

NOTA TÉCNICA

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PRELIMINAR DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL MUCÍLAGO DEL CARDÓN DATO (*Stenocereus griseus* (Haw.) F. Buxb) *

Preliminary biochemical characterization of the main components from the Cardon Dato (*Stenocereus griseus* (Haw.) F. Buxb) mucilage

Manuel Antonio Henríquez-Rodríguez¹, Juana Pérez², José Gascó², Orlando Rodríguez¹ y Alicia Prieto³

RESUMEN

Se extrajo y caracterizó parcialmente el mucílago del cactus *Stenocereus griseus* (Haw.) F. Buxb, conocido habitualmente como cardón dato (CD). Este material fue dializado y posteriormente separado en dos fracciones, una soluble en agua y otra insoluble, cuya composición y tipos de enlace predominantes fueron analizados mediante espectrofotometría infrarroja, hidrólisis ácida y análisis de metilación. El material contiene ácidos urónicos y azúcares neutros, principalmente galactopiranosida unida mediante enlaces 14 y 14,6 y cantidades menores de ramnosa, galactosa y arabinosa. Esta composición es característica de polisacáridos tipo pectina. El uso como acondicionador natural de suelos de estas pectinas ha sido reportado, de allí el significado de su caracterización.

Palabras clave: cactus, acondicionador de suelo, polisacáridos, pectina, *Lemaireocereus griseus*.

ABSTRACT

The mucilage was extracted and partially characterized from the cactus commonly known as Cardon Dato (*Stenocereus griseus* (Haw.) F. Buxb). The material was dialyzed and separated in two fractions, one water-soluble and the other water-insoluble, and their composition and main linkage types were analyzed by means of infrared spectrophotometer, acid hydrolysis, and methylation analysis. This material contained uronic acids and neutral sugars, mainly galactopyranose (linked by bonds 14 and 14, 6) and minor quantities of ramnose, galactopse and arabinose. This composition is characteristic for pectin-type polysaccharides. The use of such mucilage as a soil natural conditioner has been reported, so, that is the connotation of its characterization.

Key words: cactus, soil conditioner, polysaccharides, pectine, *Lemaireocereus griseus*.

(*) Recibido: 17-09-2008

Acceptado: 30-01-09

¹Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía. Cabudare-Lara, Apartado 400.

Email: hemanuel@ucla.edu.ve

²Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Departamento de Edafología, E.T.S.I.A. Madrid, España.

INTRODUCCIÓN

Las pectinas son polisacáridos estructurales de la pared celular primaria de plantas superiores, que actúan como sustancias cementantes y tienen una importante misión en el mantenimiento de la hidratación de la planta (Lau *et al.* 1985). Químicamente, estas sustancias son heteropolisacáridos complejos (Mathews y Van Holde 2000). El componente principal de todas las pectinas es el ácido galacturónico, que forma un esqueleto enlazado por uniones α -(1-4) y más o menos metoxilado según su procedencia (Keller 1983). Además de ácido galacturónico, se ha descrito que las pectinas contienen monosacáridos neutros, como ramnosa (que también formaría parte del esqueleto principal), galactosa y arabinosa en cadenas laterales. Hay que destacar que las pectinas son muy heterogéneas, ya que su composición varía según la especie de la que se obtienen, así como en función de las condiciones de extracción, ambientales (Chang *et al.* 1994) y estacionales (Retmal *et al.* 1987). El mucílago de *Opuntia humifusa* extraído y analizado por Nobel *et al.* (1992) tuvo la siguiente composición promedio de monómeros: arabinosa (42%), xilosa (22%) galactosa (21%), ácido galacturónico (8%) y ramnosa (7%).

La composición del mucílago de *Opuntia ficus-indica*, según Trachtenberg y Mayer (1981) fue galactosa (40,1%), arabinosa (24,6%), xilosa (22,2%), ácido urónico (19,5%) y ramnosa (13,1).

Los mucílagos analizados por Karl *et al.* (1975) presentaron diferentes porcentajes de

ácidos urónicos: *Wigginsia erinacea* (51%), *Cereus peruvianus* (44%), *Opuntia monocanta* y *Opuntia nopolea-coccinillifera* (25%). Estas plantas tienen las relaciones monoméricas siguientes: *Wigginsia erinacea*, ramnosa-galactosa-arabinosa (1:1,5:3,5); *Cereus peruvianus*, ramnosa-arabinosa-galactosa (1:1:2); *Opuntia monocanta* y *Opuntia nopolea-coccinillifera*, ramnosa-xilosa-galactosa-arabinosa (1:1,8:2,1:4,7).

La composición del mucílago puede variar estacionalmente, tal como fue reportado por Retmal *et al.* (1987) en el mucílago de *Opuntia ficus indica*. Los mucílagos de los cactus o cardones tienen una composición similar a los exudados de goma de las especies *Sterculia* y *Khaya*, las cuales contienen más ácido galacturónico y más ramnosa que las pectinas.

Un estudio realizado en el Valle de Quíbor, Lara-Venezuela por Villafañe *et al.* (1999) indicó que el CD es una de las especies abundantes del área y por esta razón, su explotación comercial puede ser interesante. El mucílago del Cardón Dato ha sido utilizado tradicionalmente como aditivo para purificar el agua y como acondicionador natural de suelos empobrecidos, se ha demostrado que su aplicación mejora algunas de las propiedades físicas de estos suelos. Henríquez *et al.* (2000) estudiaron el efecto del mucílago del CD sobre la floculación de partículas en suspensión, la conductividad hidráulica (CH) y la profundidad de penetración de agua en un suelo de Quíbor, concluyeron que el mucílago reducía la concentración de partículas en suspensión e incrementaba la CH y la

profundidad de penetración del agua, en relación a un testigo. La aplicación en el agua de riego del extracto del mucílago del CD favoreció la floculación de las partículas dispersas, incrementó la CH y el porcentaje de poros > 15 m en el mismo suelo de Quíbor (Henríquez y Rodríguez 2002). Esos reportes refieren que el mucílago del CD ha sido utilizado como un acondicionador natural de suelos que permite modificar algunas de las propiedades físicas y motivaron el interés de su caracterización.

En un estudio anatómico al microscopio del tallo de tres cactáceas (Sanabria y Torres 1999) se describió que el CD posee de 2 a 17 estructuras secretoras de mucílago por campo, con un diámetro de 100-300 μm . Rojas y Salazar (2004) reportaron que la pectina (en ciertos casos, sinónimo del mucílago) del CD tiene un elevado peso molecular, pero poco se conoce acerca de su composición. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los principales componentes de un extracto del mucílago de *Stenocereus griseus* (Haw.) F. Buxb, antes *Lemaireocereus griseus* (Haw.) Br. & Rose.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción del mucílago. Para la extracción del mucílago se utilizó la técnica propuesta por Henríquez (2005) y se procedió de la siguiente manera: se recolectaron 43,8 kg de CD en Quíbor, cuya área es parte de la zona semiárida del estado de Lara (700 msnm, latitud 9°55'41", longitud 69°34'40"), la cual se sitúa a unos 350 km al Oeste de Caracas. El experimento se llevó a efecto durante el año 2005, en los

laboratorios de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) y el Centro de investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid-España. Tras separar la corteza y la médula se obtuvieron unos 24 kg de parénquima acuoso que se vertieron en 48 l de agua acidulada con ácido sulfúrico (pH entre 2 y 3). La mezcla se calentó hasta 60°C, se dejó macerando durante 24 horas, tras las cuales la mayor parte del mucílago pasó a la solución ácida. La fracción de mucílago que permaneció en el parénquima acuoso sólido, tras el tratamiento con ácido, se extrajo colocando pequeñas cantidades del sólido sobre un lienzo de tela y aplicando una presión de 1-3 kg cm^{-2} . El material sólido se desechó y las dos fracciones líquidas se mezclaron, el contenido de agua de la mezcla se redujo por evaporación a 60°C. En otro recipiente se trasladaron alícuotas de 6 a 8 l del extracto acuoso filtrado, a las cuales se añadió lentamente alcohol isopropílico hasta que cesó la precipitación de mucílago, las hebras del material precipitado se recogieron con la ayuda de una varilla de vidrio. Para evitar su descomposición, el mucílago húmedo fue almacenado en frigorífico, a una temperatura entre 2 y 5°C en envases con cierre hermético.

Diálisis del material. El mucílago se dializó frente a agua desionizada (para eliminar sales y moléculas de pequeño tamaño) y se liofilizó. Posteriormente, se calculó la diferencia entre el peso seco del CD antes y después de la diálisis.

Fraccionamiento del mucílago en agua destilada. Una parte del mucílago liofilizado

(500 mg) se resuspendió en agua destilada a temperatura ambiente, el material soluble se separó del insoluble mediante centrifugación. Ambas fracciones fueron congeladas y liofilizadas para su estudio posterior.

Espectrometría infrarroja (IR). El mucílago dializado y las fracciones soluble e insoluble en agua se analizaron mediante la técnica del KBr en un espectrofotómetro Bruker IFS28.

Análisis por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN). Una muestra del polisacárido (~20 mg) se disolvió en 0,8 ml de agua deuterada (D₂O), seguido de centrifugación (10000 x g, 20 min). El sobrenadante se liofilizó, se redisolvió en D₂O (1 ml) y el proceso se repitió dos veces para un mayor intercambio por deuterio. La muestra final se disolvió en 0,7 ml de D₂O (99,98% D). En estas condiciones sólo se consigue disolver los componentes más solubles de la muestra total. Los experimentos de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y de carbono (¹³C-RMN) monodimensionales (1D) y bidimensionales (2D) se llevaron a cabo a 30°C en un espectrómetro Varian Unity (H: 500 MHz; C: 125 MHz) con una unidad de detección inversa y una de gradientes. Los experimentos de 2D-RMN (Double quantum filtered correlated spectroscopy: DQF-COSY, Totally correlated spectroscopy: TOCSY, Heteronuclear multiple quantum coherent: HMQC) se efectuaron utilizando el software Standard de Varian. Los desplazamientos químicos de protón se refieren al del agua monodeuterada (HDO) residual (a

4,71 ppm) y los de carbono al singlete de acetona interna a 31,07 ppm.

Análisis del contenido en ácidos urónicos. Se empleó el procedimiento colorimétrico descrito por Bitter y Muir (1962).

Análisis de la composición de monosacáridos. Los polisacáridos fueron hidrolizados con ácido trifluoroacético (TFA) 3M durante 1 h a 120°C, tras evaporar el ácido, los compuestos liberados se convirtieron en sus correspondientes acetatos de alditol y se analizaron mediante cromatografía gas-líquido en las condiciones descritas por Leal *et al.* (2008).

Análisis de tipos de enlace. Se determinaron los tipos de enlace predominantes en las fracciones soluble e insoluble tras su metilación mediante el método de Ciucanu y Kerek. Los polisacáridos parcialmente metilados fueron hidrolizados con TFA 3M durante 1 h a 120°C, tras evaporar el ácido, los compuestos liberados se convirtieron en sus correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados y se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en las condiciones descritas por Werning *et al.* (2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de la familia de las cactáceas se caracterizan por sintetizar mucílagos, los cuales son polisacáridos tipo pectina, altamente viscosos y con una elevada capacidad para retener agua. Según Nobel *et al.* (1992), esta propiedad parece estar relacionada con la

presencia de ácido galacturónico como componente de su esqueleto o cadena principal, hecho que ha sido documentado en los mucílagos de diversas especies de cactus (Forni *et al.* 1994, Majdoub *et al.* 2001, Habibi *et al.* 2004, Matsuhira *et al.* 2006).

A partir de 43,8 kg de CD, se extrajeron 1,43 kg de mucílago húmedo (3,2% del peso húmedo). La pérdida de peso tras la diálisis del mucílago (10,6%) indica que una parte estaba formando cadenas de pequeño tamaño que fueron eliminadas. Esto puede deberse al procedimiento empleado en este trabajo para la extracción y solubilización del mucílago, ya que el uso de una solución de ácido sulfúrico en caliente pudo producir una degradación parcial del mucílago mediante un efecto de hidrólisis suave de las cadenas de este polisacárido. En el espectro de IR del mucílago dializado se identificaron bandas a 1730 cm⁻¹ (características de grupos ácidos), a 890 cm⁻¹ (típicas de anómeros β de polisacáridos) y a 820 y 850 cm⁻¹ (características de anómeros α). Mediante métodos colorimétricos se valoró un contenido del 13% de ácidos urónicos en la muestra. El análisis de monosacáridos neutros de este material indicó que su componente más abundante es la galactosa y que hay cantidades menores de ramnosa y arabinosa (Tabla 1).

Debido a la complejidad de la muestra, se trató de fraccionar en función de la diferente solubilidad en agua de sus componentes. Mediante este método, se separó una fracción soluble en agua (40% del peso seco total) y una fracción insoluble (60%). Se analizó la composición de ambas (Tabla 1), y se observó

que tienen los mismos componentes principales aunque en diferentes proporciones. La fracción insoluble contiene mayor cantidad de galactosa, arabinosa y ácidos urónicos que la fracción soluble.

Tabla 1. Algunas características químicas y espectrofotométricas del mucílago del Cardón Dato.

Azúcares neutros (%) <i>Hidrólisis TFA 3M 1h, 120°C</i>	Producto dializado	Fracción soluble (40%)	Fracción insoluble (60%)
Ramnosa	5,1	5,7	6,0
Arabinosa	7,9	5,0	15,4
Galactosa	33,8	25,6	44,7
Ácidos urónicos (%) <i>Método del Carbazol</i>	13,9	11,4	17,1
Tipos de enlace de los azúcares neutros (%) <i>Metilación-Hidrólisis</i>	N.D.	Galp-(1-4) Galp-(1-4,6) Galp-(1-Ramp (1-2))	N.D.
Espectro de IR			
Banda a 1730 cm ⁻¹ (ácidos urónicos)	SI	SI	SI
Banda a 890 cm ⁻¹ (anómeros β)	SI	SI	SI
Bandas a 820 y 850 cm ⁻¹ (anómeros α)	SI	SI	NO
Bandas a 3400 (-OH), 1660 (H ₂ O) cm ⁻¹	SI	SI	SI

N.D. = no determinado.

El espectro de protón (¹H-RMN) de la fracción soluble (Fig. 1a) contiene un doblete anomérico a 4,64 ppm (Tabla 2), con una constante de acoplamiento de 7,6 Hz, que indica que corresponde a un azúcar de configuración β. A 4,17 ppm se encuentra una señal ligeramente ensanchada, y a campo más alto se hallan multipletes semirresueltos, entre 3,82 y 3,69 ppm (Tabla 2).

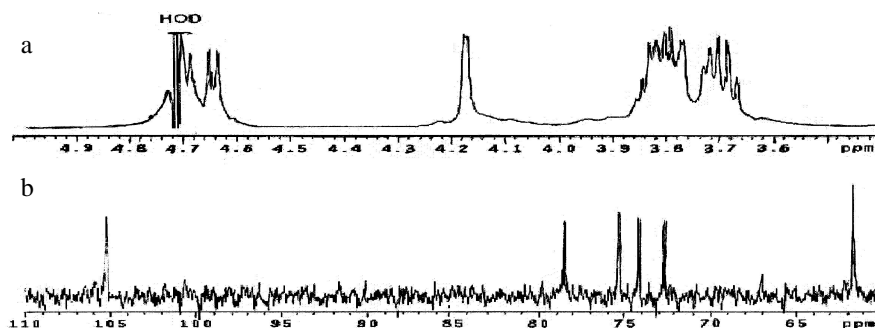


Fig 1. Espectros de la fracción solubilizada en agua a partir del mucílago de CD. a) ^1H -RMN; b) ^{13}C -RMN.

El espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 1b) contiene solamente seis singletes, de lo que se deduce que se trata de un polisacárido compuesto fundamentalmente por una unidad repetitiva de un monosacárido. Las señales principales registradas en los análisis bidimensionales (COSY, TOCSY, HMQC) indican que en la muestra existen predominantemente unidades de -(14)-galactopiranososa. Además, en la zona anomérica baja (4,9 a 5,2 ppm), aparecen pequeñas señales que, unido a lo encontrado en el análisis químico, indican la existencia de moléculas de ácido galacturónico.

El análisis de los tipos de enlace predominantes en la fracción soluble del mucílago (Tabla 1) confirmó la presencia de unidades de galactopiranososa con enlaces

glicosídicos 14. Mediante esta técnica química se pudo determinar también que una parte de estas unidades de galactopiranososa estaban ramificadas, de modo que de su posición 6 se originarían cadenas laterales cortas con ramnopiranososa unida en 12 a unidades de galactopiranososa terminal. Por otra parte, el material soluble contiene un 11,4% de ácidos urónicos.

La estructura del mucílago estudiado es propia de polímeros con al menos dos cadenas de polisacáridos, con interacciones de puentes de hidrógeno (Keller 1983), entre grupos carboxílicos $-\text{COOH}$, o entre grupos alcohólicos $-\text{CH}_2\text{OH}$, o con enlaces cruzados (Muzarelli 1973) entre un catión polivalente como el Ca^{2+} , el cual actúa como grupo central y los grupos carboxílicos del ligando de polisacáridos.

Tabla 2. Desplazamientos químicos (ppm) de las señales registradas en los espectros de protón (^1H -RMN) y carbono (^{13}C -RMN) de la fracción soluble del Cardón Dato.

	Carbono o protón						
	1	2	3	4	5	6a	6b
H	4,64	3,69	3,78	4,17	3,72	3,82	3,82
C	105,6	73,0	74,6	78,8	75,7	62,0	

REFERENCIAS

- Bitter, T. and Muir, H. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4:330-334.
- Chang, K., Dhurandhar, N., You X., and Miyamoto, A. 1994. Cultivar/Location and processing methods affect yield and quality of sunflower pectin. *Journal of Food Science*, 59: 602-605.
- Ciucanu, I. and Kerek, F. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131: 209-217.
- Forni, E., Penci, M. and Polesello, A. 1994. A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydonia oblonga-mill*) and prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) peel. *Carbohydrate Polymers*, 23: 231-234.
- Habibi, Y., Heyraud, A., Mahrouz, M. and Vignon, M. 2004. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 339: 1119-1127.
- Henríquez, M. 2005. Estudio de un acondicionador mucilaginoso extraído de *Stenocereus griseus* (Haw) F. Buxb comparado con otros acondicionadores aplicados en materiales minerales de caolín y arena. *Disertación Doctoral*. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Departamento de Edafología. Madrid, España. 124 p.
- Henríquez, M. y Rodríguez, O. 2002. Efecto de la PAM y el mucílago de cardones dato y lefaria, sobre algunas propiedades físicas de un Aridisol venezolano. *Información Tecnológica*, 13:175-181.
- Henríquez, M., Montero, F., Rodríguez, O. y Hernández, A. 2000. Efecto de diferentes suspensiones de cardón dato (*Lemaireocereus griseus*), cardón lefaria (*Cereus deficiens*), tuna española (*Opuntia ficus-indica*) y PAM sobre algunas propiedades físicas de un suelo de Quíbor-Lara. *Revista de la Facultad de Agronomía, LUZ*, 17:295-306.
- Karl, L., Sanderson, G., Moyna, P. and Ramos, G. 1975. Cactaceae mucilage composition. *Journal Science of Food and Agriculture*, 26:993-1000.
- Keller, J. 1983. Pectin. Hercules Inc., PFW. Middletown, New York. In: *Gum and Starch Technology*. Eighteenth Annual Symposium. By Downing, D. L. Western New York Section of IFT. 9 p.
- Lau, J., McNeil, M., Darvill, A. and Albersheim, P. 1985. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137: 111-125.
- Leal, J., Jiménez-Barbero, J., Bernabé, M. and Prieto, A. 2008. Structural elucidation of a cell wall fungal polysaccharide isolated from *Ustilagoideia virens*, a pathogenic fungus of *Oriza sativa* and *Zea mays*. *Carbohydrate Research*, 343: 2980-2984.
- Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Muller, G. and Grisel, M. 2001. Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46: 69-79.
- Mathews, C. y Van Holde, K. 2000. *Bioquímica*. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S. A. U. Aravaca, Madrid. Versión en Español por González, J. M. de Buitriago. Universidad de Salamanca, España. 329 p.
- Matsuhira, B., Lillo, L., Saenz, C., Urzua, C. and Zarate, O. 2006. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Polymers*, 63: 263-267.
- Muzarelli, R. 1973. *Natural chelating polymers*. Pergamon Press. 1ª edición. Oxford. 55-63 pp.
- Nobel, P., Cavalier, J. and Andrade, J. 1992. Mucilage in Cacti: its Apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue-water relations. *Journal of Experimental Botany*, 43:641-648.
- Retmal, N., Duran, J. and Fernández, J. 1987. Seasonal variations of chemical composition in prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L) Miller]. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 38:303-311.

- Rojas S., y Salazar, C. 2004. Obtención y evaluación de la efectividad del polímero natural extraído del cactus (*Cereus defficiens*) en la clarificación de aguas. Tesis de grado. Ing. Industrial. UNEXPO. Departamento de Ingeniería Química. Barquisimeto, Venezuela. 60 pp.
- Sanabria, M. y Torres, J. 1999. Anatomía del tallo de tres cactáceas (*Leimaireocereus griseus*, *Cereus defficiens* y *Opuntia ficus-indica*). Informe Técnico. UCLA. Decanato de Agronomía. Departamento de Botánica. Museo de Anatomía Vegetal. Cabudare, Venezuela. 8 p.
- Trachtenberg, S. and Mayer, A. 1981. Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Phytochemistry*, 20:2665-2668.
- Villafañe, R., Abarca, O., Azpurua, M., Ruiz, T. y Dugarte, J. 1999. Distribución espacial de la salinidad en los suelos de Quíbor y su relación con las limitaciones de drenaje y la calidad del agua. *Bioagro*, 11:43-50.
- Werning, M., Corrales, M., Prieto, A., de Palencia, P., Navas, J. and Lopez, P. 2008. Heterologous Expression of a Position 2-Substituted (1 → 3)- β -D-Glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5259-5262.