J. Chem.* **1967**, 45, 1995-1998.
- 84) Cases, M.R., Stortz, C.A., Cerezo, A.S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, 16, 93-97. Doi:10.1016/0141-8130(94)90021-3
- 85) Stortz, C.A. *Tesis Doctoral. "Estudio de Los Carragenanos "Solubles" Del Alga Roja Iridaea Undulosa Bory ( Familia : Cigartinaceae)". FCEN-UBA, 1984.*
- 86) Cases, M.R. *Tesis Doctoral: "Estudio Del Sistema de Polisacáridos Del Alga Roja Calcárea Corallina Officinalis."* FCEN-UBA, **1995**.
- 87) Eikin, Yu.N., Rozynov, B.V. y Dzizenko, A.. *Khim.Prir.Soedin.* Published online 1972, 642.
- 88) Sznajder, F., Rojas, A.M., Stortz, C.A., Navarro, D.A. *Carbohydr. Polym.* **2020**, 228, 115388. Doi:10.1016/j.carbpol.2019.115388
- 89) Shea, E.M., Carpita, N.C. *J. Chromatogr. A* **1988**, 445, 424-428. Doi:10.1016/S0021-9673(01)84556-8



- 90) Navarro, D.A., Stortz, C.A. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *49*, 57-62. Doi:10.1016/S0144-8617(01)00298-3
- 91) Aspinall, G.O. *The Polysaccharides*. Academic Press, **1983**.
- 92) Ciucanu, I., Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209-217. Doi:10.1016/0008-6215(84)85242-8
- 93) Abdel-Akher, M., Hamilton, T.K., Montgomery, R., Smith, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4970-4971. Doi:10.1021/ja01139a526
- 94) Cardoso, M.A., Nosedá, M.D., Fujii, M.T., Zibetti, R.G.M., Duarte, M.E.R. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2766-2775. Doi:10.1016/j.carres.2007.08.024
- 95) Marques, G., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Evtuguin, D. V. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81*, 517-523. Doi:10.1016/j.carbpol.2010.02.043
- 96) Van Hazendonk, J.M., Reinerik, E.J.M., De Waard, P., Van Dam, J.E.G. *Carbohydr. Res.* **1996**, *291*, 141-154. Doi:10.1016/S0008-6215(96)00160-7
- 97) Ishii, T., Konishi, T., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Togashi, H., Shimizu, K. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 579-589. Doi:10.1016/j.carbpol.2008.04.018
- 98) Capek, P., Matulová, M. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 396-401. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.04.076
- 99) Yamasaki, T., Enomoto, A., Kato, A., Ishii, T., Kameyama, M., Anzai, H., Shimizu, K. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 1425-1432. Doi:10.1016/j.carbpol.2011.09.033
- 100) Sun, Y., Cui, S.W., Gu, X., Zhang, J. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85*, 615-621. Doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.021
- 101) Guo, Q., Cui, S.W., Wang, Q., Hu, X., Wu, Y., Kang, J., Yada, R. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86*, 742-746. Doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.018
- 102) Habibi, Y., Mahrouz, M., Vignon, M.R. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1593-1598. Doi:10.1016/S0008-6215(02)00186-6
- 103) Kardošová, A., Malovíková, A., Pätoprstý, V., Nosál'ová, G., Matáková, T. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *47*, 27-33. Doi:10.1016/S0144-8617(00)00341-6
- 104) Simas-Tosin, F.F., De Souza, L.M., Wagner, R., Pereira, G.C.Z., Barraza, R.R., Wendel,

- C.F., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Gorin, P.A.J. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 704-711.  
Doi:10.1016/j.carbpol.2012.12.059
- 105) Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., Smith, I.C. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1926-1932. Doi:10.1016/S0021-9258(19)41784-5
- 106) Evtuguin, D. V, Toma, J.L., Silva, A.M.S., Neto, C.P. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 597-604.  
Doi:10.1016/S0008-6215(02)00529-3
- 107) Gonçalves, V.M.F., Evtuguin, D. V., Domingues, M.R.M. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 256-266. Doi:10.1016/j.carres.2007.11.002
- 108) Shakhmatov, E.G., Belyy, V.A., Makarova, E.N. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 320-330.  
Doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.027
- 109) Wefers, D., Tyl, C.E., Bunzel, M. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 1-9.  
Doi:10.3389/fchem.2014.00100
- 110) Hromádková, Z., Košťálová, Z., Vrchotová, N., Ebringerová, A. *Carbohydr. Res.* **2014**, *389*, 147-153. Doi:10.1016/j.carres.2014.01.016
- 111) Kulkarni, A.R., Pattathil, S., Hahn, M.G., York, W.S., O'Neill, M.A. *Ind. Biotechnol.* **2012**, *8*, 222-229. Doi:10.1089/ind.2012.0014
- 112) Glushka, J.N., Terrell, M., York, W.S., O'Neill, M.A., Gucwa, A., Darvill, A.G., Albersheim, P., Prestegard, J.H. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 341-352. Doi:10.1016/S0008-6215(02)00461-5
- 113) Bazus, A., Rigal, L., Gaset, A., Fontaine, T., Wieruszkeski, J.M., Fournet, B. *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 323-332. Doi:10.1016/0008-6215(93)87036-R
- 114) Cong, Q., Shang, M., Dong, Q., Liao, W., Xiao, F., Ding, K. *Carbohydr. Res.* **2014**, *393*, 43-50. Doi:10.1016/j.carres.2014.04.016
- 115) Ishii, T., Konishi, T., Yamasaki, T., Enomoto, A., Yoshida, M., Maeda, I., Shimizu, K. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81*, 964-968. Doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.055
- 116) Prozil, S.O., Costa, E. V., Evtuguin, D. V., Cruz Lopes, L.P., Domingues, M.R.M. *Carbohydr. Res.* **2012**, *356*, 252-259. Doi:10.1016/j.carres.2012.02.001
- 117) Zhong, R., Teng, Q., Lee, C., Ye, Z.H. *Plant Signal. Behav.* **2014**, *9*, 2-6.

- Doi:10.4161/psb.27933
- 118) Jaseja, M., Perlin, A.S. **1989**, *186*, 313-319. Doi:10.1016/0008-6215(89)84045-5
- 119) Yin, J.Y., Lin, H.X., Nie, S.P., Cui, S.W., Xie, M.Y. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88*, 1395-1401. Doi:10.1016/j.carbpol.2012.02.025
- 120) Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. *J. Biotechnol.* **1992**, *23*, 257-270. Doi:10.1016/0168-1656(92)90074-J
- 121) Thomas, L., Parameswaran, B., Pandey, A. *Renew. Energy* **2016**, *98*, 9-15. Doi:10.1016/j.renene.2016.05.011
- 122) Jones, T.M., Albersheim, P. *Plant Physiol.* **1972**, *49*, 926-936. Doi:10.1104/pp.49.6.926
- 123) Togashi, H., Kato, A., Shimizu, K. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 247-252. Doi:10.1016/j.carbpol.2009.03.035
- 124) Utille, J.P., Kováč, P., Sauriol, F., Perlin, A.S. *Carbohydr. Res.* **1986**, *154*, 251-258. Doi:10.1016/S0008-6215(00)90037-5
- 125) [https://hmdb.ca/spectra/nmr\\_one\\_d/2039](https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/2039). *D-Glucurono-6,3-Lactone NMR Spectra HMDB*.
- 126) Bock, K., Pedersen, C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 27-66. Doi:10.1016/s0065-2318(08)60055-4
- 127) Miao, M., Ma, Y., Jiang, B., Cui, S.W., Wu, S., Zhang, T. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre* **2015**, *6*, 109-116. Doi:10.1016/j.bcdf.2015.09.007
- 128) van Leeuwen, S.S., Leeflang, B.R., Gerwig, G.J., Kamerling, J.P. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1114-1119. Doi:10.1016/j.carres.2008.01.043
- 129) Kovac, P., Hirsch, J., Usov, A.I., Yarotsky, V., Shashkov, A.S. *Carbohydr. Res.* **1980**, *85*, 177-185. Doi:10.1016/S0008-6215(00)84669-8
- 130) Kardošová, A., Matulová, M., Malovíková, A. *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 99-105. Doi:10.1016/S0008-6215(98)00072-X
- 131) Vignon, M.R., Gey, C. *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 107-111. Doi:10.1016/S0008-6215(98)00002-0
- 132) Chong, S.L., Virkki, L., Maaheimo, H., Juvonen, M., Derba-Maceluch, M., Koutaniemi, S.,

- Roach, M., Sundberg, B., Tuomainen, P., Mellerowicz, E.J., Tenkanen, M. *Glycobiology* **2014**, *24*, 494-506. Doi:10.1093/glycob/cwu017
- 133) Yalpani, M. *Carbohydrates* Published online 1999, 294-318. Doi:10.1007/978-94-015-9281-9\_8
- 134) Cumpstey, I. *ISRN Org. Chem.* **2013**, *2013*, 383-406. Doi:10.1201/b11245-8
- 135) Rinaudo, M. *Polyelectrolytes Derived from Natural Polysaccharides*. En: *Monomers, Polymers and Composites*. Elsevier Ltd., **2008**, 495-516.
- 136) Sinitsya, A., Čopíková, J., Prutyánov, V., Skoblya, S., MacHovič, V. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, 359-368. Doi:10.1016/S0144-8617(99)00184-8
- 137) Reitsma, J.C.E., Thibault, J.F., Pilnik, W. *Top. Catal.* **1986**, *1*, 121-127. Doi:10.1016/S0268-005X(86)80014-5
- 138) Montalbetti, C.A.G.N., Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852. Doi:10.1016/j.tet.2005.08.031
- 139) Chen, J., Liu, W., Liu, C.M., Li, T., Liang, R.H., Luo, S.J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 1684-1698. Doi:10.1080/10408398.2012.718722
- 140) Nakajima, N., Ikada, Y. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 123-130. Doi:10.1021/bc00031a015
- 141) Mojarradi, H. *Tesis de Maestría: "Coupling of Substances Containing a Primary Amine to Hyaluronan via Carbodiimide-Mediated Amidation."* Uppsala University, **2011**.
- 142) Kuo, J.W., Swarm, D.A., Prestwich, G.D. *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 232-241. Doi:10.1021/bc00010a007
- 143) Tomihata, K., Ikada, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 243-251. Doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199711)37:2<243::AID-JBM14>3.0.CO;2-F
- 144) Jakobi, V., Schwarze, J., Finlay, J.A., Nolte, K.A., Spöllmann, S., Becker, H.W., Clare, A.S., Rosenhahn, A. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 402-408. Doi:10.1021/acs.biomac.7b01498
- 145) McDonagh, B.H. *Tesis de Maestría: "Optimalised Carbodiimide Chemistry for RGD-Coupled Alginate."* Norwegian University of Science and Technology, **2012**.
- 146) Madison, S.A., Carnali, J.O. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 13547-13555.

- Doi:10.1021/ie401724m
- 147) Kuzmenko, V., Hägg, D., Toriz, G., Gatenholm, P. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 862-868. Doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.077
- 148) Danishefsky, I., Siskovic, E. *Carbohydr. Res.* **1971**, *16*, 199-205. Doi:10.1016/S0008-6215(00)86114-5
- 149) Williams, A., Ibrahim, I.T. *Chem. Rev.* Published online 1981, 589-636. Doi:10.1021/cr00046a004
- 150) Grabarek, Z., Gergely, J. *Anal. Biochem.* **1990**, *185*, 131-135. Doi:10.1016/0003-2697(90)90267-D
- 151) Taubner, T., Synytsya, A., Čopíková, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 11-18. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.049
- 152) Totaro, K.A., Liao, X., Bhattacharya, K., Finneman, J.I., Sperry, J.B., Massa, M.A., Thorn, J., Ho, S. V., Pentelute, B.L. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 994-1004. Doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00043
- 153) Bulpitt, P., Aeschlimann, D. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *47*, 152-169. Doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199911)47:2<152::AID-JBM5>3.0.CO;2-I
- 154) Bystrický, S., Alföldi, J., Machová, E., Steiner, B., Šoltés, L. *Chem. Pap.* **2001**, *55*, 49-52.
- 155) Gao, Y., Kyratzis, I. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1945-1950. Doi:10.1021/bc800051c
- 156) Souguir, Z., Roudesli, S., About-Jaudet, E., Le Cerf, D., Picton, L. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *313*, 108-116. Doi:10.1016/j.jcis.2007.03.012
- 157) Bokias, G., Mylonas, Y., Staikos, G., Bumbu, G.G., Vasile, C. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4958-4964. Doi:10.1021/ma010154e
- 158) Pasqui, D., De Cagna, M., Barbucci, R. *Polymers (Basel)*. **2012**, *4*, 1517-1534. Doi:10.3390/polym4031517
- 159) Follain, N., Montanari, S., Jeacomine, I., Gambarelli, S., Vignon, M.R. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 333-343. Doi:10.1016/j.carbpol.2008.02.016
- 160) Leung, A., Lawrie, G., Nielsen, L., Trau, M. *J. Microencapsul.* **2008**, *25*, 387-398. Doi:10.1080/02652040802008857

- 161) Vinnitskiy, D.Z., Ustyuzhanina, N.E., Nifantiev, N.E. *Russ. Chem. Bull.* **2015**, *64*, 1273-1301. Doi:10.1007/s11172-015-1010-7
- 162) Ahmad, Z., Shepherd, J.H., Shepherd, D. V., Ghose, S., Kew, S.J., Cameron, R.E., Best, S.M., Brooks, R.A., Wardale, J., Rushton, N. *Regen. Biomater.* **2015**, *2*, 77-85. Doi:10.1093/rb/rbv005
- 163) Thoreson, A.R., Hiwatari, R., An, K.N., Amadio, P.C., Zhao, C. *J. Hand Surg. Am.* **2015**, *40*, 1986-1991. Doi:10.1016/j.jhsa.2015.06.117
- 164) Park, S.N., Park, J.C., Kim, H.O., Song, M.J., Suh, H. *Biomaterials.* **2002**, *23*, 1205-1212. Doi:10.1016/S0142-9612(01)00235-6
- 165) Gutiérrez, P.H., Salazar, R. de la V. *Análisis y Diseño de Experimentos*. McGraw-Hill Interamericana, **2008**.
- 166) Daniel, C. *Technometrics* **1959**, *1*, 311-341. Doi:10.2307/1266715
- 167) Box, G.E.P., Behnken, D.W. *Technometrics.* **1960**, *2*, 455-475. Doi:10.1080/00401706.1960.10489912
- 168) Espartero, J.L., Rashkov, I., Li, S.M., Manolova, N., Vert, M. *Macromolecules.* **1996**, *29*, 3535-3539. Doi:10.1021/ma950529u
- 169) Wilchek, M., Miror, T. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2155-2161. Doi:10.1021/bi00382a014
- 170) Hoare, D.G., Olson, A., Koshland, D.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1638-1643. Doi:10.1021/ja01008a040
- 171) Zalipsky, S. *Chem. Commun.* Published online 1998, 69-70. Doi:10.1039/A706713E
- 172) Razavi, S.M.A., Irani, M. *Rheology of Food Gum*. En: *Bioactive Molecules in Food*. Springer, **2019**, 1959-1985.
- 173) Wang, Q., Cui, S.W. *Understanding the Physycal Properties of Food Polysaccharides*. En: *Food Carbohydrates*. Taylor & Francis, **2005**, 168-224.
- 174) Rao, M.A. *Rheology of Fluid, Semisolid and Solid Foods*. Springer, **2014**.
- 175) Barnes, H.A. *A Handbook of Elementary Rheology*. The University of Wales, **2000**.
- 176) Steffe, J.F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Freeman Press, **1996**.

- 177) Lapasin, R., Prich, S. *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. Springer Science, **1995**.
- 178) Tischer, C.A., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *47*, 151-158. Doi:10.1016/S0144-8617(01)00173-4
- 179) Ross-Murphy, S.B. *Rheological Methods*. En: *Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers*. Springer, **1994**, 343-392.
- 180) Song, K., Kim, Y., Chang, G. *Fibers Polym.* **2006**, *7*, 129-138. Doi:10.1007/BF02908257
- 181) Oblonšek, M., Šostar-Turk, S., Lapasin, R. *Rheol. Acta* **2003**, *42*, 491-499. Doi:10.1007/s00397-003-0304-0
- 182) Atgié, M., Garrigues, J.C., Chennevière, A., Masbarnat, O., Roger, K. *Food Hydrocoll.* **2019**, *91*, 319-330. Doi:10.1016/j.foodhyd.2019.01.033
- 183) Gunasekaran, S., Yoon, W.B. *J. Texture Stud.* **2014**, *45*, 80-87. Doi:10.1111/jtxs.12040
- 184) Stephen, A.M., Phillips, G.O., Williams, P.A. *Food Polysaccharides and Their Applications (Second Edition)*. Taylor & Francis, **2006**.
- 185) Li, L. *Macromolecules* **2002**, *35*, 5990-5998. Doi:10.1021/ma0201781
- 186) Medronho, B., Romano, A., Miguel, M.G., Stigsson, L., Lindman, B. *Cellulose*. **2012**, *19*, 581-587. Doi:10.1007/s10570-011-9644-6
- 187) Busse-Wicher, M., Gomes, T.C.F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N.J., Bolam, D.N., Skaf, M.S., Dupree, P. *Plant J.* **2014**, *79*, 492-506. Doi:10.1111/tpj.12575
- 188) Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. *Anal. Biochem.* **1973**, *54*, 484-489. Doi:10.1016/0003-2697(73)90377-1
- 189) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Lewis Farr, A., Randall, R.J. *Jounal Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275. Doi:10.1016/S0021-9258(19)52451-6





# APÉNDICE DE ESPECTROS



## Índice de figuras

- Figura 1.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.
- Figura 2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.
- Figura 3.** Espectro TOCSY de la fracción **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 4.** Espectro NOESY de la fracción **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 5.** Ampliación de espectro bidimensional HMBC de la fracción **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 6.** Espectro HSQC del producto reducido **GBR** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del producto reducido **GBR** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 8.** Espectro TOCSY del producto reducido **GBR** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 9.** Espectro NOESY del producto reducido **GBR** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 10.** Espectro HSQC del producto hidrolizado **GBH** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 11.** Espectro TOCSY del producto hidrolizado **GBH** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 12.** Espectro NOESY del producto hidrolizado **GBH** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 13.** Espectro HSQC del producto desacetilado **GBD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 14.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del producto desacetilado **GBD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 15.** Espectro TOCSY del producto desacetilado **GBD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 16.** Espectro NOESY del producto desacetilado **GBD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 17.** Espectro HSQC del producto reducido e hidrolizado **GBRH** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 18.** Espectro TOCSY del producto reducido e hidrolizado **GBRH** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 19.** Espectro NOESY del producto reducido e hidrolizado **GBRH** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 20.** Espectro HSQC del producto reducido y desacetilado **GBRD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 21.** Espectro TOCSY del producto reducido y desacetilado **GBRD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 22.** Espectro NOESY del producto reducido y desacetilado **GBRD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 23.** Espectros HSQC del producto hidrolizado y desacetilado **GBHD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 24.** Espectro TOCSY del producto hidrolizado y desacetilado **GBHD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 25.** Espectro NOESY del producto hidrolizado y desacetilado **GBHD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 26.** Espectro HSQC del producto reducido, hidrolizado y desacetilado **GBRHD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 27.** Espectro TOCSY del producto reducido, hidrolizado y desacetilado **GBRHD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Figura 28.** Espectro NOESY del producto reducido, hidrolizado y desacetilado **GBRHD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .



## Apéndice de espectros

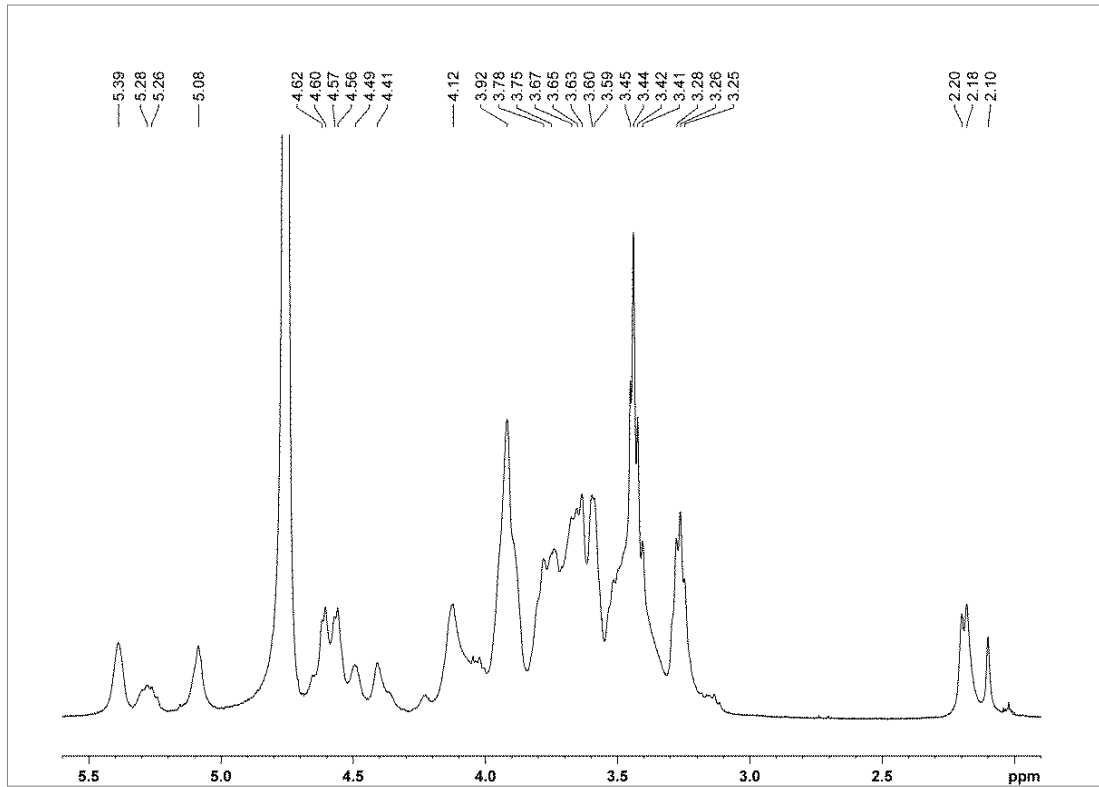


Figura 1. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.

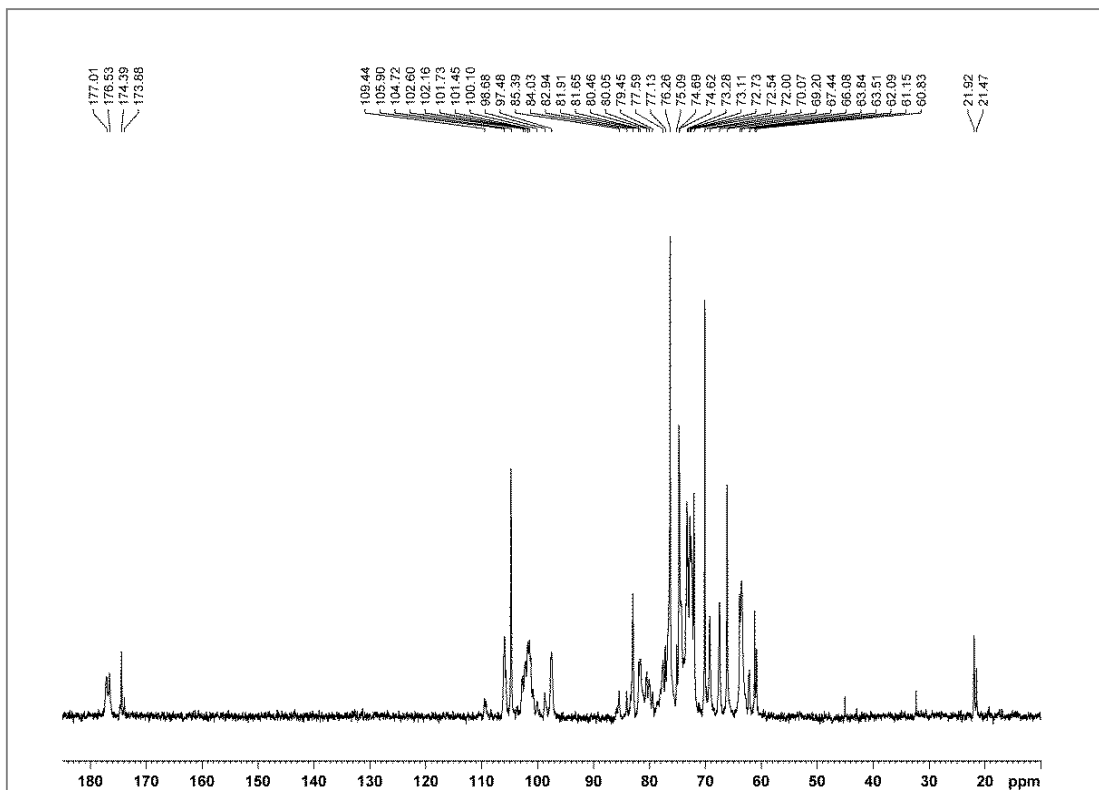


Figura 2. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de **GB** en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.

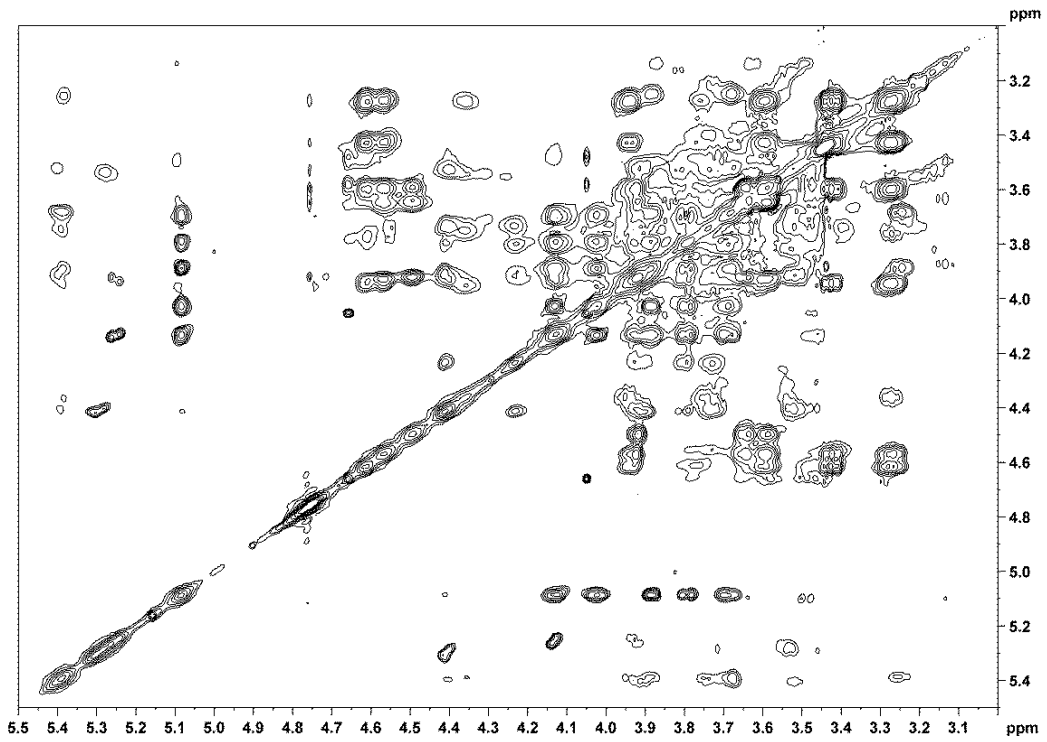


Figura 3. Espectro TOCSY de la fracción GB en D<sub>2</sub>O.

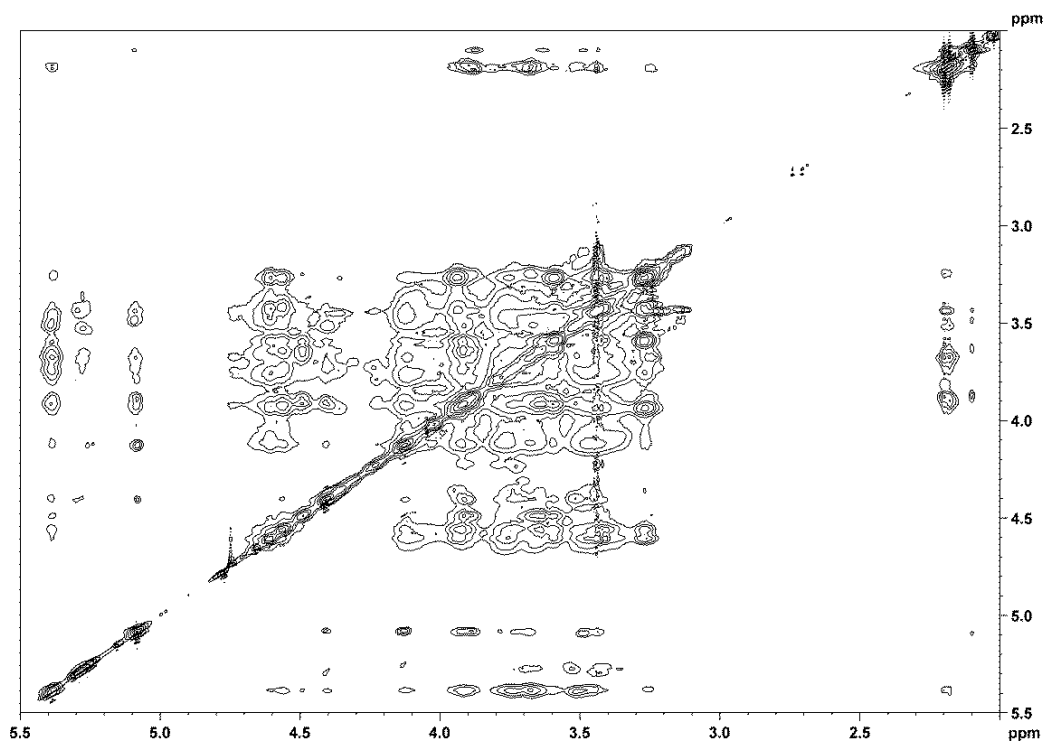


Figura 4. Espectro NOESY de la fracción GB en D<sub>2</sub>O.

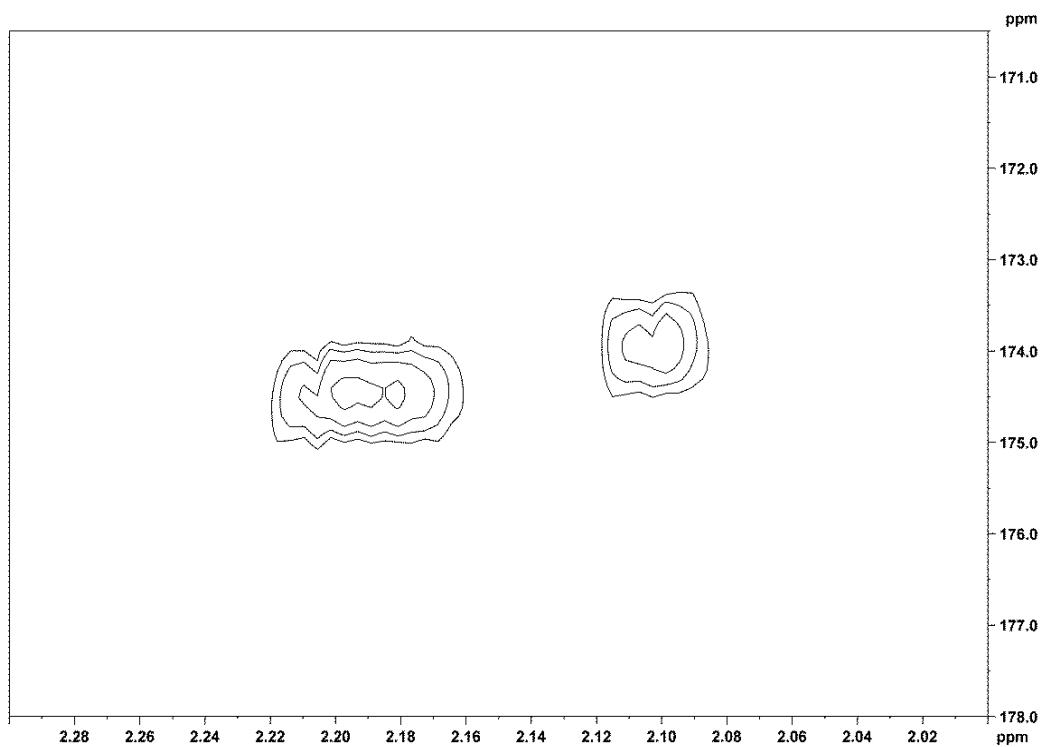


Figura 5. Ampliación de espectro bidimensional HMBC de la fracción **GB** en D<sub>2</sub>O.

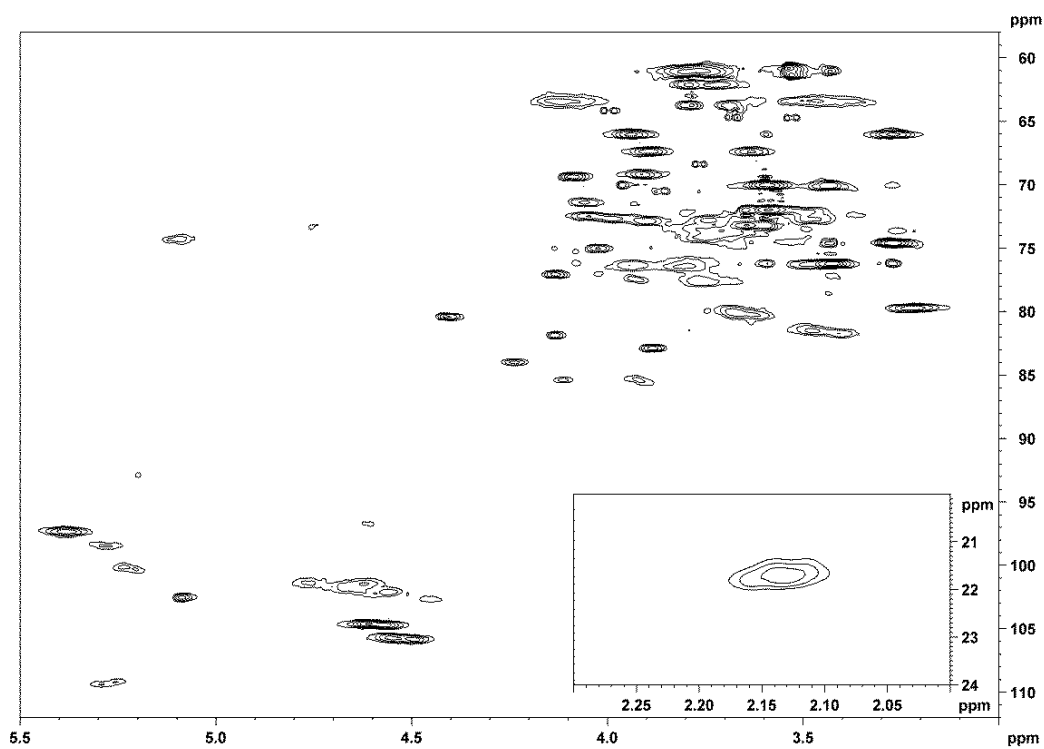


Figura 6. Espectro HSQC del producto reducido **GBR** en D<sub>2</sub>O.

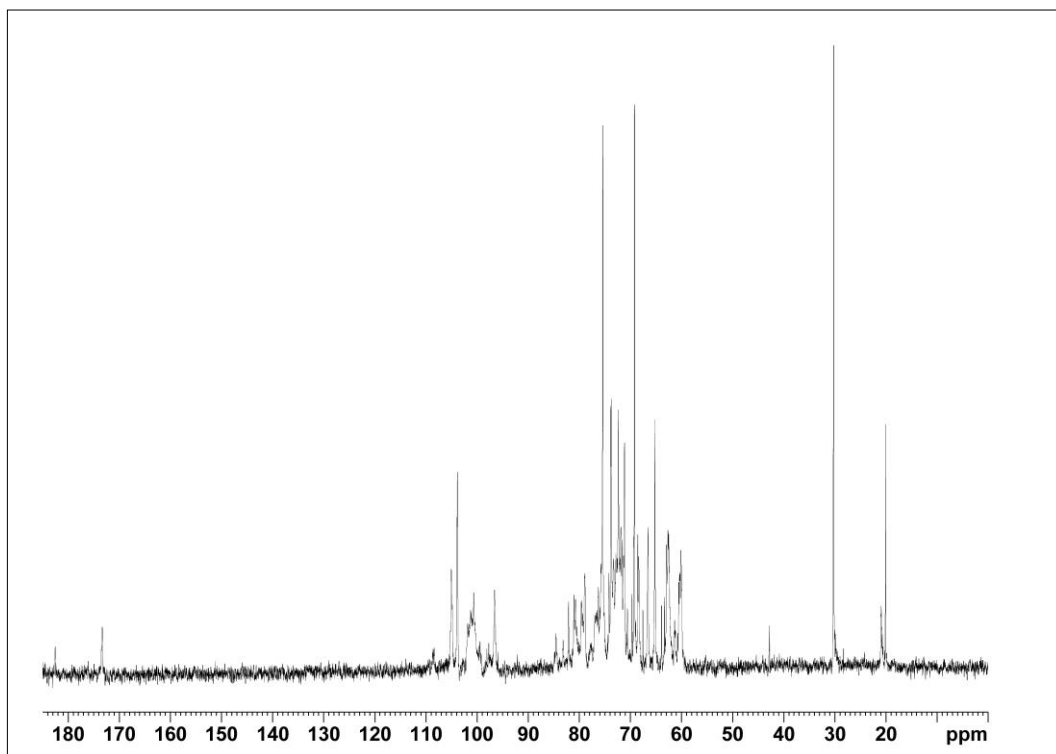


Figura 7. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del producto reducido **GBR** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

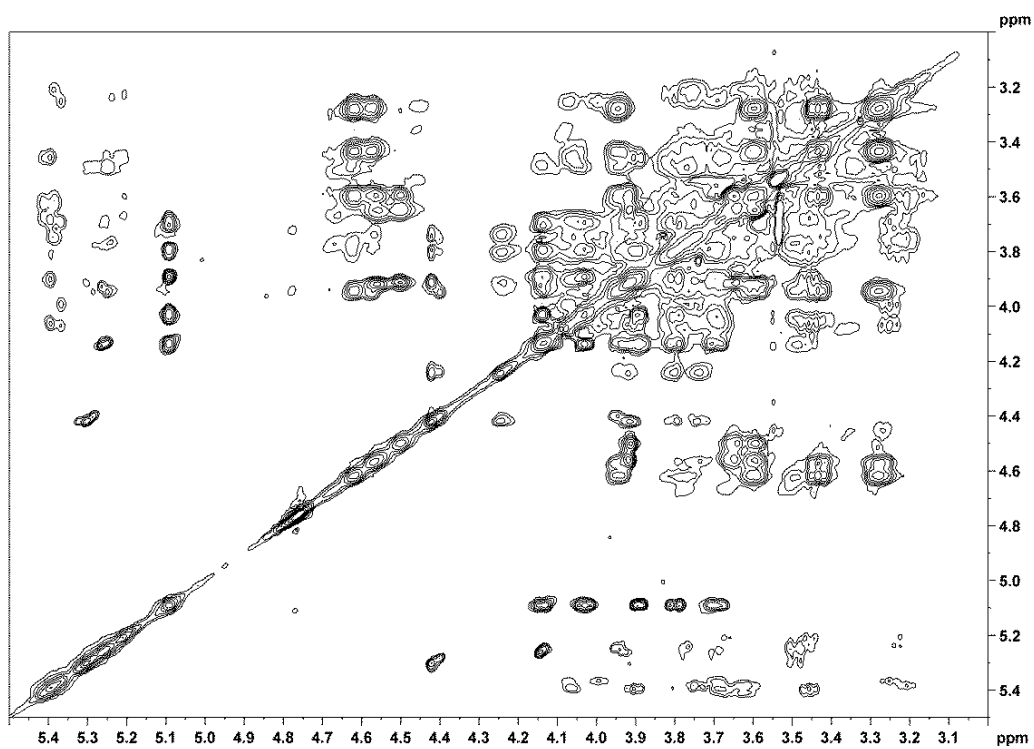


Figura 8. Espectro TOCSY del producto reducido **GBR** en  $\text{D}_2\text{O}$ .



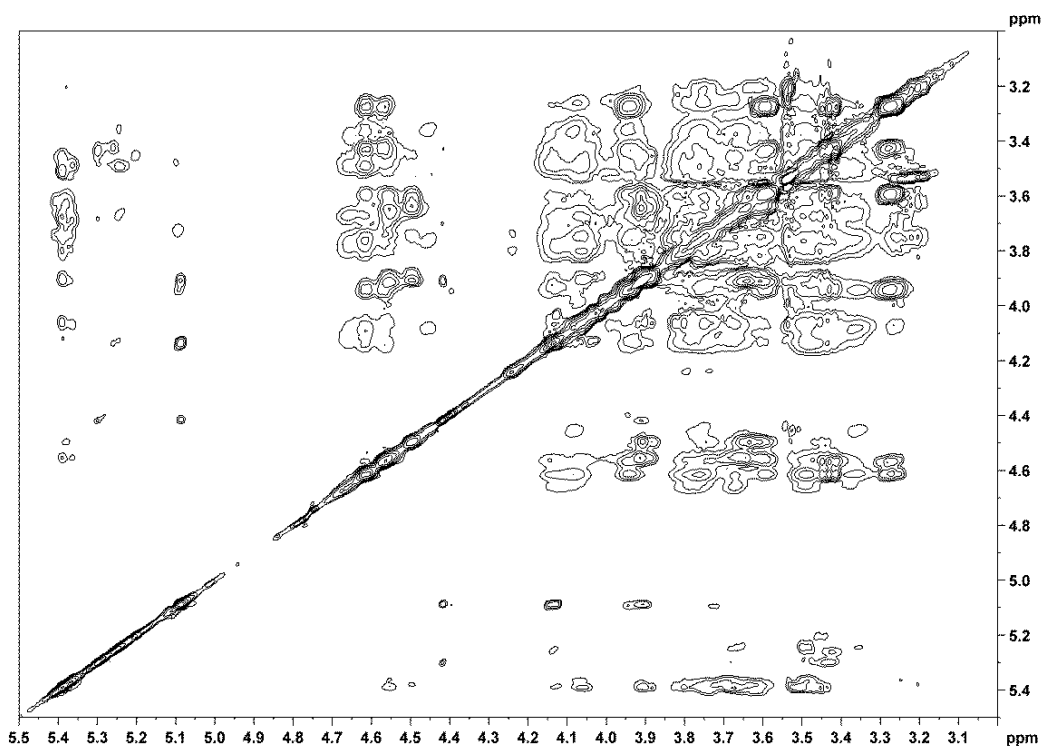


Figura 9. Espectro NOESY del producto reducido **GBR** en D<sub>2</sub>O.

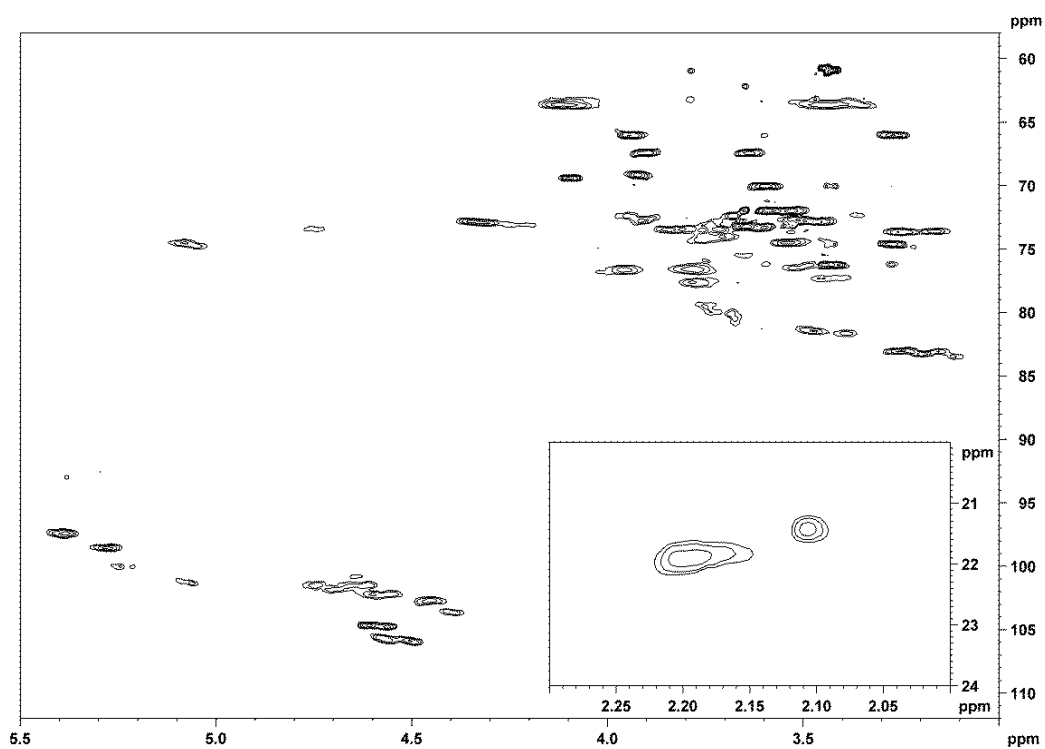


Figura 10. Espectro HSQC del producto hidrolizado **GBH** en D<sub>2</sub>O.

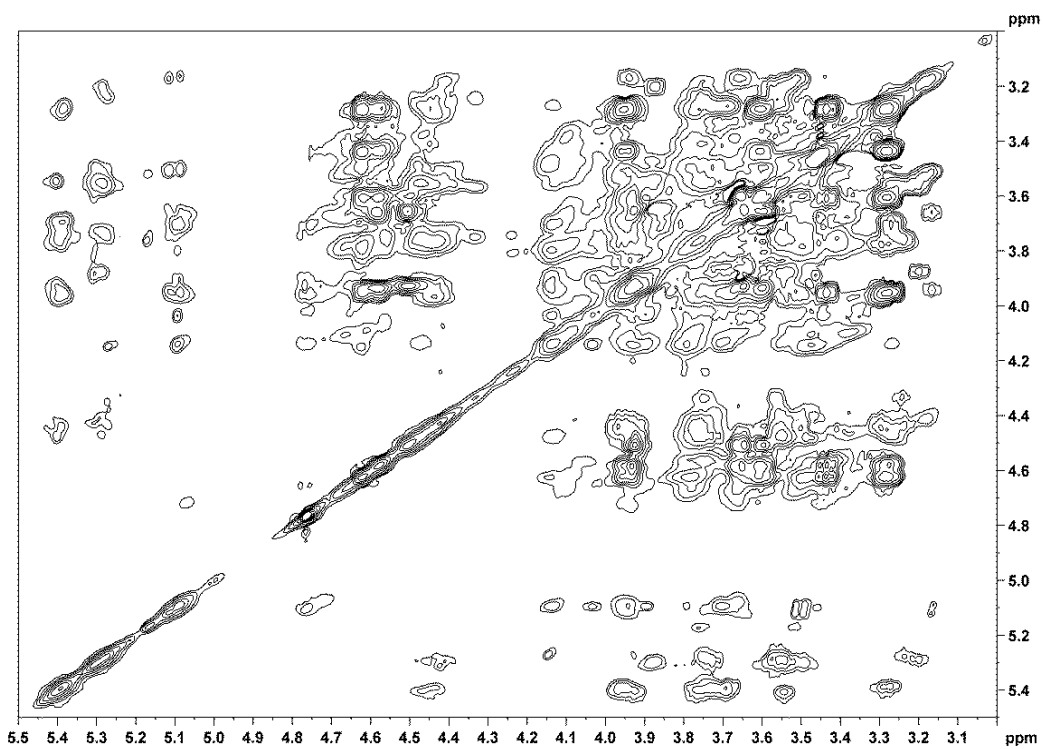


Figura 11. Espectro TOCSY del producto hidrolizado GBH en D<sub>2</sub>O.

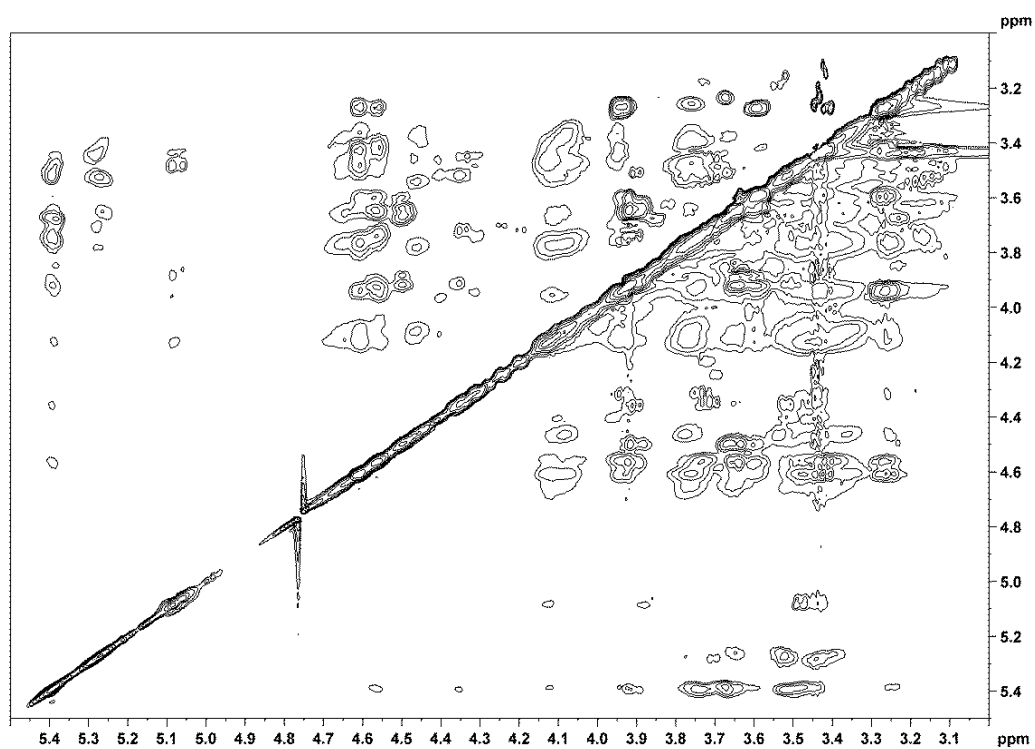


Figura 12. Espectro NOESY del producto hidrolizado GBH en D<sub>2</sub>O.

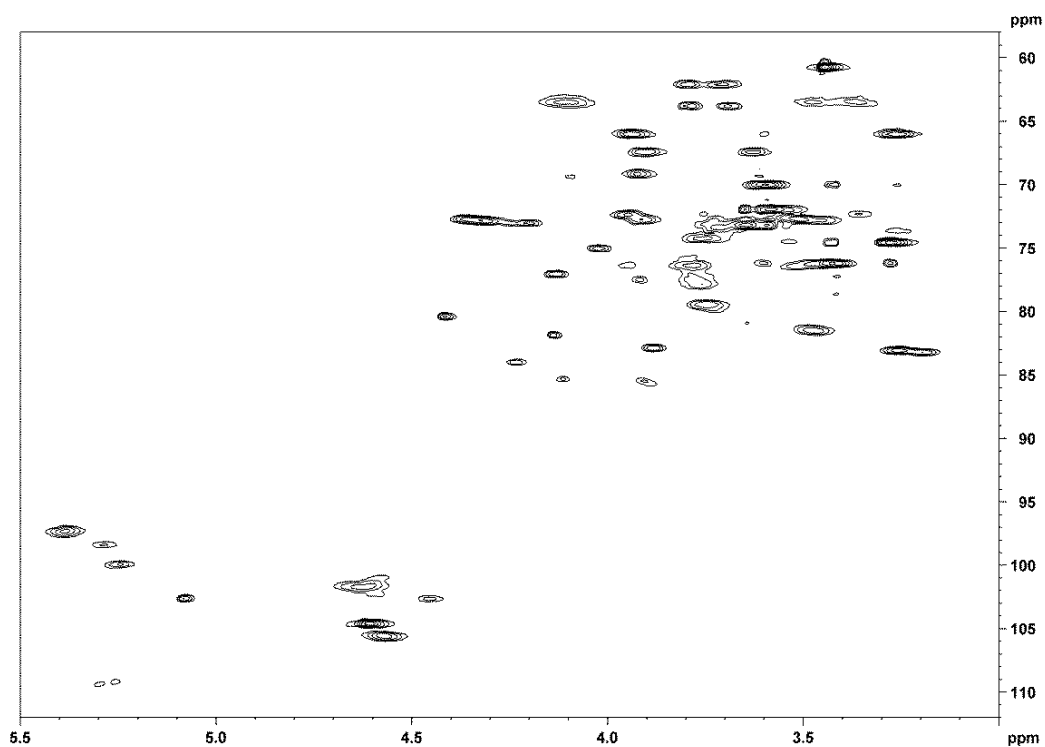


Figura 13. Espectro HSQC del producto desacetilado **GBD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

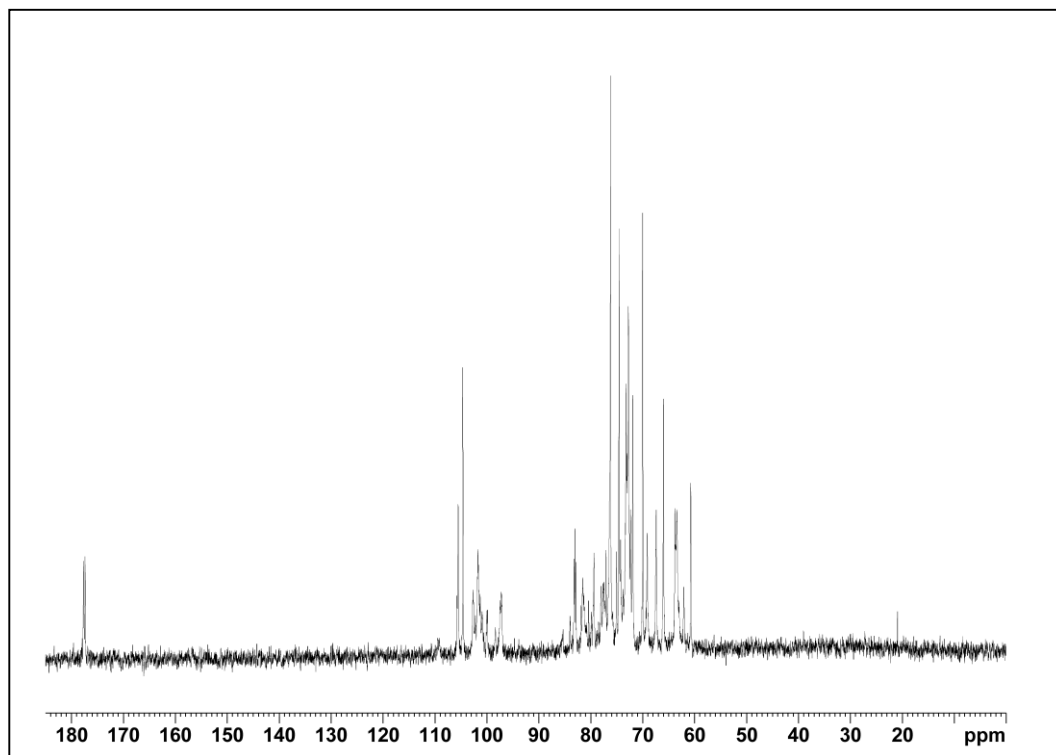


Figura 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del producto desacetilado **GBD** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

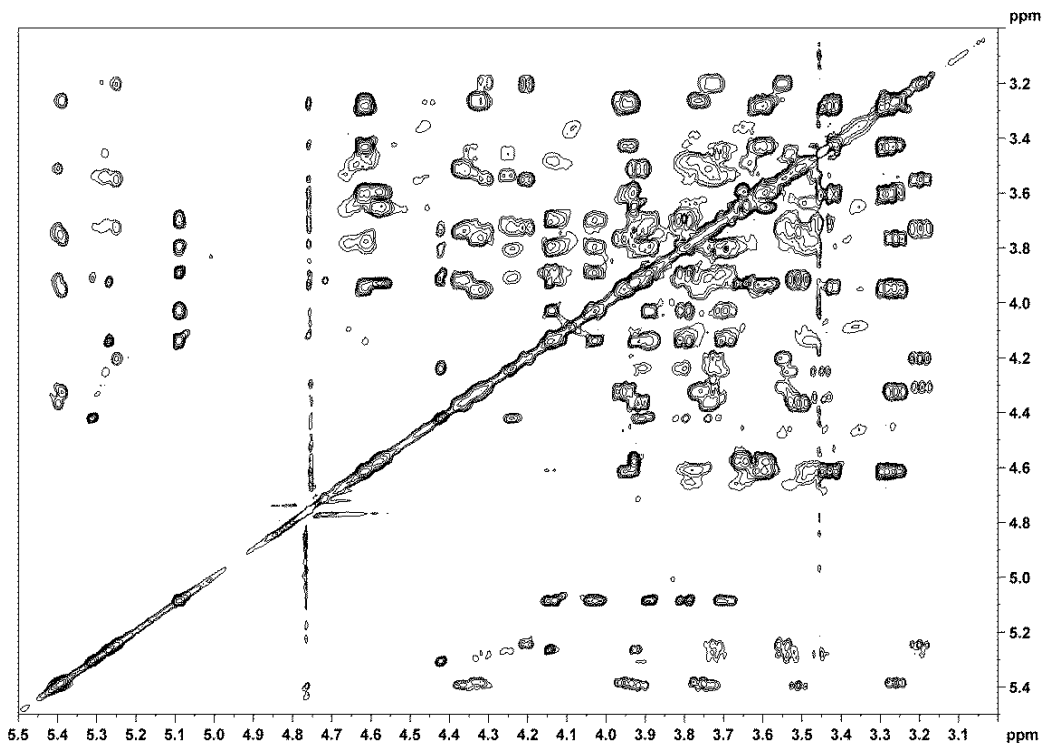


Figura 15. Espectro TOCSY del producto desacetilado **GBD** en D<sub>2</sub>O.

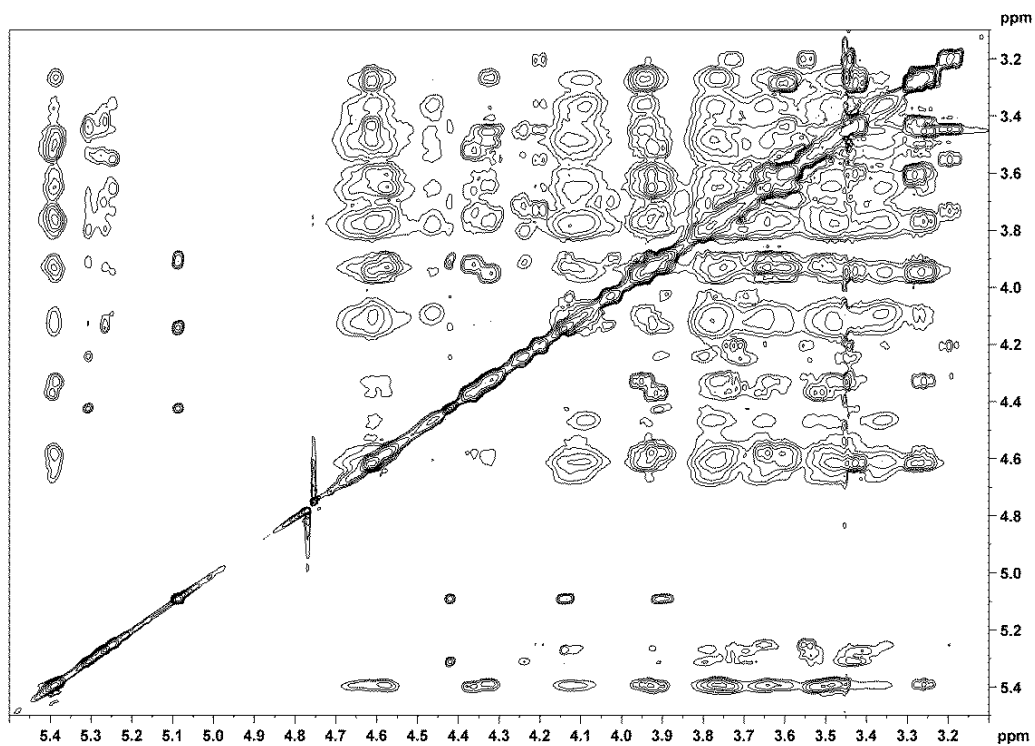


Figura 16. Espectro NOESY del producto desacetilado **GBD** en D<sub>2</sub>O.

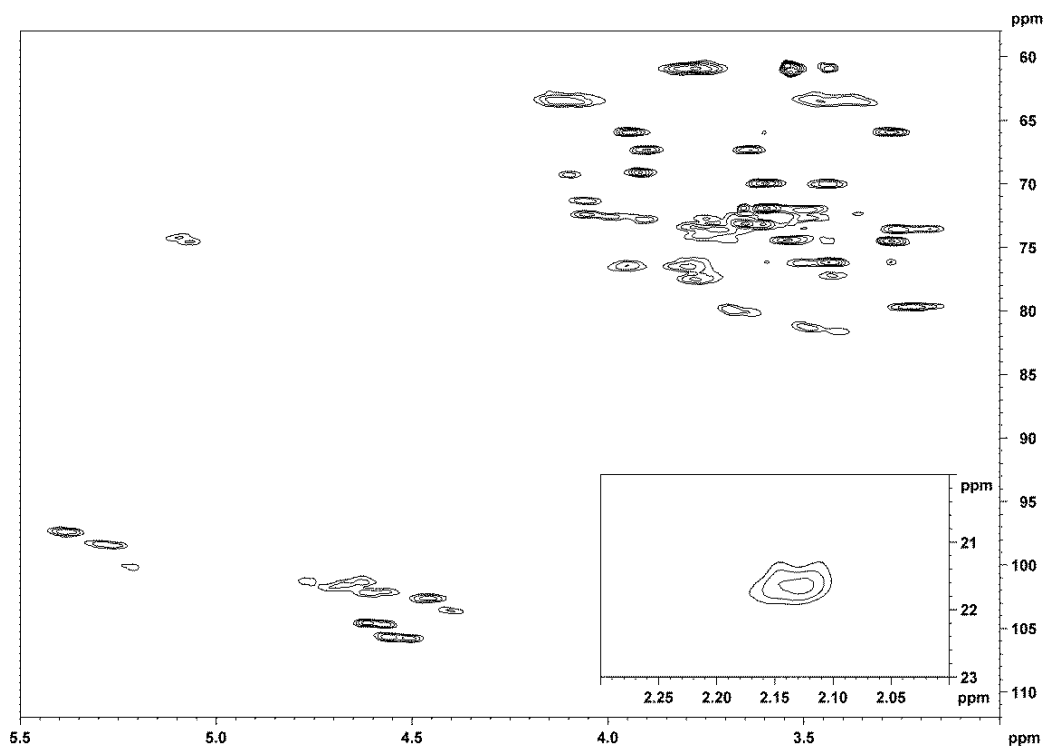


Figura 17. Espectro HSQC del producto reducido e hidrolizado **GBRH** en D<sub>2</sub>O.

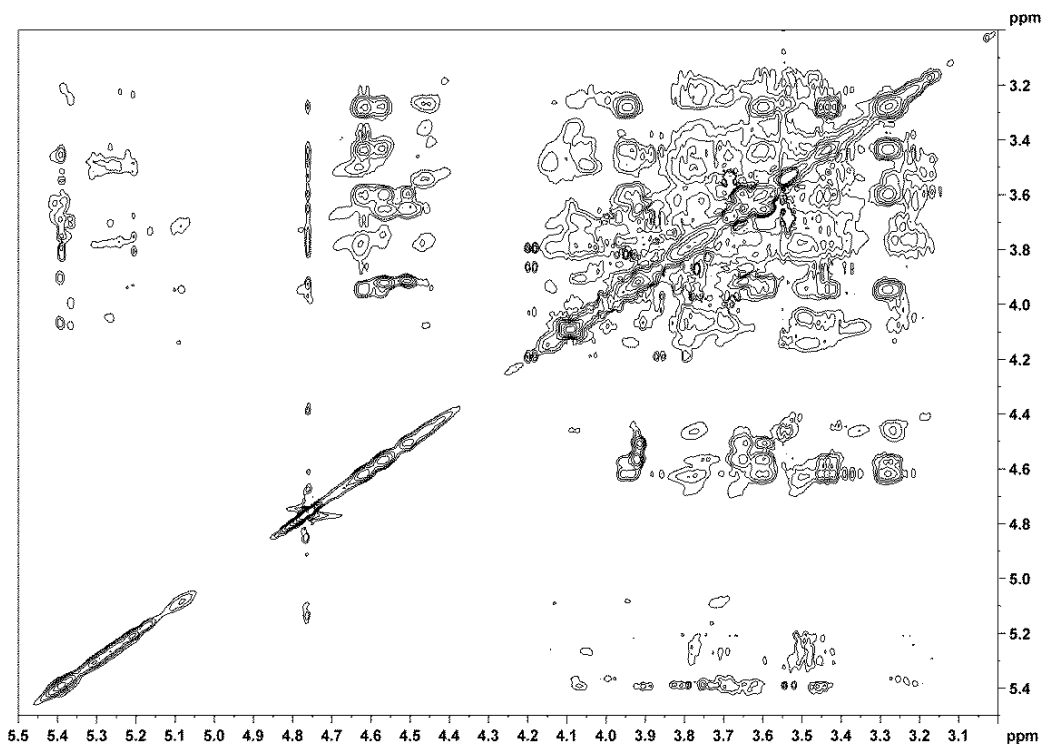


Figura 18. Espectro TOCSY del producto reducido e hidrolizado **GBRH** en D<sub>2</sub>O.

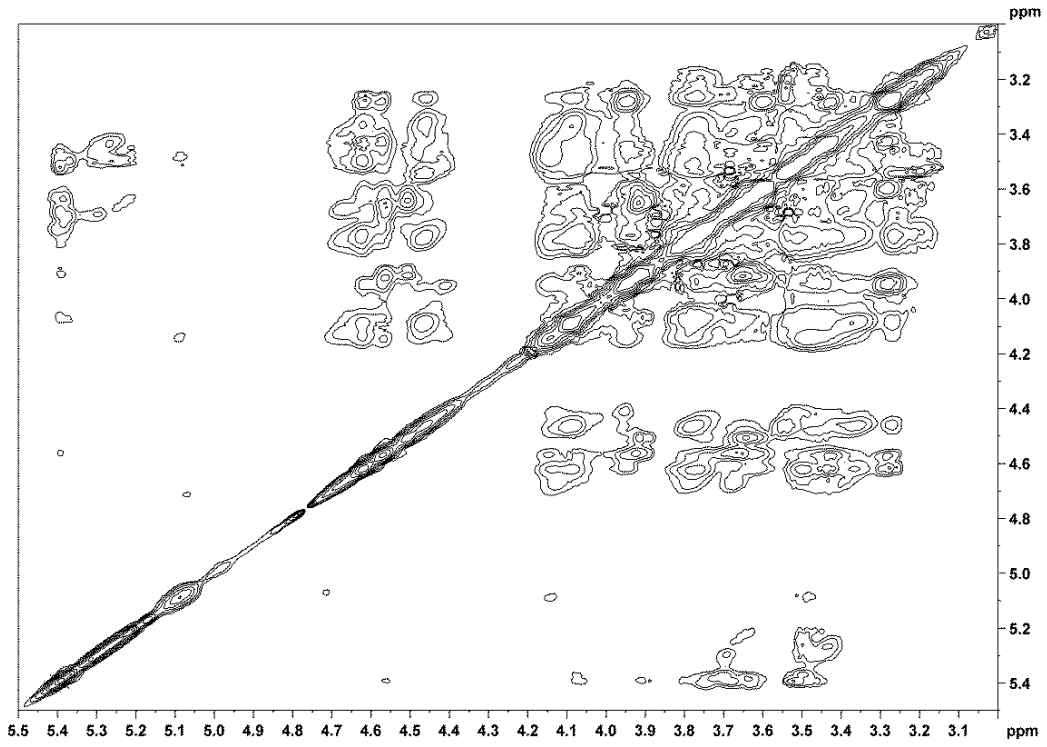


Figura 19. Espectro NOESY del producto reducido e hidrolizado **GBRH** en D<sub>2</sub>O.

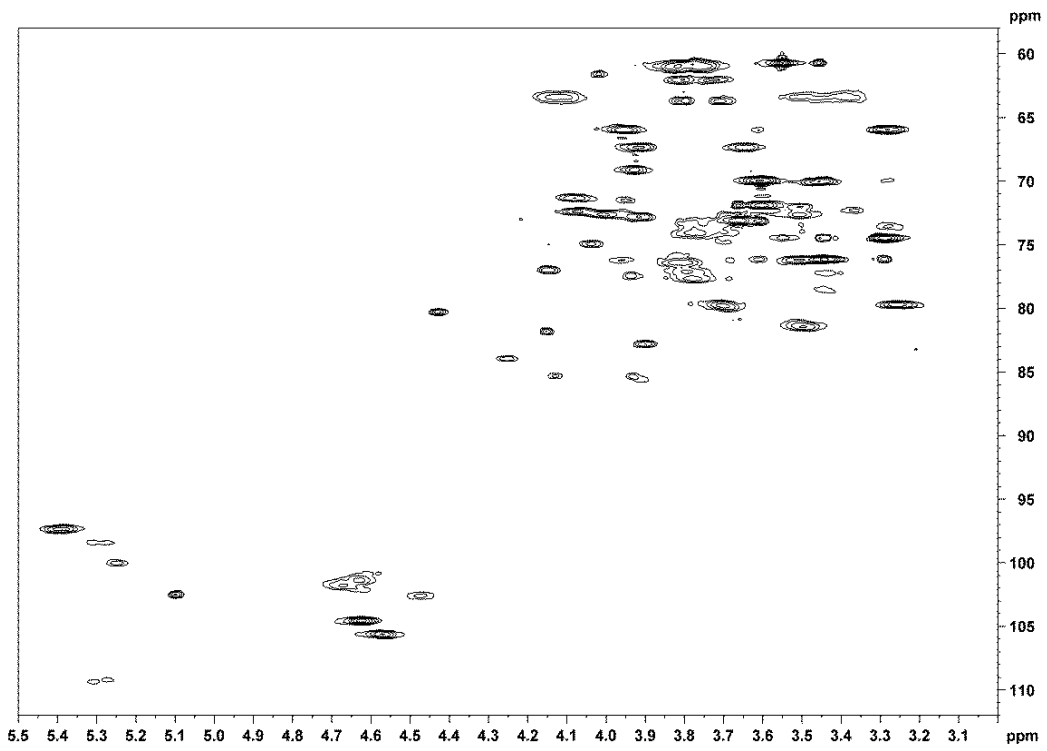


Figura 20. Espectro HSQC del producto reducido y desacetilado **GBRD** en D<sub>2</sub>O.

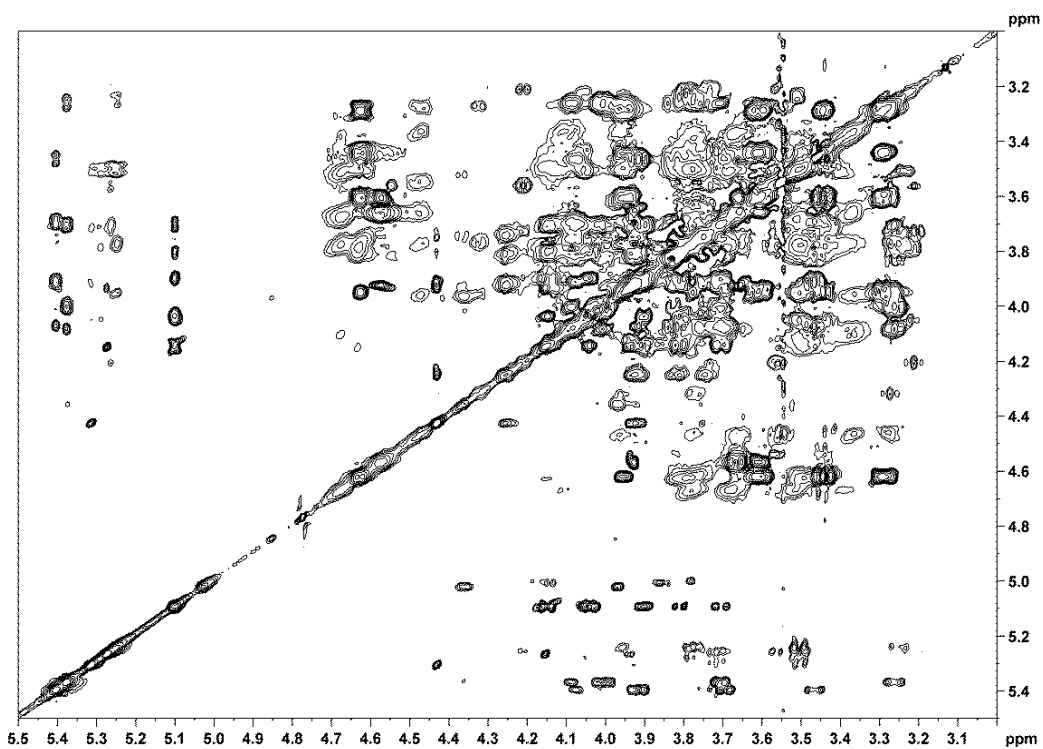


Figura 21. Espectro TOCSY del producto reducido y desacetilado **GBRD** en D<sub>2</sub>O.

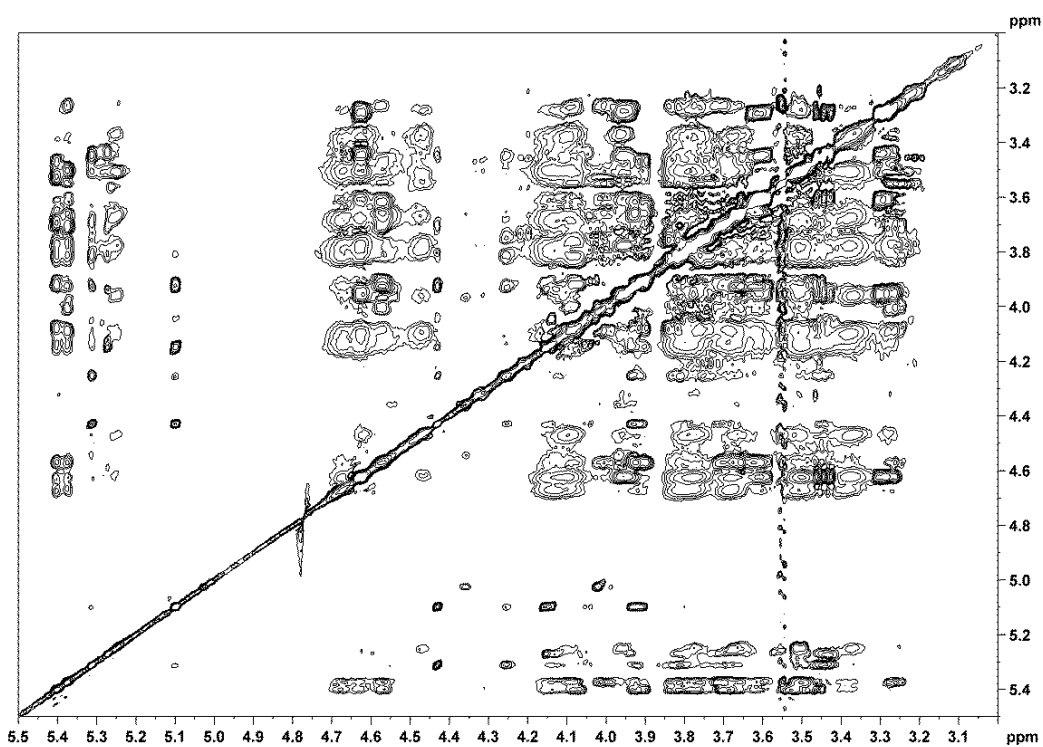


Figura 22. Espectro NOESY del producto reducido y desacetilado **GBRD** en D<sub>2</sub>O.

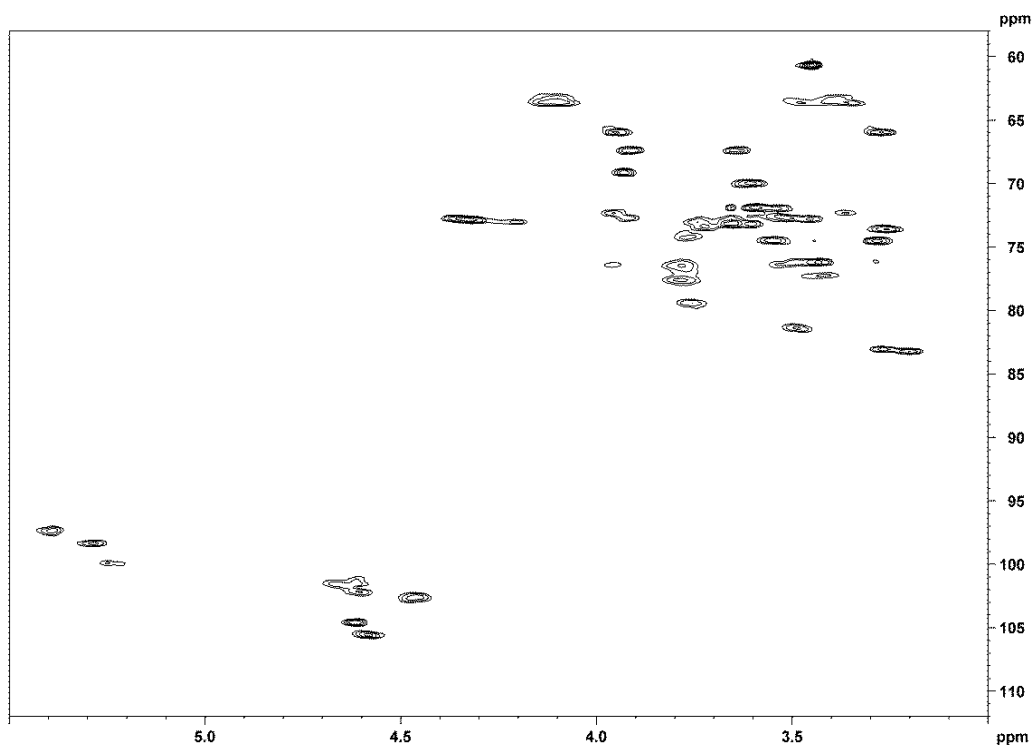


Figura 23. Espectros HSQC del producto hidrolizado y desacetilado GBHD en D<sub>2</sub>O.

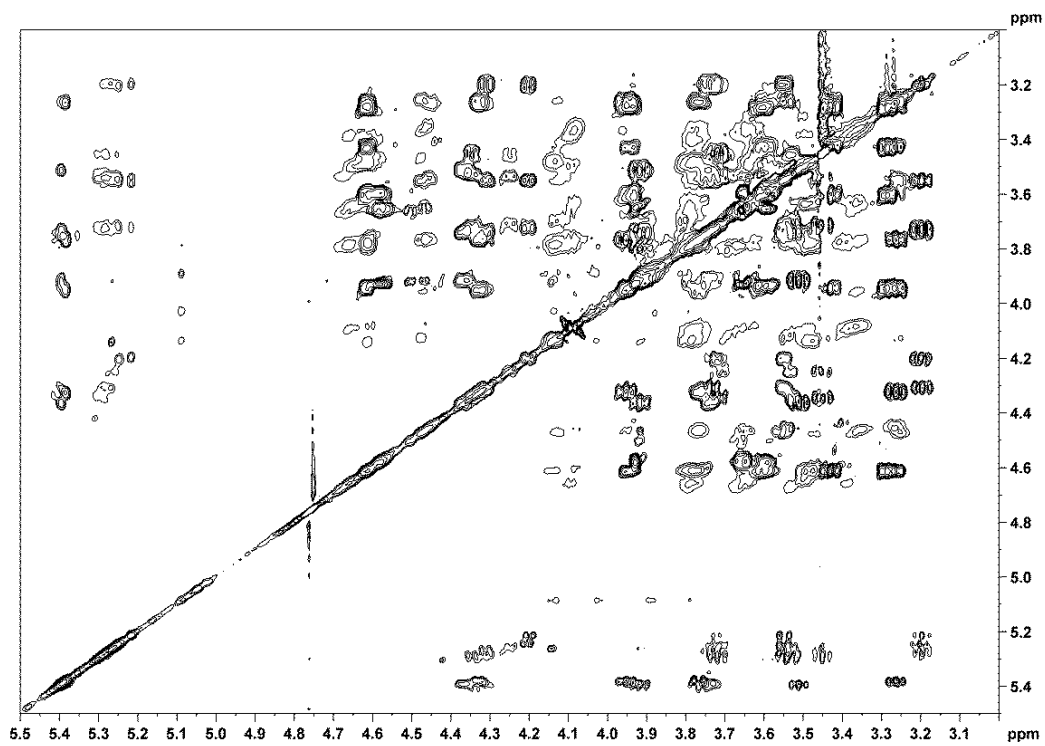


Figura 24. Espectro TOCSY del producto hidrolizado y desacetilado GBHD en D<sub>2</sub>O.



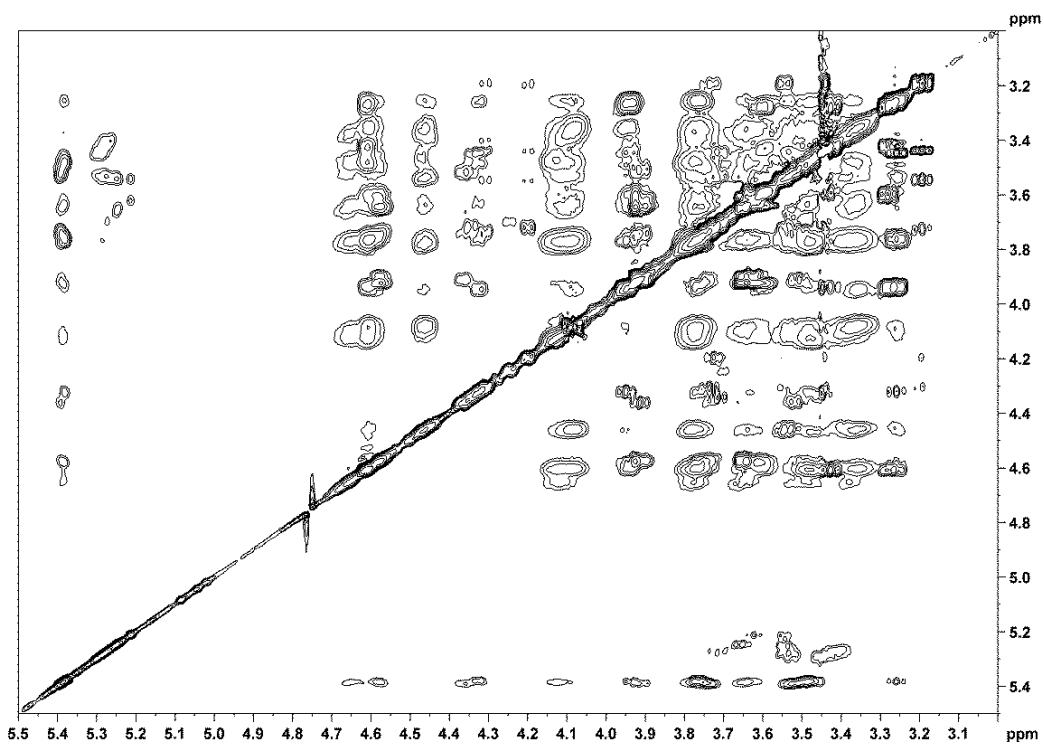


Figura 25. Espectro NOESY del producto hidrolizado y desacetilado **GBHD** en D<sub>2</sub>O.

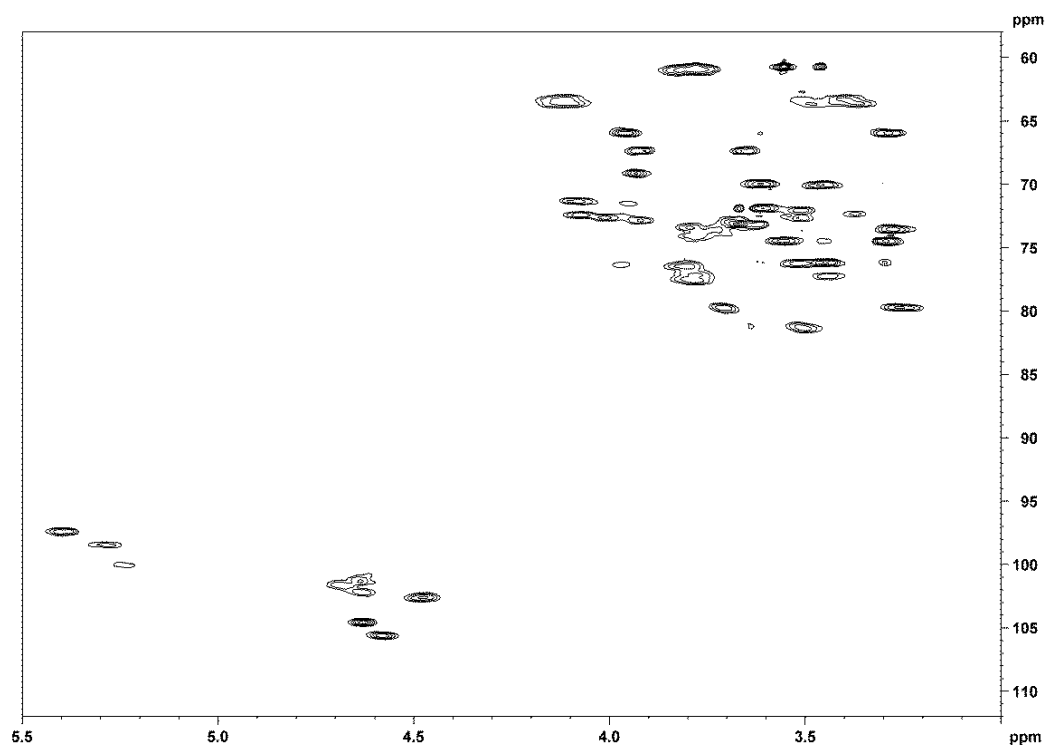


Figura 26. Espectro HSQC del producto reducido, hidrolizado y desacetilado **GBRHD** en D<sub>2</sub>O.

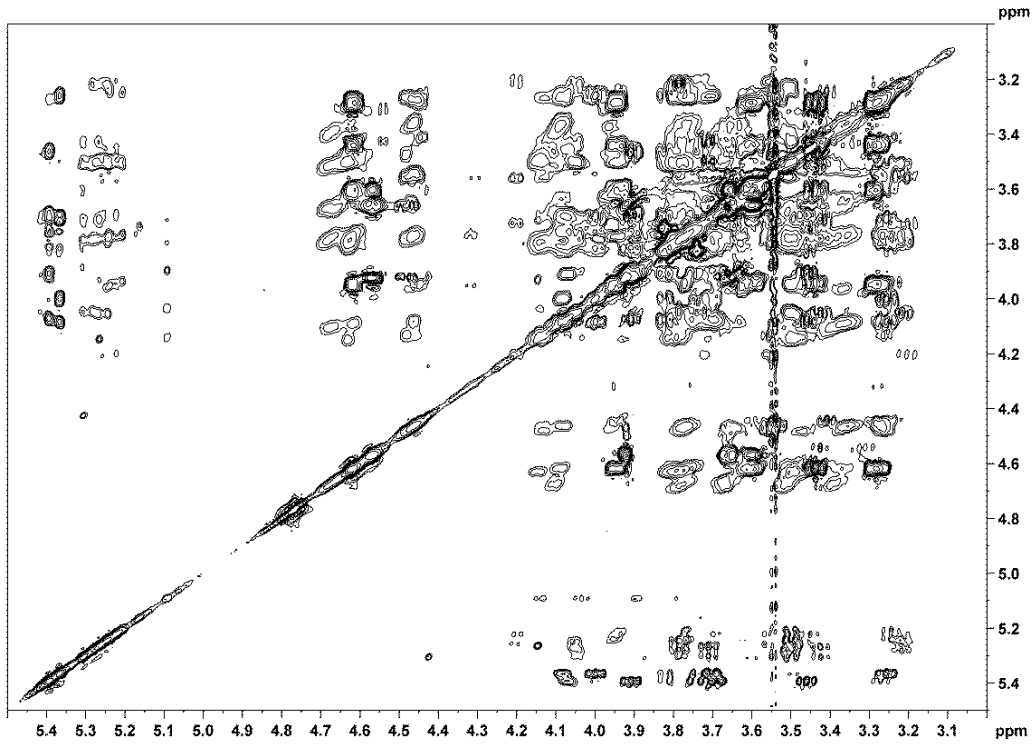


Figura 27. Espectro TOCSY del producto reducido, hidrolizado y desacetilado **GBRHD** en  $D_2O$ .

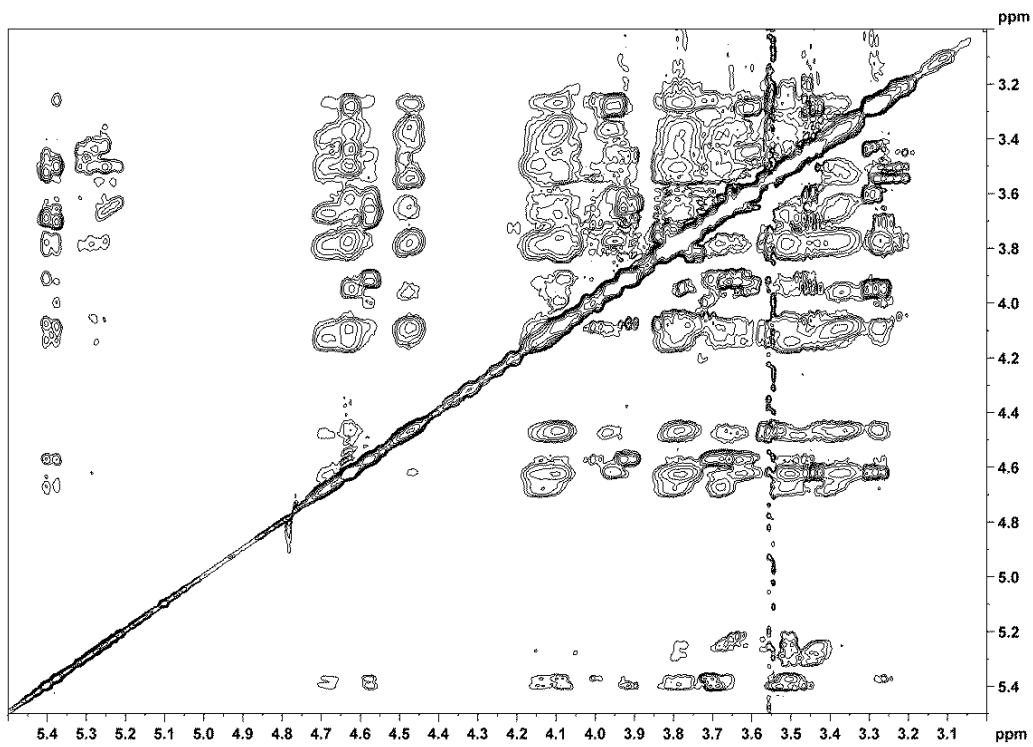


Figura 28. Espectro NOESY del producto reducido, hidrolizado y desacetilado **GBRHD** en  $D_2O$ .