

MARLI LOURDES DE OLIVEIRA

ALGUNS ASPECTOS ESTRUTURAIS DE  
O-ACTILE-(4-O-METILGLUCURONO)  
XILANO DA **MIMOSA BRACAATINGA**

Tese de Mestrado apresentada ao Departamento  
de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

## C O N T E Ú D O

1.0 - INTRODUÇÃO . . . . .	01
2.0 - MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	05
2.1 - Métodos Gerais . . . . .	05
2.2 - Material . . . . .	08
2.3 - Preparação da Holocelulose . . . . .	08
2.4 - Determinação de Lignina . . . . .	08
2.5 - Obtenção da Hemicelulose . . . . .	09
2.6 - Identificação e Determinação Quantitativa do Gru <u>p</u> o <u>O</u> -Acetil . . . . .	09
2.7 - Oxidação da Hemicelulose com M-Periodato de Sô - dio . . . . .	10
2.8 - Determinação de grupos terminais pelo processo de Smith da Hemicelulose Original e da Hemice- lulose Desacetilada . . . . .	11
2.9 - Grau de Polimerização (DP) da Hemicelulose Origi <u>n</u> al . . . . .	12
2.10 - Metilação da Hemicelulose Original com Preserva- ção dos Grupos <u>O</u> -Acetil pelo método de Kuhn <sup>6</sup> . . . . .	13
2.11 - Metilação da Hemicelulose Original com Desaceti- lação Simultânea . . . . .	13
2.12 - Hidrólise Enzimática do Polissacarídeo . . . . .	14
2.13 - Complexação do Polissacarídeo com Iodo <sup>33-34</sup> . . . . .	15
2.14 - Localização dos Grupos <u>O</u> -Acetil através do Blo- queio das Hidroxilas Livres do Polissacarídeo pe- lo Fenilisocianato <sup>8-9</sup> . . . . .	15
3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	19
4.0 - RESUMO . . . . .	27
Figura 1 . . . . .	29
Figura 2 . . . . .	30
Figura 3 . . . . .	31
Figura 4 . . . . .	32
Tabela I . . . . .	33
Tabela II . . . . .	34
5.0 - AGRADECIMENTOS . . . . .	35
6.0 - BIBLIOGRAFIA . . . . .	36

*Tese orientada pelo Prof. Dr.*  
**JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA**

**Banca Examinadora:**

*Profº Luiz Alberto Silva Veiga*

*Profº José Hazencleve Duarte*

*Profa. Momoyo Nakano*

## 1.0 - INTRODUÇÃO

As hemiceluloses ocorrem, predominantemente, na forma acetilada, tanto nas (madeiras moles), como nas angiospermas (madeiras duras). Nas gimnospermas a hemicelulose dominante é o O-acetil-galactoglucomanano e nas angiospermas ocorre principalmente o O-acetil-(4-O-metilglucurono)xilano. A ocorrência da forma acetilada da hemicelulose ficou ignorada por longo tempo devido aos métodos de extração destes polissacarídeos. As soluções alcalinas utilizadas nas extrações proporcionavam hemiceluloses desprovidas de grupos O-acetil, em decorrência da saponificação das ligações ésteres. Outro fator limitante na extração de hemicelulose acetilada de madeiras duras é a presença de lignina entre as lamelas secundárias dos tecidos vegetais. As angiospermas das zonas temperadas apresentam maior conteúdo de xilano e menores proporções de lignina. Este comportamento se inverte nas angiospermas das zonas tropicais. A extração das hemiceluloses acetiladas portanto seria bem sucedida a partir de material convenientemente delignificado. A madeira delignificada recebe a denominação de holocelulose e há numerosos métodos de obtenção da holocelulose de vegetais; todos eles em geral, consistem em transformar a lignina em derivado clorado, solúvel em solventes orgânicos. A eliminação total de lignina, contudo leva a grandes perdas de polissacarídeo<sup>1</sup>. É evidente que agentes delignificantes usados no isolamento da holocelulose causam-lhe alterações físicas e químicas, porém, quando se realiza a cloração em água gelada, parece não haver perda substancial nos grupos O-acetil<sup>2</sup>. Gargg<sup>3</sup> mostrou que a cloração da hemicelulose seguida do subsequente tratamento com etanolamina alcoólica a quente possibilita a migração de grupo O-acetil no polímero. Muitas controvérsias tem surgido a respeito da ação despolimerizante dos agentes delignificantes. Entretanto alguns (4-O-metilglucurono)xilanos isolados da mesma madei

ra, antes e depois de delignificada pelo método de cloração direta, apresentaram o mesmo peso molecular. Após a delignificação da madeira, a holocelulose resultante encontra-se apta para a extração do polissacarídeo com solvente apropriado. O dimetilsulfóxido (DMSO) é o principal solvente orgânico usado na extração destas hemiceluloses acetiladas. Suas vantagens como meio de extração destes polissacarídeos deve-se ao fato de ser um solvente aprótico (neutro ou ligeiramente básico), o qual não afeta nem grupo O-acetil, nem ligações glicosídicas do polímero nativo. Entretanto, a extração de O-acetil-(4-O-metil-glucurono) xilanos com DMSO só é efetiva em madeiras previamente delignificadas e ainda assim o rendimento não ultrapassa a 50% do xilano nativo existente na madeira original, motivado, talvez, pela baixa capacidade de impregnação do DMSO. Os O-acetil-(4-O-metil-glucurono) xilanos, ao contrário dos (4-O-metilglucurono) xilanos, além de solúveis em DMSO, são solúveis em água e outros solventes orgânicos como formamida e N,N, dimetilformamida (DMFA). O papel dos grupos acetil na parede celular dos vegetais ainda não está completamente esclarecido. Há evidências de que os grupos O-acetil das hemiceluloses são lentamente hidrolizados no tecido vivo. Nos vegetais envelhecidos produzem ácido acético, o qual por sua vez, hidrolizaria as ligações covalentes entre as fibras. Daí a maior facilidade de separação de fibras em vegetais envelhecidos do que em jovens. Verificou-se, também, que em madeiras duras armazenadas a 48°C, em ambiente úmido, os grupos O-acetil são hidrolizados com subsequente formação de quantidade equivalente de ácido acético. Bacon, Cordon e Morris<sup>4</sup> determinaram os teores de grupos O-acetil em preparações celulares de gramíneas e de outras plantas superiores. Constataram que as quantidades de O-acetil possivelmente influem no estado físico dos polissacarídeos da parede celular e também na sua digestão por enzimas. É de particular interesse a possibilidade dos grupos O-acetil poderem diminuir a digeribilidade das paredes celulares de vegetais pelos ruminantes. A proporção e loca-

lização dos grupos O-acetil nas moléculas de xilanos foi investigada por vários pesquisadores. Bouveng<sup>5</sup> et al isolaram da holocelulose da *Betula verrucosa* e de *Betula pubescens*, com DMSO, um xilano contendo 16,9% de grupos O-acetil, equivalentes a 7,1 de grupos ésteres por 10 unidades de D-xilose. A localização dos grupos O-acetil foi realizada por metilação, aplicando o método de Kuhn<sup>6</sup>. Nestas metilações 30% dos grupos acetil foram perdidos. O resultado da metilação mostrou que os grupos O-acetil estavam unidos às unidades de D-xilose, principalmente na posição C-3, e em menor extensão na posição C-2. Timell<sup>7</sup> fez um estudo semelhante em *Betula papyrifera*, obtendo um xilano com 3,6 grupos acetil por 10 unidades de D - xilose. O polissacarídeo foi também submetido às determinações dos grupos terminais de Smith e como não se detectou ácido 4-O-metil - D - glucurônico nos produtos finais da degradação conclui-se que os grupos O-acetil não estariam esterificando hidroxilas destas unidades laterais. Os trabalhos de Garegg<sup>3</sup> indicaram, contudo, a possibilidade de migração de grupos O-acetil em meios básicos, como no processo de metilação e, também, na extração da lignina clorada com etanolamina alcoólica. Em uma tentativa de localização dos grupos O-acetil evitando sua migração, Bouveng<sup>8</sup> desenvolveu um novo método de localização dos grupos O-acetil em xilano de madeira dura, através do bloqueio dos grupos hidroxilas com fenilisocianato. O grupamento fenilcarbamato resultante, conforme fora comprovado em trabalho anterior<sup>9</sup>, não sofre migração entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>. A princípio, o O-acetil-(4-O-metilglucurono)xilano é solubilizado em DMFA e as hidroxilas livres são convertidas em éster fenilcarbamato pela reação com fenilisocianato; a seguir os grupos O-acetil são removidos por hidrólise ácida moderada e as hidroxilas resultantes são metiladas com iodo de metila e óxido de prata. Finalmente, os grupos O-fenilcarbamoilas são removidos por redução com hidreto de alumínio e lítio e a posição dos grupos O-metil no xilano parcialmente metilado é de-

terminada pelos métodos convencionais. Utilizando a holocelulose da *Betula verrucosa* extraída com DMSO, Bouveng<sup>8</sup> obteve um xilano contendo a média de 5,3 grupos O-acetil por 10 resíduos de D-xilose. O rendimento do polissacarídeo foi de apenas 5% da madeira original. Os resultados de metilação, após o tratamento da hemicelulose com fenilisocianato, foi de 58,1% de unidades de D-xilose não metilada; 11,8% de 2-O-metil-D-xilose, 24% de 3-O-metil-D-xilose e 6,1% de 2,3,di-O-metil-D-xilose. Estes resultados comprovam que os grupos O-acetil em xilanos de madeiras duras nativas estão distribuídos entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> do resíduo de xilose, com a maioria dos grupos O-acetil localizados no C<sub>3</sub>. Recentemente Corrêa et al<sup>(10)</sup> estudaram um (4-O-metilglucurono)xilano isolado do caule da *Mimosa Bracaatinga*, Hoehne uma angiosperma auborescente pertencente à família das leguminosas que se desenvolve nas zonas temperadas do sul do Brasil (São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Os estudos deste polissacarídeo demonstram a presença de unidades de D-xilopiranosose interligados através  $\beta$ -(1-4), com possibilidade de ramificação por unidades de D-xilopiranosose, com o ácido 4-O-metil-D-glucurônico ligados à cadeia principal através de  $\alpha$ -(1-3). Atualmente estudos utilizando degradação enzimática estão sendo realizados por Gebara<sup>11</sup> na tentativa de confirmar esta estrutura. No presente trabalho faz-se um estudo visando a determinação do teor e a localização dos grupos O-acetil no xilano da *Mimosa Bracaatinga* em sua forma nativa, bem como o comportamento deste polímero frente a complexação com iodo e hidrólise enzimática.

## 2.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - Métodos Gerais

A cromatografia em papel (c.p.) foi realizada em papel Whatman nº 1 e nº 4, pelo método ascendente, usando os seguintes sistemas de solventes (v/v): (a) benzeno: n-butanol: piridina: água (1:5:3:3), (b) acetato de etila: ácido acético: água (18:7:8). Os cromatogramas foram visualizadas com nitrato de prata alcalino<sup>12</sup>, cloridrato de p-anisidina<sup>13</sup> e trifeniltetrazólio<sup>14</sup>.

A cromatografia em camada delgada (t.l.c.) foi realizada em placas de sílica-gel (Merck), usando os seguintes solventes (v/v): (c) acetato de etila: éter de petróleo (P.E.30-60°C) (3:1); (d) benzeno:etanol: água: ácido acético (200:47:15:1). Os açúcares foram visualizado com ácido sulfúrico: metanol: fenol a 5% (2:7:1) seguido de posterior aquecimento a 150°C.

A cromatografia em fase gasosa (g.l.c.) foi efetuada em cromatógrafo F&M, modelo 810 R-12, com detector da ionização de chama. Para a análise dos derivados metilados foi utilizada a coluna (1): 14% p/p LAC-4R-886 sobre "chromosorb W" de 80-100 mesh (DMSC), em tubo de cobre de 100x0,4 cm (d.i.), a 155°C, utilizando nitrogênio como gás de arraste (30 ml/min), detector e câmara de injeção nas temperaturas de 250°C e 220°C, respectivamente. Os tempos relativos de retenção (T) foram calculados em relação ao metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-glucopiranosideo. Os açúcares metilados 2-O-metil-D-xilose; 2,3-di-O-metil-D-xilose, e 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose foram identificados, também, através de seus correspondentes padrões. Os cálculos das áreas dos derivados metilados foram realizados por triangulação. Na análise dos alditóis acetatos, de acordo

com Swardeker et al.<sup>15</sup>, foi empregada a coluna (2):3% de ECNSS-M sobre Gas Chrom Q de 100-120 mesh, em tubo de cobre de 120x0,2 cm (d. i.), a câmara de injeção a 220°C e o detector a 250°C com fluxo de nitrogênio de 35 ml/min.

A cromatografia em fase gasosa (g.l.c) para a análise do ácido acético foi realizada em cromatógrafo CG-27, com detector de ionização de chama, utilizando-se a seguinte coluna:20% DEGS com 1% (p/v) de ácido fosfórico, sobre diaporte, em tubo de vidro de 200x0,45 cm (d.i.), a 108°C, sendo o nitrogênio o gas de arraste (65 ml/min), com detector e câmara de injeção nas temperaturas de 220°C e 112°C, respectivamente. Os padrões utilizados foram o ácido acético e ácido fórmico.

A hidrólise total do polissacarídeo foi feita em tubo de vidro selado, com ácido trifluoracético (TFA) 0,5N a 100°C durante 5 horas. O TFA foi, após a hidrólise, eliminado por evaporação a vácuo. Para complementar a remoção de TFA novas porções de água foram adicionadas ao material hidrolisado, e removidas sucessivamente no evaporador. A hidrólise com ácido sulfúrico 1 N foi efetuada por 3 horas, a 100°C em tubo de vidro selado. Após a neutralização com carbonato de bário o hidrolisado foi centrifugado, filtrado e deionizado em resina trocadora de ions Dowex 50 W-X8, 200-400 mesh, forma H<sup>+</sup>. Os aldetois resultantes da oxidação do polissacarídeo com o periodato, redução com o boroidreto, hidrólise e nova redução com o boroidreto foram acetilados com a mistura de anidrido acético: piridina na proporção de (v/v) : 3,2:3,7, a 100°C, durante 4 horas<sup>16</sup>. Em seguida, adicionou-se água na temperatura de 0-4°C e os alditois acetilados foram extraídos com cloroformio e analisadas por g.l.c. na coluna 2.

A determinação do conteúdo de ácido urônico no po-

lissacarídeo foi feita segundo o método de Whistler e Feather<sup>17</sup>. e, o método de Bitter e Muir<sup>18</sup>. O primeiro método foi utilizado para o polissacarídeo desacetilado.

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry<sup>19</sup>. O polissacarídeo, bem como os padrões usados nas dosagens colorimétricas foram secados em aparelho de secagem a vácuo de Aberhalden. Todas as determinações foram feitas a partir do polissacarídeo assim obtido. As evaporações foram realizadas em evaporador a vácuo, à temperatura de 40°C. Os produtos de metanólise do polissacarídeo metilado foram concentrados à temperatura de 20°C - 25°C.

As absorvâncias foram feitas em aparelho COLEMAN JUNIOR, modelo 6 A.

As rotações óticas foram medidas em polarímetro PERKIN-ELMER, modelo 141, a 25°C.

As análises em infra-vermelho do polissacarídeo, em suas diversas formas, foram realizadas em aparelho PERKIN-ELMER, modelo IR-700.

Os espectros em ressonância nuclear magnética (RNM) foram realizados em um espectrômetro VARIAN, modelo XL-100, usando-se como solventes D<sub>2</sub>O/NaOD (30%) e D<sub>2</sub>O para amostras de polissacarídeo desacetilado e original, respectivamente, a 70°C, com largura de varredura de 1000 Hz e tempo de 500 segundos.

A eletroforese do polissacarídeo foi realizada em papel acetilado (cellogel), após coloração dos mesmos com azul de Procion-M-3G (Cia. Imperial de Indústrias Químicas do Brasil), segundo o método Dudman e Bishop<sup>20</sup>, em tampão borato 0,025 M pH 9,3. A e

letroforese foi realizada em aparelho FAMEN, com câmara de imersão CHEMETRON, aplicando-se uma diferença de potencial de 245V e uma corrente de 4-5 mA.

## 2.2 - Material

O caule sêco da madeira bracatinga (*Mimosa bracaatinga*) foi gentilmente cedido pelo Departamento de Engenharia e Tecnologia da Madeira, da Faculdade de Florestas da Universidade Federal do Paraná. A casca e a medula foram removidas e o caule cortado em pequenos pedaços, que foram moídos em moinho Wiley, utilizando uma peneira de 60 mesh. Para eliminar lipídeos e pigmentos a madeira moída foi extraída com uma mistura de benzeno:etanol (2:1), exaustivamente, em Soxhlet. O extrato foi desprezado e o resíduo, depois de sêco, foi extraído 5 vezes com solução de oxalato de amônio a 0,5%, a 85°C por 5 horas, filtrado em rede de nylon e lavado com água destilada. A operação foi repetida usando solução a 0,2% de EDTA. Estes dois processos foram usados a fim de extrair substâncias pécnicas.

## 2.3 - Preparação da Holocelulose

A madeira (100 g), após extração com EDTA, foi sujeita a tres tratamentos com cloro, em água a 0°C-4°C, durante 5 minutos. Ao final de cada tratamento o material foi filtrado e o resíduo lavado com alcool, a fim de retirar o excesso de cloro. Em seguida, a lignina clorada foi extraída com etanolamina alcoolica (3% v/v), durante 10 minutos, sob agitação. O material foi filtrado e submetido à extração exaustiva com alcool em Soxhlet. Através deste processo<sup>2</sup>, obteve-se cerca de 80 g de holocelulose.

## 2.4 - Determinação de Lignina

Uma amostra (1g) de holocelulose, depois de seca , com teor de umidade de 15%, foi submetida à hidrólise com 15 ml de ácido sulfúrico a 73%, em banho-maria, a 20°C, por 2 horas, com agitação. Em seguida, adicionou-se 345 ml de água destilada a fim de diluir o ácido sulfúrico para 3% e o sistema ficou em refluxo por mais 4 horas. Depois de filtrado em funil de placa porosa F, o resíduo sólido foi lavado exaustivamente com água quente para remover o ácido sulfúrico e secado em estufa (100°C-105°C), até peso constante.

## 2.5 - Obtenção da Hemicelulose

A holocelulose (100 g) foi tratada com DMSO<sup>21</sup> (1,5l) em shaker a 28°C, durante uma semana. Em seguida o resíduo foi filtrado em funil de placa porosa. O filtrado foi colocado em etanol (3v) e o precipitado (hemicelulose) foi dializado 48 h e reprecipitado com etanol. Após centrifugação, a hemicelulose foi submetida a três tratamentos desproteinizantes pelo método Sevag<sup>22</sup>. À solução aquosa foi adicionado etanol (3v), recuperando-se a hemicelulose por centrifugação que foi secada a vácuo sob P205, para dar um pó cinzento (3,7g), solúvel em água e em DMSO.

Uma amostra da hemicelulose (5mg) foi hidrolizada com TFA, analisada por cromatografia em papel no solvente (a) e por g.l.c. na forma de alditóis acetilados na coluna 2.

## 2.6 - Identificação e Determinação Quantitativa do Grupo O-Acetil

A presença do grupo acetil foi indicada pelos espectros no infra-vermelho e ressonância nuclear magnética (RNM) de amostras do polissacarídeo original e na forma desacetilada. A determinação quantitativa do grupo O-acetil foi efetuada por dois métodos

todos:

a) Método colorimétrico de McComb e McCready<sup>23</sup>: baseado na formação de um complexo colorido de um ácido hidroxâmico acílico e ions férricos.

b) Método da Saponificação: o polissacarídeo (solução a 0,1%) foi desacetilado por saponificação durante 1h, em atmosfera de nitrogênio, com hidróxido de sódio 0,1 N, à temperatura ambiente. O polissacarídeo foi, em seguida, precipitado com etanol, filtrado e lavado com etanol. O filtrado mais os líquidos de lavagem reunidos foram concentrados a vácuo para remoção do etanol. A solução aquosa foi, em seguida, aplicada no topo de uma coluna de resina Dowex-50-X-8 (200-400 mesh) forma H<sup>+</sup>, para remoção de ions de sódio. O eluato foi titulado em potenciômetro, contra hidróxido de sódio 0,1 N, usando-se simultaneamente fenolftaleína como indicador. Uma prova em branco foi realizada em paralelo. O conteúdo de acetyl na amostra foi calculado pela seguinte relação:

$$\% \text{ Acetil} = \frac{4,3 \times \text{Normalidade} \times \text{volume de NaOH líquido (ml)}}{\text{peso da amostra em gramas}}$$

A identificação do ácido esterificante foi, também, confirmada pela análise em g.l.c.. O polissacarídeo obtido da hidrólise alcalina foi utilizado em outros experimentos como "hemicelulose desacetilada".

## 2.7 - Oxidação da Hemicelulose com M - Periodato de Sódio

A hemicelulose original (67,4 mg de polissacarídeo) foi dissolvida em solução de m-periodato de sódio 0,05 M<sup>24</sup> (100 ml) e a reação foi mantida a 4°C, na obscuridade, durante 120 horas. U

ma prova em branco foi realizada simultaneamente. A intervalos de tempos regulares (3,8,24,72,96,120 horas), alíquotas de 1 ml foram retiradas da solução oxidante e do branco. O consumo de periodato foi determinado pelo método do tiosulfato de sódio<sup>25</sup>, utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{Molaridade solução oxidante} = \frac{(B-A) \times N}{2 \times \text{ml alíquota}}$$

$$\frac{\text{moles de periodato}}{\text{moles de pentose anidra}} = \frac{\text{vol. total da solução oxidante} \times 141^*}{\text{gramas de polissacarídeo} \times 1000}$$

onde B = ml de tiosulfato gastos na titulação do branco

A = ml de tiosulfato gastos na titulação da amostra

N = normalidade do tiosulfato

\*Calculado na base de 16% de ácido urônico no polissacarídeo.

O valor do consumo de periodato foi obtido pela extrapolação da curva e expresso em moles de periodato/mol de pentose anidra, como indica a figura 1.

A hemicelulose desacetilada (10,2 mg) foi oxidada com m-periodato de sódio 0,05 (15 ml), à temperatura ambiente, durante 90 horas, na obscuridade. Um branco foi realizado simultaneamente. Alíquotas de 0,5 ml foram retiradas da solução oxidante e do branco a intervalos de tempo regulares (4,18,43,67,90 horas). O consumo de periodato foi determinado pelo método acima citado. O valor do consumo de oxidante foi obtido pela extrapolação da curva, conforme indica a figura 1.

## 2.8 - Determinação de grupos terminais pelo processo de Smith da Hemicelulose Original e da Hemicelulose Desacetilada

A hemicelulose original (67,4 mg) foi oxidada com solução de m-periodato de sódio 0,05M (100 ml), a 49C na obscuridade. Após 120 horas de oxidação, a reação foi interrompida pela adição de etileno glicol. A solução do polialdeído resultante foi dialisada contra água corrente, durante 48 horas. Em seguida, adicionou-se boroidreto de sódio (50 mg) à solução de polialdeído. A redução processou-se por 12 horas a temperatura ambiente e o excesso de boroidreto foi decomposto com ácido acético 2N. A solução foi novamente dialisada, concentrada a vácuo até secura e o resíduo resultante foi hidrolisado com ácido sulfúrico 1N (métodos gerais). Uma parte do hidrolisado foi analisada por cromatografia em papel Whatman nº 1 no solvente (a). Outra parte foi novamente reduzida com boroidreto de sódio (50 mg) por 12 horas, deionizada em resina Dowex 50W-X8 (200-400 mesh) forma H<sup>+</sup>, e desboratada por sucessivas evaporações com metanol. Os alditois resultantes foram acetilados com anidrido acético: piridina (métodos gerais) e posteriormente analisados por g.l.c. na coluna 2.

A solução (15 ml) de hemicelulose desacetilada (10,2 mg) foi oxidada durante 90 h com m-periodato de sódio 0,05 M a temperatura ambiente, na obscuridade. Após interrupção da oxidação com etileno glicol, a solução de polialdeído foi dialisada e submetida aos mesmos tratamentos descritos acima para a hemicelulose original.

## 2.9 - Grau de Polimerização (DP) da Hemicelulose Original

O cálculo do grau de polimerização do polissacárido foi realizado pela determinação dos grupos terminais redutores, de acordo com Hay et al.

## 2.10 - Metilação da Hemicelulose Original com Preservação dos Grupos O-Acetil pelo Método de Kuhn<sup>6</sup>

A hemicelulose original (128 mg) foi dissolvida em dimetilformamida (DMFA) (20 ml). Iodeto de metila (1 ml) e óxido de prata (500 mg) foram adicionados em pequenas porções durante um período de 5 h e a solução foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente durante 24 h. Outras porções de óxido de prata (500 mg) e iodeto de metila (1 ml) foram novamente adicionados como anteriormente e após mais 24 h de agitação o polissacarídeo foi extraído com clorofórmio e centrifugado. O resíduo foi lavado com clorofórmio e os extratos combinados foram tratados com uma corrente de gás sulfídrico para precipitar a prata coloidal. A solução de polissacarídeo metilado em clorofórmio foi colocada em éter d- petróleo (P.E.30-60º) precipitando uma fração polissacarídica que foi recuperada por centrifugação. Após lavagem com éter o polissacarídeo foi secado e mantido sob  $P_2O_5$ . Analisado no I.V. mostrava, ainda, absorção na região de 3600 cm.

## 2.11 - Metilação da Hemicelulose Original com Desacetilação Simultânea

Outra amostra da hemicelulose original (200 mg) foi, inicialmente metilada pelo método de Haworth<sup>27</sup> com simultânea desacetilação, usando NaOH 40% (10 ml) e dimetilsulfato (5 ml), em agitação por 6 horas. A solução foi neutralizada com ácido sulfúrico 6N e então dialisada. Após a diálise a solução foi concentrada a vácuo e o resíduo secado sob  $P_2O_5$ . O material seco foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) redestilado (10 ml) e metilado conforme Sanford e Conrad<sup>28</sup>. O anion dimetilsulfonil 0,7 N (7 ml) foi adicionado em presença de nitrogênio. A reação foi procedida por 12 horas.

Em seguida, adicionou-se 1 ml de iodeto de metila, com o material em banho de gelo. Após 30 minutos de agitação a solução tornou-se clara e o material foi dialisado. Após liofilização o resíduo foi colocado sob  $P_2O_5$ . O polissacarídeo parcialmente metilado foi posteriormente, permitilado com iodeto de metila e óxido de prata.<sup>29</sup> Os sais de prata foram precipitados pela adição de éter de petróleo gota a gota, à solução cloroformica do polissacarídeo metilado e removidos por centrifugação. Ao sobrenadante, adicionou-se mais éter de petróleo até precipitação do polissacarídeo. Ao final do tratamento o polissacarídeo apresentou apenas vestígios de absorção na região de  $3550\text{ cm}^{-1}$  do espectro de infra-vermelho, e foi considerado apto para análise posterior.

Uma amostra de hemicelulose metilada foi metanolizada<sup>30</sup> com metanol contendo cloreto de hidrogênio (5%), durante 6,5 horas a  $100^\circ\text{C}$ . A mistura reativa foi neutralizada com carbonato de prata e centrifugado. O sobrenadante foi tratado com corrente de gás sulfídrico para precipitar a prata coloidal, novamente centrifugado e analisado por g.l.c. na coluna 1.

## 2.12 - Hidrólise Enzimática do Polissacarídeo

A hemicelulose original foi incubada com uma preparação de xilanase de *P. circinatus*<sup>11</sup> nas seguintes proporções: 2 ml de polissacarídeo (5,0 mg/ml em  $H_2O$ ), 0,4 ml de tampão acetato 0,5 M, pH 5; 0,4 ml de preparação enzimática (1,4 mg/ml), adicionando-se água até completar o volume de 4 ml. O sistema de incubação foi mantido a  $37^\circ\text{C}$  e alíquotas de 0,1 ml foram retiradas de hora em hora (durante 12 horas) para serem dosadas pelo método de Somogyi-Nelson<sup>31-32</sup>. Paralelamente, alíquotas de 0,1 ml foram retiradas do sistema a fim de serem analisadas por cromatografia em papel, usando

o sistema de solvente b. A curva de hidrólise e o cromatograma encontram-se na figura 2.

### 2.13 - Complexação do Polissacarídeo com Iodo<sup>33-34</sup>

Amostras (10 mg) da hemicelulose original (hemicelulose acetilada), da hemicelulose desacetilada por saponificação com NaOH (Cf.2:4-b) e da hemicelulose A de *M. Bracatinga* usada como referência foram convenientemente dissolvidas, primeira com água e as outras duas, inicialmente, com solução de NaOH 1 N e posteriormente neutralizadas com HCl 1N. Os volumes das soluções foram aferidos para 10 ml. Alíquotas de 0,1 ml a 0,7 ml foram pipetadas das soluções polissacarídicas, completando-se o volume para 10 ml com solução de cloreto de cálcio 3,7 M, contendo 0,05% de iodo e 0,21% de iodeto de potássio. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as absorbâncias das soluções foram lidas em 610 nm, contra um branco preparado simultaneamente nas mesmas condições. Os gráficos foram traçados em função da absorbância versus concentração crescente de polissacarídeo, conforme indica a figura 3.

### 2.14 - Localização dos Grupos O-Acetil através do Bloqueio das Hidroxilas Livres do Polissacarídeo pelo Fenilisocianato<sup>8-9</sup>

A hemicelulose original foi submetida a uma série de tratamento com a finalidade de localização dos grupos acetil, cuja sequência de reações encontra-se indicada na figura 4. Estas reações compreendem as seguintes etapas:

#### a) Tratamento da hemicelulose com fenilisocianato:

A hemicelulose original (68 mg) foi dissolvida em DMFA (2,5 ml). Adicionou-se, em seguida, o fenilisocianato (0,25ml)

e a mistura reagente foi mantida à 100°C, durante 3 horas. Após este período, a mistura reagente foi adicionada a etanol (3 vol), obtendo-se um precipitado que foi separado por intermédio de um funil de placa porosa. O resíduo foi lavado com etanol e depois com éter, e, finalmente, secado sob  $P_2O_5$ . Estas operações foram repetidas por mais duas vezes. Obteve-se no final destes processos cerca de 132 mg de derivado fenilcarbamato do O-acetil-(4-O-metilglucurono) xilano.

**b) Conversão dos grupos fenilcarbamoilas em N-metil fenilcarbamoilas:**

O derivado fenilcarbamato do O-acetil-(4-O-metilglucurono)xilano (99,7 mg) foi dissolvido em DMFA (5 ml) e iodeto de metila (0,2 ml) e óxido de prata (200 mg) foram adicionados. A mistura reativa foi agitada a temperatura ambiente, na obscuridade, durante 40 horas. Após este período a mistura metilante foi centrifugada e os resíduos lavados com DMFA. Os sobrenadantes foram reunidos e colocados em etanol (100 ml) contendo cianeto de potássio dissolvido em pequena quantidade de água (a finalidade do cianeto era dissolver o sal de prata residual da metilação). O precipitado resultante da adição etanólica foi separado por intermédio de funil de placa porosa, lavado com etanol e depois com éter.

**c) Desacetilação**

O produto, N-metil-fenilcarbamoila do O-acetil-(4-O metilglucurono)xilano (99 mg) foi dissolvido em tetraidrofurano (3 ml) contendo ácido sulfúrico (0,2 ml de ácido sulfúrico 33%). Após 20 horas à temperatura ambiente, a solução reativa foi adicionada a etanol (3 vol). O precipitado obtido foi separado por centrifugação, lavado com etanol e depois com éter. O processo foi repetido por

mais uma vez. Obteve-se, no final desta operação, cerca de 73,4 mg do derivado N-metil-fenilcarbamoila do (4-O-metilglucurono)xilano de acetilado.

#### **d) Metilação**

O material desacetilado foi metilado com iodeto de metila (0,2 ml) e óxido de prata (200 mg) em dimetilformamida<sup>6</sup> (5ml) durante 40 horas. Após centrifugação para remoção do óxido de prata residual, o sobrenadante foi colocado em etanol contendo cianeto de potássio. O precipitado resultante foi filtrado, lavado com etanol depois com éter e, finalmente, secado sob  $P_2O_5$ .

Os processos relativos as etapas (c) e (d) foram repetidos por mais duas vezes. Foram obtidos, finalmente, cerca de 23 mg do derivado metilado do N-metil-fenilcarbamoila do (4-O-metilglucurono)xilano.

#### **e) Redução com hidreto de alumínio e lítio dos grupos N-metil-fenilcarbamoilas:**

O derivado metilado do N-metil-fenilcarbamoila do (4-O-metilglucurono) xilano (14 mg, foi misturado com tetraidrofuran (5 ml) e aquecido suavemente em um balão equipado com condensador de refluxo e agitador magnético. Em seguida, hidreto de alumínio e lítio foi adicionado (40 mg) em quatro porções de 10 mg. A mistura reagente foi agitada moderadamente a temperatura ambiente durante 16 horas. Após este período a mistura foi refluxada por uma hora para garantir uma reação e neutralizada com ácido fosfórico diluído (os sais de fósforos são de baixa solubilidade em água e precipitam), Em seguida, a mistura foi filtrada e os resíduos lavados com água fria. Os filtrados reunidos foram dialisados contra água

corrente por 24 horas, concentrados por evaporação à vácuo e o resí-  
duo da evaporação foi secado sob  $P_2O_5$ . Obteve-se cerca de 0,72mg de  
(4-O-metilglucurono)xilano metilado.

**f) Metanolise do (4-O-metilglucurono)xilano parcial-  
mente metilado:**

O derivado acima, (4-O-metilglucurono)xilano foi me-  
tanolisado com metanol contendo cloreto de hidrogênio (5%), durante  
6,5 horas a 100°C. A mistura reativa foi neutralizada com carbonato  
de prata e centrifugada. O sobrenadante, após remoção da prata co-  
loidal, foi analisado por g.l.c. na coluna 1, conforme indica a ta-  
bela II.

### 3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O caule da *M. Bracaatinga* moído foi, inicialmente, submetido a extração com a mistura de benzeno-etanol (2:1), com a finalidade de remoção de pigmentos e lipídeos. A subsequente extração com oxalato de amônio a 0,5% e EDTA a 0,2% foi realizada para remover substâncias pécnicas. Em seguida, a madeira foi tratada com cloro e etanolamina a 3% em etanol absoluto com o objetivo de remover parcialmente a lignina. No processo de delignificação o cloro reage com lignina formando clorolignina, composto solúvel em etanolamina alcoólica. A extração da hemicelulose com DMSO resultou na hemicelulose acetilada com 3,65% de proteína, que foi removida por três tratamentos desproteinizantes posteriores pelo método de SEVAG<sup>22</sup>. A hemicelulose desproteinizada, dialisada e seca rendeu 3,7%. O rendimento foi muito baixo em relação aos obtidos por BOUVENG et al<sup>5</sup> (15,8%), por TIMELL<sup>7</sup> (19,4%) e por BOUVENG<sup>7</sup> (6,1%), a partir de outras fontes. Uma explicação para o baixo rendimento seria a extratibilidade deficiente conseguida para a lignina, cujo teor inicial era de cerca de 25% na madeira e que após os três tratamentos de lignificantes diminuiu apenas em 5%. Por outro lado, a natureza estrutural da hemicelulose está sujeita a alterações químicas e físicas, causadas pelo processo de delignificação, tais como perda e migração do grupo acetil, ou mesmo oxidação. Portanto, para o presente estudo o rendimento em hemicelulose não foi levado em consideração e sim a preservação de suas características originais.

A hemicelulose apresentou comportamento homogêneo frente à eletroforese em papel acetilado, em tampão borato pH 9,3.

No hidrolisado ácido (TFA) da hemicelulose detectou-se xilose e ácido urônico, por cromatografia em papel. A cromatografia por g.l.c. do hidrolisado na forma de alditóis acetilados apre-

sentou alta proporção de xilitol e vestígios de substâncias não identificadas. A dosagem da hemicelulose pelo fenol-ácido sulfúrico apresentou 68% de carboidrato total.

A rotação ótica do polissacarídeo  $\alpha_D^{25} - 62^\circ$  (c. 1%, água) foi compatível com os encontrados por BOUVENG et al  $\alpha_D^{25} - 69^\circ$  e por TIMELL  $\alpha_D^{25} - 86^\circ$  para os O-acetil-(4-O-metilglucurono) xilanos isolados da hemicelulose da *Betula ferrucosa*, *B. pubescens* e *B. papyrifera*.

O polissacarídeo apresentou solubilidade em dimetilformamida, dimetilsulfóxido e água. As soluções apresentaram coloração amarelada, talvez devido a presença de lignina (1,4%), a qual foi evidenciada qualitativamente pelo método da floroglucina<sup>35</sup>. A solubilidade em água é explicada pela presença dos grupos acetil, os quais impedem o alinhamento das cadeias moleculares e consequentemente a formação de pontes de hidrogênio internas. De fato, o polissacarídeo torna-se insolúvel quando desacetilado por hidrólise alcalina.

Os grupos O-acetil foram detectados por espectroscopia no infra-vermelho, com absorção em  $1240\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a estes grupos e absorção em  $1740\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à carbonila do éster acetato. A hemicelulose, após a desacetilação, não apresentava absorção nos referidos comprimentos de onda. A cromatografia em fase gasosa dos produtos de saponificação e posterior deionização mostrou que o ácido presente era o ácido acético ( $R_T = 3,9$ ) e de ácido fórmico ( $R_T = 3,35$ ). Os espectros de R.N.M. da solução de polissacarídeo original ( $D_2O$ ) mostrou absorção em  $\tau, 7,8$ , característica de grupos acetil, ao passo que o material desacetilado apresentou ausência desta absorção.

A titulação do ácido acético resultante da saponificação da hemicelulose original indicou a presença de 12-14 % de grupos O-acetil na amostra, a qual foi confirmada pelo método colorimétrico através da formação do complexo do ácido hidroxâmico e ions -fêrricos, pela reação com hidroxilamina alcalina. Na hemicelulose de *B. papyrifera* TIMELL<sup>7</sup> encontrou 9,3% de grupos O-acetil, enquanto BOUVENG et al<sup>5</sup>, estudando a hemicelulose extraída da mistura de *B. verrucosa* e *B. pubescens*, encontraram um teor de 16,9% de grupos O-acetil para este polissacarídeo. Posteriormente, BOUVENG<sup>8</sup>, analisando a hemicelulose extraída apenas de *B. verrucosa*, verificou que ela continha 13,2% de grupos O-acetil. Como se pode notar, os teores de grupos acetil determinados para hemiceluloses originalmente-acetiladas de diferentes fontes variam consideravelmente.

Através da cromatografia em papel dos produtos de hidrólise da hemicelulose original foi identificada, além da xilose o ácido urônico (10,9% na amostra), pelo método do carbazol. Após a desacetilação do polissacarídeo a percentagem de ácido urônico aumentou para 13,9% (método da titulação). O valor encontrado por BOUVENG et al<sup>5</sup> foi de 11,8% de ácido urônico na hemicelulose acetilada da mistura de *B. verrucosa* e *B. pubescens* e TIMELL<sup>7</sup> encontrou o valor de 9,8% para *B. papyrifera*. CORRÊA et al<sup>10</sup> haviam encontrado o valor de de 11,6% (pelo método da titulação) para o ácido urônico - da hemicelulose A da *M. bracaatinga* extraída com NaOH a 24%.

O consumo de periodato foi determinado na hemicelulose original (acetilada) e na hemicelulose desacetilada por saponificação (figura 1). Após extrapolação para o tempo zero, a hemicelulose original (acetilada) apresentou um consumo de 0,34 moles de periodato por mol de pentose anidra, com a oxidação efetuada a 49 C. Quando esta oxidação foi efetuada à temperatura ambiente (22-25°C), o consumo de oxidante foi de 0,62 mol de periodato por mol de pento

se anidra. Por outro lado, a hemicelulose desacetilada consumiu - 1,04 moles de periodato por mol de pentose anidra, com a oxidação - realizada à temperatura ambiente (22-25°C). A diferença de consumo de periodato para a hemicelulose original, respectivamente à temperatura ambiente e a 4°C, pode ser atribuída à solubilidade do polisacarídeo em água, permitindo sua rápida oxidação, dando reações inespecíficas. Outra explicação é a possibilidade de que a 4°C a oxidação não foi completa, pelo fato dos xilanos formarem agregados moleculares, dificultando a penetração dos ions periodato.

Na análise dos grupos terminais pelo processo de - Smith da hemicelulose original determinou-se glicerol (11%) e xilitol (89%), analisados por g.l.c. na forma de alditois acetilados. A elevada proporção de xilitol esta de acordo com os dados de consumo de periodato (0,34) encontrado para a hemicelulose original. Ela indica que 89% dos resíduos de D-xilose não foram oxidados por estarem bloqueados por grupos O-acetil, por resíduos laterais de ácido metil-D-glucurônico, ou mesmo por ramificações. Poder-se-ia pensar que a oxidação não foi completa à temperatura de 4°C. Esta possibilidade, no entanto, não é compatível com as proporções de glicerol (12%) e xilitol (88%), encontradas para a oxidação com periodato à temperatura ambiente, a qual ainda apresentou compostos não identificados, fato não observado na oxidação a 4°C. A percentagem de glicerol (11%) é atribuída a resíduos de D-xilose não ligados a grupos O-acetil, ácido metil D-glucurônico ou ramificações. Na determinação dos grupos terminais pelo processo de Smith da hemicelulose A. CORRÊA et al<sup>10</sup> encontraram 79,54% de glicerol e 12,35% de xilitol, além de outros produtos não identificados.

Através da determinação dos grupos terminais redutores, encontrou-se um grau médio de polimerização de 283 para a hemicelulose original.

A localização dos grupos O-acetil foi estudada, inicialmente, por dados de metilação. Após duas metilações sucessivas pelo método de KUHN<sup>6</sup> o polissacarídeo apresentou 2,3-di-O-metil-D-xilose (++++), 2,3,4-tri-O-metil-D-glucuronato de metila (+), 3-O-metil-D-xilose (++++), e 2-O-metil-D-xilose (++++), (tabela I). Deve-se levar em consideração, nestes resultados, que o polissacarídeo não foi metilado completamente, apresentando forte absorção na frequência de 3700-3200 cm<sup>1</sup> do infra-vermelho. Entretanto, não foram feitas outras metilações a fim de evitar perdas consideráveis e migrações de grupos O-acetil<sup>5,7</sup>. Além dos de 2,3,4-tri-O-metil-D-glucuronato de metila, não foi obtido nenhum outro resíduo de ácido de 4-O-metil-D-glucurônico, o qual leva a concluir que grupos O-acetil provavelmente não estejam esterificando hidroxilas do ácido. Isto foi confirmado pela completa oxidação da hemicelulose original com o periodato, seguido por redução e hidrólise. A cromatografia em papel do hidrolisado mostrou D-xilose como único açúcar presente. A ausência de 2,3,4-tri-O-metil-D-xilosídeo no metanolisado indica que os resíduos terminais não redutores de xilose carregam grupos O-acetil.

A presença de 2-O-metil-D-xilósideo na hemicelulose original desacetilada (tabela I), indica que os resíduos de ácido 4-O-metil-D-glucurônico se ligam a posição C-3 da D-xilose da cadeia de xilano do polissacarídeo, igual, portanto, à hemicelulose A de *M. Bracaatinga* estudada por Corrêa et al<sup>10</sup>.

Em outra tentativa de localização dos grupos O-acetil no polissacarídeo original aplicou-se o método desenvolvido por BOUVENG<sup>8,9</sup>, no qual o polissacarídeo é transformado no derivado fenilcarbamato pela reação dos grupos hidroxilas com o fenilisocianato, conforme a sequência de reações indicadas na figura 4. A análise dos produtos destas reações por g.l.c. apresentou os seguintes -

derivados metílicos: 2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranosiluronato de metila (+), 2,3-di-O-metil-D-xilopiranosídeo (+++), 2-O-metil-D-xilopiranosídeo (+++), 3-O-metil-D-xilopiranosídeo (+++) e compostos não identificados (++++) (Tabela II). Estes dados indicam que as posições C-3, C-2 e ambas C-2 e C-3 da D-xilose na hemicelulose original, encontram-se substituídas por grupos O-acetil, na relação de 1:1. Indicam, também, contraditoriamente, que os resíduos de ácido urônico contêm grupos O-acetil a eles ligados.

BOUVENG<sup>8</sup>, em uma série de reações semelhantes com a hemicelulose de *B. verrucosa* obteve a relação de 3,9:1,9:1 para as substituições por grupos O-acetil nas mesmas posições, indicando que estes grupos estariam ligados, principalmente, às posições C-3 da xilose.

A elevada proporção de 2,3-di-O-metil-D-xilopiranosídeo e a presença do ácido 2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranosiluronato de metila, leva a concluir que não houve completo bloqueio das hidroxilas livres pelos grupamentos fenilisocianato, possivelmente devido ao aglomerado molecular do xilano, apesar de terem sido feitas três reações com o fenilisocianato. O derivado fenilcarbamato apresentou rotação ótica  $\alpha_D^{20} -93^\circ$  (C. 1% em DMFA), com aumento de peso de 80% em relação à amostra original. Semelhantes características e propriedades foram encontradas no derivado fenilcarbamato da hemicelulose de *B. verrucosa*, obtido por BOUVENG<sup>8</sup>, tais como coloração amarelada, solubilidade em DMSO e em DMFA, rotação ótica  $\alpha_D^{20} -92^\circ$  e aumento de peso de 95% em relação à amostra original.

A hemicelulose original (acetilada) foi submetida a ação de hemicelulose de *P. circinatus*<sup>11</sup>. Conforme indicam os resultados da figura 2, os grupos O-acetil não impediram a ação das hidrolases, pois o diagrama de liberação de açúcar redutor e a análise

se dos produtos de hidrólise por cromatografia em papel indicaram a presença de D-xilose e oligossacarídeos. Como o polissacarídeo foi incubado com extrato bruto dialisado de hemiceluloses de *P. circinatus*, é provável que a preparação enzimática contivesse, também, enzimas capazes de hidrolisar os grupos O-acetil (esterases).

GAILLARD<sup>36,37</sup> e GAILLARD et al<sup>38,39</sup>, também WENZEL e CORRÊA<sup>40</sup> mostraram que muitos polissacarídeos lineares apresentam a capacidade de formar complexos de cor azul com iodo (cor devida aos ions  $3I_2 - 2I^-$ )<sup>41</sup> quando dissolvidos em soluções de cloreto de cálcio, embora não apresentem a mesma propriedade em soluções isentas de sal. Limitado grau de ramificação no polissacarídeo não é impedimento para a formação de complexos coloridos de azul. A natureza dos resíduos de açúcar que constituem a cadeia principal do polissacarídeo linear também não é decisiva na complexação com iodo. Encontram-se polissacarídeos lineares constituídos de D-glucose, D-manose e D-xilose que dão reação positiva com iodo. O que, porém, é essencial na formação do complexo azul é que estes resíduos estejam interligados através de ligações glicosídicas do tipo (1-4) e que possuam configuração semelhante em torno do C-4, como ocorre na D-xilose, D-manose e D-glucose.<sup>39</sup>

Mesmo que se saiba que um polissacarídeo possua outros tipos de ligações glicosídicas, a formação de um precipitado pela adição de iodo é um forte indício da presença de sequências de ligações glicosídicas do tipo (1-4). Além do mais, para haver uma reação positiva com iodo, é necessário a existência de uma espira formada de pelo menos seis unidades de açúcar interligados através de (1-4), quer na cadeia principal quer numa ramificação<sup>39</sup>.

Tendo em vista estes fatos, foi averiguado o comportamento dos grupos O-acetil da hemicelulose original frente a com-

plexação com iodo, como mostra a figura 3. Constatou-se que a variação da absorbância a 610 nm em soluções de concentração crescente de polissacarídeo, mantendo-se fixo o título dos outros reagentes, obedece à lei de LAMBERT e BEER. As representações gráficas da hemicelulose original desacetilada por saponificação e da hemicelulose A de *M. bracaatinga* são praticamente os mesmos. A hemicelulose original, todavia, não formou, praticamente, o complexo iodo-polissacarídeo. Este comportamento pode ser atribuído à presença de grupo O-acetil substituintes na hemicelulose original, pois após a desacetilação o polissacarídeo apresentou comportamento semelhante a hemicelulose A, complexando-se com o iodo. Desde que se admite que o complexo azul resulta de uma interação dipolar entre grupos hidroxilas, iodo, ions iodeto e possivelmente ions cálcio e que as ligações  $\beta$ -D-(1-4) do polissacarídeo encontram-se arranjadas em uma configuração em forma de hélice<sup>33</sup>, pode-se supor que os grupos O-acetil na hemicelulose original atuem como grupos volumosos, dificultando por impedimento estérico a formação da configuração do helicoidal, impossibilitando, assim, a formação do complexo polissacarídeo - iodo em maior extensão. Outra explicação seria a simples ocupação das OH pelos grupos acetil, impedindo a formação do complexo.

#### 4.0 - RESUMO

1 - Um O-acetil-(4-O-metilglucurono)xilano, denominada hemicelulose original, com rotação ótica  $\alpha_D^{25} - 62^\circ$  (c. 1%, água) foi extraído com dimetilsulfóxido da holocelulose do caule da *M. bracaatinga*. O polissacarídeo apresentou a relação D-xilose: O-acetil: ácido glucurônico de 49:44% moles%.

2 - A oxidação com periodato e a análise dos grupos terminais pelo processo de Smith da hemicelulose original indicaram que as unidades do ácido urônico não carregam grupos O-acetil.

3 - Os estudos de metilação da hemicelulose original, com desacetilação simultânea, indicaram que os resíduos de ácido urônico estão localizados na posição C-3 dos resíduos de D-xilose do polissacarídeo, fato que leva a concluir que na *M. bracaatinga* a hemicelulose original extraída com dimetilsulfóxido e a hemicelulose A extraída com NaOH (Corrêa et al<sup>10</sup>) são polissacarídeos semelhantes. Estes estudos indicam, também, que os resíduos terminais não redutores de D-xilose carregam grupos O-acetil.

4 - Através das seqüências de reações envolvendo a formação do derivado fenilcarbamato, seguida da metilação e análise por g.l.c. dos produtos de metanólise, obteve-se os metilglicosídeos, 2,3-di-O-metil-D-xilopiranosídeo, 3-O-metil-D-xilopiranosídeo e 2-O-metil-D-xilopiranosídeo, indicando que as ligações dos grupos O-acetil a xilose encontram-se, provavelmente, em C-3, C-2 e ambos C-2 e C-3, numa relação aproximada de 1:1:1.

5 - A hemicelulose original (acetilada) ao ser tratada com preparação enzimática de *Polyporus circinatus* (hemicelula-

ses) foi hidrolizada, indicando que os grupos O-acetil não impediram a ação destas hidrolases sobre o polissacarídeo.

6 - A hemicelulose original não formou complexo com o iodo, porém ao ser desacetilada por saponificação formou facilmente este complexo com absorção máxima em 610 nm. Isto demonstra que o grupo O-acetil é fator limitante desta complexação, provavelmente dificultando a formação da configuração helicoidal do polissacarídeo, por impedimento estérico, ou por simples ocupação das OH necessárias para a formação do complexo.

Moles de periodato/mol de pentose anidra

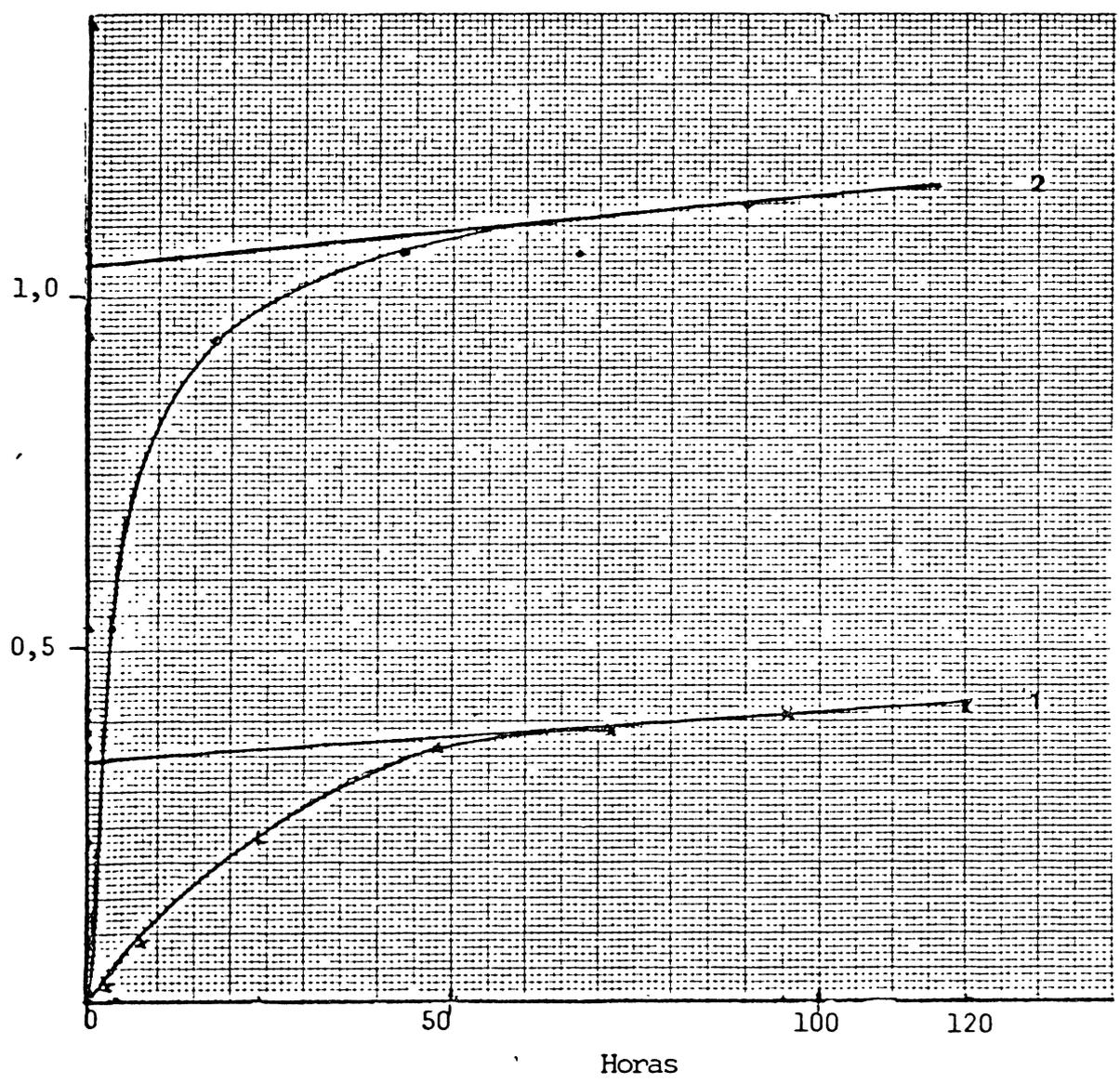


Figura 1 - Determinação do consumo de periodato da hemicelulose original (curva 1) e da hemicelulose desacetilada (curva 2) por saponificação com NaOH. Os polissacarídeos estavam na concentração de 0,068 g/% e foram oxidados com solução de m-periodato de sódio 0,05 M. A hemicelulose original foi desacetilada à temperatura ambiente. Aliquotas foram retiradas das respectivas soluções, para a determinação do periodato pelo método do tiosulfato; os valores obtidos foram extrapolados para o tempo zero.

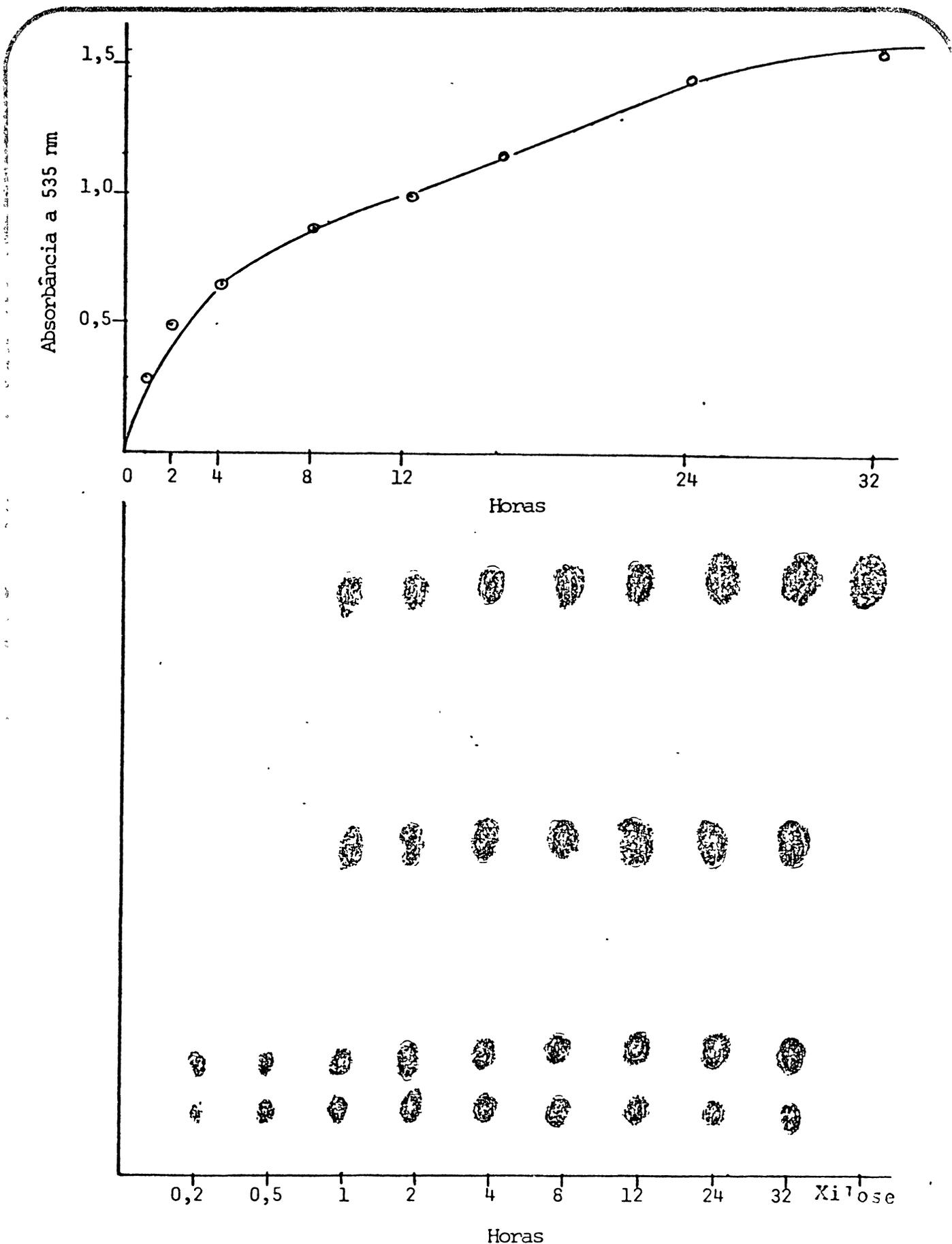


Figura 2 - Curva de hidrólise da hemicelulose original por enzimas de *Polyporus circinatus* F., em tampão acetato, 50 mM, pH 5 à 37°C e cromatografia em papel Whatman nº 1, solvente a, dos produtos hidrolisados. Alíquotas foram retiradas do sistema de incubação após 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 32 horas de hidrólise.

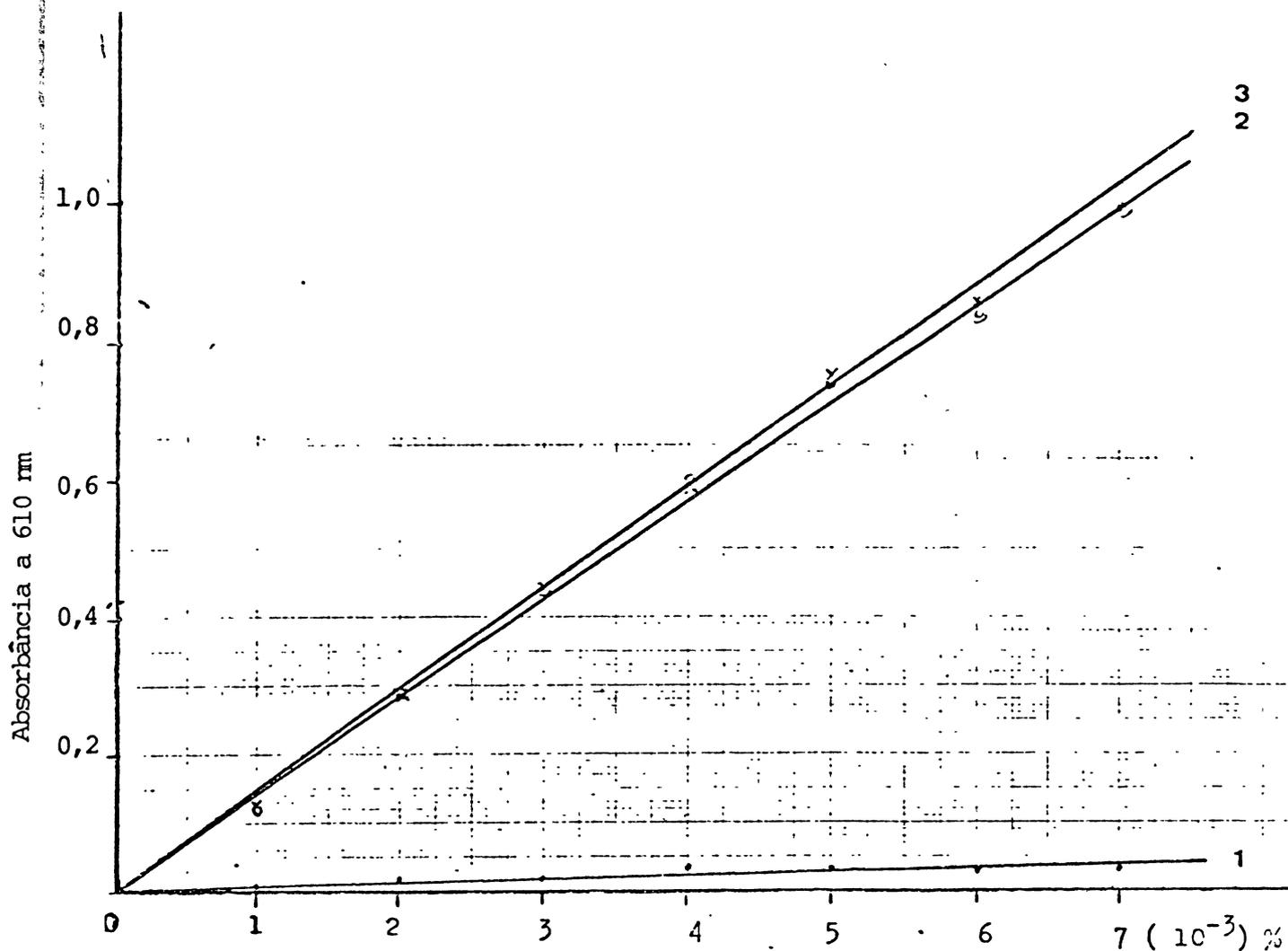


Figura 3 - Variação das absorvâncias a 610 nm com concentrações crescentes de polissacarídeo em cloreto de cálcio 3,7 M, contendo 0,05% de iodo e 0,21% de iodeto de potássio. 1) Hemicelulose original (-.-.-.). 2) Hemicelulose A da *Mimosa Bracaatinga* H. Correa et al<sup>10</sup> (□ □), 3) Hemicelulose original desacetilada por saponificação com NaOH (-x-x-).

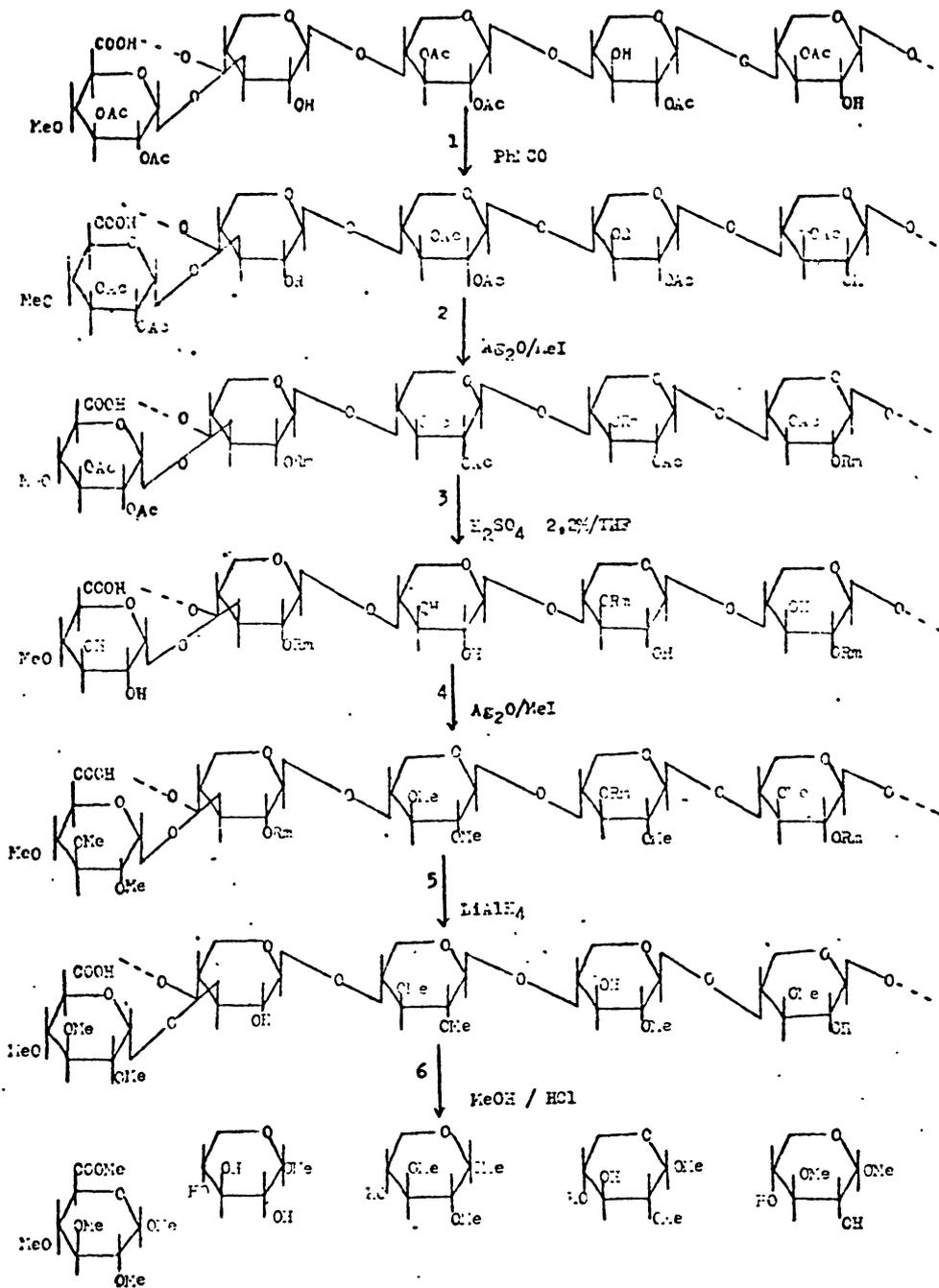


Figura 4 - Reações submetidas à hemicelulose original para a determinação da posição do grupo O-acetil: (1) reação com fenilisocianato; (2) metilação do grupo fenilcarbamoila (3) desacetilação; (4) metilação do derivado fenilcarbamato do O-metil-glucuronoxilano; (5) remoção dos grupos fenilcarbamoilas; (6) metanólise. (R-grupo fenilcarbamoila; Rm - grupo N-metil-fenilcarbamoila; THF-tetrahidrofurano).

TABELA I: Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise da hemicelulose original (acetilada) da *M. bracaatinga*.

O-metil-glicosídeos	Metilação com perser <u>v</u> ação dos grupos O- <u>a</u> cetil <sup>b</sup>		Metilação com de <u>s</u> acetilação simul <u>t</u> ânea <sup>c</sup>
	T <sup>a</sup>	Proporção relativa	Proporção relativa
2,3,4-tri-O-metil-D-xilopiranosídeo	0,86 1,05	-	vestígios
2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranosilurona-to de metila	2,59 3,77	+	+
2,3,-di-O-metil-D-xi <u>l</u> opiranosídeo	1,80 1,98 2,05	++++	+++++
2-O-metil-D-xilopira <u>n</u> osídeo	5,64 9,50	+++++	+
3-O-metil-D-xilopira <u>n</u> osídeo	4,75 7,57	++++	

<sup>a</sup>- Tempos de retenção relativos ao metil 2,3,4,6-tetra-O-metil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, analisado na coluna 1 e comparados com padrões autênticos.

<sup>b</sup>- Método de KUHN (duas vezes)

<sup>c</sup>- Métodos de HAWORTH, HAKOMORI e PURDIE.

TABELA II: Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise do derivado(4-O-metil-glucurano)xilano parcialmente metilado, resultante do tratamento da hemicelulose original de *M. bra caatinga* com fenilisocianato, seguindo-se metilação pelo método de KUHN (Cf. 2:14 e figura 4).

O-metil-glicosídeos	T <sup>a</sup>	Proporção relativa
2,3,4, tri-O-metil-D-gluco piranosiluronato de metila	2,60 3,77	+
2,3,-di-O-metil-D-xilopira nosídeo	1,80	+++
2-O-metil-D-xilopiranosídeo	5,70	+++
3-O-metil-D-xilopiranosídeo	5,00 7,77	+++
Composto não identificados		+++++

<sup>a</sup>- Tempos de retenção relativos ao metil 2,3,4,6-tetra-O-metil-  $\beta$  -  
D-glucopiranosídeo, analisado na coluna 1 e comparados com pa-  
drões autênticos.

## 5.0 - AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. João Batista Chaves Correa, pela orientação e apoio amigo.

- Ao Prof. Dr. J.K.N. Jones (Queen's University Kingston Canadá) pela orientação na síntese de 2-O-metil-D-xilose, e pelas amostras de açúcares metilados.

- Ao Prof. Luiz Rodolpho Travassos, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela confecção dos espectros de n.m.r.

- Ao Prof. Olavo Romanus, do Departamento de Química da U.F.P. pelo g.l.c. de ácido acético e ácido fórmico.

- Ao Departamento de Química da Universidade de Maringá pela confecção dos espectros de infra-vermelho.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, (Projeto nº 7495/75 (SIP-08-106) e 5218/76 e ao BNDE/FUNTEC (Projeto nº 179), pela ajuda financeira.

- A coordenação do curso de pós graduação da U.F.P. e a todos os amigos que direta ou indiretamente colaboraram pela realização deste trabalho.

## 6.0 - BIBLIOGRAFIA

1. TIMELL, T.E., Wood hemicelluloses. Part I. In: WOLFROM, M.L. (Ed.), Adv. Carbohyd. Chem., XIX, New York, Acad. Press, 247-302, 1964.
2. GREEN, J.W. Wood cellulose, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., III, New York, Acad. Press., 1963, pp. 9-21.
3. GAREGG P.J. Partial acetylation studies on benzyl-4-O-methyl-D-xylopyranoside. Acta Chem. Scand., 16:1849 - 1857, 1962.
4. BACON, J.D., GORDON, A.H. and MORRIS E.J., Acetyl groups in Cellwall preparations from higher plants. Biochem. J., 149: 485-487, 1975.
5. BOUVENG, H.O., GAREGG, P.J. and LINDBERG, B. Position of the O-acetyl Groups in birch xylan, Acta Chem.Scand, 14: 742-748, 1960.
6. KUHN, R., TRISCHMANN, H., and LOW I., Angeu. Chem. 67:32, 1955.
7. TIMELL, T.E. Isolation and properties of an O-acetyl-(-4- O -methylglucurono)xyloglycan from the wood of white birch (Betula papyrifera), J.Am.Chem.Soc., 82:5211 - 5217, 1960.
8. BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate Derivatives of Carbohydrates , II. Location of the O-acetyl groups in Birch xylan, Acta. Chem. Scand., 15:96-100, 1961.

9. BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate Derivatives of Carbohydrates , Acta Chem. Scand., 15:87-95, 1961.
10. CORRÊA, J.B.C, GOMES, S.L. and GEBARA, M. Structural features of the Hemicellulose A from the Stem of Mimosa-bracatinga, Carbohyd. Res., no prelo.
11. GEBARA, M., Analise estrutural dos oligossacarídeos resultantes da degradação da hemicelulose A de M.bracatinga por enzimas de P. circinatus Fr., Curitiba, 1977 ( Tese de mestrado)
12. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. and HARRISON, J.S., Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents, Nature, 166:444-445, 1950.
13. HOUGH, L., J.K.N. and WADMAN, W.H., Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram, J. Chem. Soc., 1702-1706, 1950.
14. AVIGARD, G., ZELIKSON, R. and HESTRIN, S. Selective determination of sugars manifesting enediol isomerism by means of reaction with tetrazolium. Biochem. J. 80: 57-61, 1961.
15. WARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H. and JEANES, A., Quantitative-determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography, Anal. Chem. , 37:1602-1604, 1965.

16. WOLFROM, M.L. and THOMSON, A., Acetylation, In: WHISTLER, R. L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., II. New York , Acad. Press, 1963 pp. 211-215.
17. WHISTLER, R.L. and FEATHER, M.S., Carboxyl Determination. Uronic acid carboxyl and total carboxyl. In: Methods in Carbohyd. Chem., I. New York, Acad. Press, 1962, pp. 464-468.
18. BITTER, T. and MUIR, H.M., A modified uronic acid carbazole reaction, Anal. Biochem. 4: 330-334, 1962.
19. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent , J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1968.
20. DUDMAN, W.F. and BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed poly - saccharides on cellulose acetate, Can. J. Chem. 46: 3079-3084, 1968.
21. BOUVENG, H.O. and LINDBERG, B., Native acetylated wood polysaccharides, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V. New York, Acad. Press, 1965, pp. 147-150.
22. STAUB, A.M., Removal of proteins. Sevag Method, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem. V, New York , Acad. Press, 1965. pp. 5-6.
23. McCOMB, E.A. and McCREADY, R.M., Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction. Analytical Chemistry 29:

819-821, 1957.

24. HAY, G.W., LEWIS, B.A., SMITH, F., Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem. V. New York, Acad. Press, 1965, pp. 357-361.
25. RANKIN, J.C., JEANES A., Evaluation of the periodate oxidation method for structural analysis dextrans. J. Am. Chem. Soc. 76: 4435-4441, 1954.
26. HAY, G.W., LEWIS, B.A., SMITH, F. and UNRAU, A.M., Determination of reducing end-groups by periodate oxidation, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., New York, Acad. Press, 1955, pp. 251-253.
27. HAWORTH, W.N., A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107: 8-16, 1915.
28. SANDFORD, P.A. and CONRAD, H.E., The structure of the aerobacter aerogenes A<sub>3</sub> polysaccharides. I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochem. 5: 1508-1516, 1966.
29. HIRST, E.L. and PERCIVAL, E., Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products, In: WHISTLER, R.L. (Ed.) Methods Carbohyd. Chem. V, New York, Acad. Press, 1965, pp. 287-296.
30. CORREA, J.B.C., Metilação, In: Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos, Curitiba, 1971, pp. 39-49 (monografia didática).

31. NELSON, N., A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol.Chem.153: 375-380, 1944.
32. SOMOGYI, M., A new reagent for the determination of sugars . J. Biol. Chem. 160: 61-68, 1945.
33. GAILLARD, B.D.E., THIMPSON, N.S. and MORAK, A.J., The interaction of polysaccharides with iodine, Part I. Investigation of the general nature of the reaction , Carbohyd. Res., 11:509-519, 1969.
34. GAILLARD, B.D.E. and THOMPSON, N.S., Interaction of polysaccharide with iodine. Part II: The behavior of xy-lans in different salt solutions, Carbohyd.Res., 18: 137-146, 1947.
35. WIESNER, J., Note über das Verhalten des Phloroglucins und einiger verwandter Körper zur verholzten Zellmembranen, Sitzber. Wien. Akad.1878, LXXVII,60: TUNNMAN , O.und ROSENTHALER, L., Die Zellmembranen, In:Pflanzenmikrochemie, 2a. ed., Berlin Verlag von Gebrüder Bornträger, 1931, pp. 884-1011.
36. GAILLARD, B.D.E., Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes , Nature, 191: 1295 - 1296, 1961.
- 37- GAILLARD, B.D.E., Separation of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families - Phytochemistry, 4: 631-634, 1965.

38. GAILLARD, B.D.E. and BAILEY, R.W., Distribution of galactose and mannose in the cell-wall polysaccharides of red clover (*Trifolium pratense*) leaves and stems, Phytochemistry, 7: 2039-2044, 1968, Apud: Chem. - Abstr., 70: 873 g, 1969.
39. GAILLARD, B.D.E. and BAILEY, R.W., Reaction with iodine of polysaccharides dissolved in strong calcium chloride, Nature: 212: 202-203, 1966.
40. WENZEL, G.E. and CORREA, J.B.C., Hemicelluloses from the leaves of coffee tree. An.Acad.Brasil.Ciênc. (no prelo).
41. BANKS, W., GREENWOOD, C.T. and KHAN, K.M., The interaction of linear amylose oligomers with iodine. Carbohyd.Res. 17: 25-33. 1971.

