

FANY REICHER

**ESTUDOS SOBRE A LOCALIZAÇÃO DE
GRUPOS *O*-ACETÍLICOS E DE COMPLEXOS
LIGNINA-XILANA EM HEMICELULOSE NATI-
VA DE *MIMOSA SCABRELLA* (BRACATINGA)**

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, para obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

CURITIBA

1984

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin.

Uma verdade fundada em provas não adquire
força do assentimento de todos os doutos;
nem lhe tira certeza a divergência geral.

Maimônides.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Batista Chaves Corrêa por sua orientação, estímulo e dedicação que tornaram possíveis a realização desta tese.

Ao professor Dr. Philip A.J. Gorin pela co-orientação, apoio e análises de g.c. - m.s. e ^{13}C -n.m.r.

Ao professor Dr. José Domingos Fontana pelas sugestões e colaboração.

Aos professores Drs. José Hazencleve Duarte e Marco Aurélio Lacombe Feijó pela revisão deste trabalho.

À professora Maria Rita Sierakowski pelas discussões e colaboração.

À Dra. Déa Amaral, coordenadora do Curso de Pós-Graduação, pelo incentivo.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela assistência.

A todos os professores, pós graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPR. pela colaboração e amizade.

À FINEP e CNPq pelo suporte financeiro.

TÉRMO DE APROVAÇÃO

ESTUDOS SOBRE A LOCALIZAÇÃO DE GRUPOS O-ACETÍLICOS E DE COMPLEXOS LIGNINA-XILANA EM HEMICELULOSE NATIVA DE *MIMOSA SCABRELLA* (BRACATINGA).

FANY REICHER

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. João Batista Chaves Corrêa - Orientador

Curitiba, de dezembro de 1984.

SUMÁRIO

	PAGINA
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de siglas	xiv
Resumo	xvi
1. Introdução	1
1.1 Celulose	1
1.2 Hemicelulose	2
1.3 Conformação de polissacarídeos	8
1.4 Lignina	12
1.5 Complexos lignina - carboidrato	16
2. Materiais e métodos	22
2.1 Métodos Gerais	22
2.2 Obtenção das hemiceluloses	25
2.2.1 Preparo da <u>O</u> -acetil-xilana - Fração I	25
2.2.1 Preparo das <u>O</u> -acetil-xilanas - Frações II e III	26
2.2.3 Preparo da <u>O</u> -acetil-xilana - Fração IV	26
2.2.4 Preparo das xilanas parcialmente acetiladas por síntese (frações V e VI) e da xilana peracetilada ...	27
2.2.5 Extração alcalina, preparo das hemiceluloses A e B .	27
2.2.6 Obtenção de Klason lignina	28
2.3 Localização dos grupos <u>O</u> -acetílico nas xilanas pelo método de Bouveng modificado por Corrêa	28
2.3.1 Tratamento das xilanas com fenil - isocianato	28
2.3.2 Metilação e desacetilação simultânea das <u>O</u> -acetil - xilanas-fenil-carbamato	29

2.3.3	Remoção dos grupos fenil carbamoilas	29
2.3.4	Metanólise das xilanas parcialmente metiladas	29
2.3.5	Hidrólise, redução e acetilação das xilanas parcialmente metiladas	30
2.3.6	Análise das <u>O</u> -acetil-xilanas por ^{13}C -n.m.r.	30
2.4	Estudo de migração dos grupos <u>O</u> -acetílicos nos polisacarídeos	30
2.4.1	Tratamento das <u>O</u> -acetil-xilanas (fração V e VI) com cloro	30
2.4.2	Tratamento das <u>O</u> -acetil-xilanas (frações V e VI) a 70°	30
2.5	Síntese dos padrões metil 2- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo e metil 3- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo	31
2.5.1	Obtenção do metil 3,4- <u>O</u> -isopropilideno - β - <u>D</u> -arabinopiranosídeo	31
2.5.2	Obtenção do metil 3,4 - <u>O</u> -isopropilideno 2- <u>O</u> - p-toluenosulfonil, β - <u>D</u> -arabinopiranosídeo	31
2.5.3	Obtenção do metil 2,3 - anidro- β - <u>D</u> -ribopiranosídeo ..	31
2.5.4	Obtenção do metil 2,3 - anidro - 4- <u>O</u> -metil - β - <u>D</u> -ribopiranosídeo	32
2.5.5	Metil 3- <u>O</u> -benzil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo	32
2.5.6	Metil 2- <u>O</u> -acetil -3- <u>O</u> -benzil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo	
2.5.7	Metil 2- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo	
2.5.8	Obtenção da mistura de 2- <u>O</u> - e 3- <u>O</u> -acetatos de metil 4- <u>O</u> -metil - β - <u>D</u> -xilopiranosídeos	
2.6	Estudo da migração dos grupos <u>O</u> -acetílicos nos modelos monossacarídicos	34
2.6.1	Migração dos grupos <u>O</u> -acetílicos dos derivados metil <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeos	34
2.6.2	Tratamento do metil 2- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo com cloro	34

2.7	Associação entre a xilana e compostos fenólicos (lignina)	35
2.7.1	Fracionamento da <u>O</u> -acetil-xilana (fração I) em coluna de DEAE celulose	35
2.7.2	Filtração em gel da <u>O</u> -acetil-xilana fração I e fração Ib	35
2.8	Estudo da ligação ester entre o ácido 4- <u>O</u> -metil-glucurônico da xilana e compostos fenólicos (lignina)..	35
2.9	Obtenção dos complexos lignina-carboidrato. Estudo de ligação eter entre a xilana e compostos fenólicos (lignina)	36
2.9.1	Obtenção do complexo lignina carboidrato por degradação dos carboidratos com metaperiodato de sódio ...	36
2.9.2	Obtenção preparativa do complexo lignina-carboidrato (LXC) a partir de hemicelulose A	36
2.9.3	Obtenção de lignina por hidrólise de hemicelulose A com ácido trifluoracético	37
2.10	Análise dos complexos lignina-carboidrato	37
2.10.1	Análises gerais	37
2.10.2	Metilação dos complexos lignina-carboidrato e do padrão de álcool coniferílico	37
2.10.3	Filtração em gel do complexo lignina-carboidrato ..	38
2.11	Hidrólise enzimática	38
3.	Resultados e discussão	41
3.1	Obtenção dos polissacarídeos	41
3.2	Localização dos grupos <u>O</u> -acetílicos nas <u>O</u> -acetil-xilanas	52
3.3	Síntese dos padrões metil 2- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo e metil 4- <u>O</u> -metil-3- <u>O</u> -acetil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo	62
3.4	Estudo das <u>O</u> -acetil-xilanas e modelos sintetizados por ^{13}C -n.m.r.	64
3.5	Conformação	74

3.6	A presença de lignina nas frações hemicelulósicas ..	76
3.7	As ligações entre a xilana e a lignina	79
3.8	Associação entre a xilana e compostos fenólicos da lignina	81
3.9	Estudo de ligação ester entre o ácido 4-O-metil-glucurônico e compostos fenólicos da lignina	85
3.10	Estudo de ligação éter entre a xilana e compostos fenólicos da lignina	91
4.	Conclusões	115
5.	Referências bibliográficas	118

L I S T A D E T A B E L A S

TABELA		PÁGINA
I	Composição e rendimento das <u>O</u> -acetil-xilanas (frações I a IV), obtidas do caule de <u>M. scabrella</u>	43
II	Determinação de lignina na fração I e hemiceluloses A e B	50
III	Análise cromatográfica em G.C - M.S das <u>O</u> -acetil xilanas, previamente tratadas com fenilisocianato, de acordo com o método de Bouveng modificado por Corrêa	58
IV	Distribuição dos grupos acetílicos nas <u>O</u> -acetil-xilanas	59
V	Sinais de C - 1, C = O e CH ₃ em espectroscopia de ¹³ C-n.m.r. dos derivados acetilados da xilana e dos compostos modelos metil 4- <u>O</u> -metil-β- <u>D</u> -xilopiranosídeos	70
VI	Fracionamento da <u>O</u> -acetil-xilana (fração I) em coluna de DEAE celulose	84
VII	Análise de lignina e ácido urônico na <u>O</u> -acetil-xilana (fração I) antes e após a carboxi-redução	87
VIII	Composição em monossacarídeos na <u>O</u> -acetil-xilana (fração I) antes e após a carboxi-redução	90

L I S T A D E F I G U R A S

FIGURA		PÁGINA
1	Cromatograma em g.l.c. de Klason lignina acetilada obtida do caule de <u>M. scabrella</u>	45
2	Cromatograma em g.l.c. do resíduo da hidrólise ácida (Saeman), após acetilação, da <u>O</u> -acetil-xilana (fração I), obtida do caule de <u>M. scabrella</u>	46
3	Cromatograma em g.l.c. do resíduo de hidrólise ácida (Saeman), após acetilação, da hemicelulose A obtida do caule de <u>M. scabrella</u>	47
4	Cromatograma em g.l.c. do resíduo da hidrólise ácida (Saeman) após acetilação, da hemicelulose B obtida do caule de <u>M. scabrella</u>	48
5	Cromatograma em g.l.c. do Álcool Coniferílico, tratado com H ₂ SO ₄ (Saeman) e acetilado	49
6	Espectro de U.V. da <u>O</u> -acetil xilana (fração I; 1,35 mg/ml) em H ₂ O	51
7	Cromatogramas em g.l.c. das <u>O</u> -acetil-xilanas parcialmente metiladas, na forma de acetatos de alditóis, previamente tratadas com fenilisocianato de acordo com o método de Bouveng modificado por Corrêa	54
8	Cromatogramas em g.l.c. das <u>O</u> -acetil-xilanas sintéticas parcialmente metiladas, na forma de acetatos de alditóis, previamente tratadas com fenilisocianato, de acordo com o método de Bouveng modificado por Corrêa.	55
9	Espectros de massa de 1,4,5-tri- <u>O</u> -acetil-2,3-di- <u>O</u> -metil-xilitol e 1,2,4,5-tetra- <u>O</u> -acetil-3- <u>O</u> -metil-xilitol	56
10	Espectros de massa de 1,3,4,5-tetra- <u>O</u> -acetil-2- <u>O</u> -metil-xilitol (A) e xilitol penta acetatato (B)	57

11	Síntese dos padrões metil 2- <u>O</u> -acetil 4- <u>O</u> -metil- e metil 3- <u>O</u> -acetil 4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeos	63
12	Espectros de ^{13}C -n.m.r. dos padrões monossacarídeos : metil 4- <u>O</u> -metil 4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo (A); metil 2- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo (B); metil 3- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo	65
13	Espectro de ^{13}C -n.m.r. da <u>O</u> -acetil-xilana (fração II), em D_2O	66
14	Espectro de ^{13}C -n.m.r. dos sinais de CH_3 e $\text{C}=\text{O}$ da <u>O</u> -acetil-xilana nativa (fração II)	67
15	Espectro de ^{13}C -n.m.r. em DMSO-d_6 da região CH_3 da xilana acetilada sinteticamente com 0,5 equivalentes (A) e 1,0 equivalente (B) de anidrido acético por mol de xilose	69
16	^{13}C -n.m.r. do padrão metil 2- <u>O</u> -acetil-4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeo após 64 horas a 70° , em D_2O	72
17	Progresso no equilíbrio de 2- <u>O</u> -acetil (II) e uma mistura contendo principalmente o 3- <u>O</u> -derivados de metil 4- <u>O</u> -metil- β - <u>D</u> -xilopiranosídeos em D_2O a 70°	73
18	Filtração em Bio Gel P300 da <u>O</u> -acetil-xilana (fração I, A) e da <u>O</u> -acetil-xilana previamente fracionada por coluna de DEAE celulose e eluída com NaCl 0,3N (fração Ib)	82
19	Cromatogramas em g.l.c. da <u>O</u> -acetil-xilana (fração I) fracionada por Bio Gel P300	83
20	Cromatogramas em g.l.c. da <u>O</u> -acetil-xilana na forma de acetatos de alditois	89
21	Espectros de U.V. de LXC_2 (A), cloro-lignina (B), Klason lignina (C) e LXC_3 (D)	95
22	Espectros de I.V. de LXC_2 (A) e de Klason lignina em discos de KBr	96
23	Espectros de I.V. de Klason Lignina acetilada (A), resíduo da hidrólise ácida da Hemicelulose A, após acetilação (B), álcool coniferílico, tratado com H_2SO_4 e acetilado (C) e LXC_2 hidrolisado e acetilado (D) ...	97

24	Cromatograma em g.l.c. de LXC ₂ após hidrólise, redução e acetilação	98
25	Cromatograma em g.l.c. de LXC ₃ após hidrólise, redução e acetilação	99
25	Cromatograma em g.l.c. de LXC ₂ metilado e os componentes analisados na forma de acetatos de alditois	101
27	Espectros de massa (impacto eletrônico) de 2,3- ou 3,4-di-O-metil-xilose (A) e derivado de lignina de LXC ₂ metilado	103
28	Espectros de massa (impacto eletrônico de: álcool coniferílico metilado (A) e lignina TFA metilada (B) ..	104
29	Espectros de massa (ionização química) de álcool coniferílico metilado (A) e lignina TFA metilada (B) ...	105
30	Espectro de ¹ H-n.m.r. de lignina TFA acetilada, em CDCl ₃	106
31	Filtração em gel de LXC ₂ em Bio Gel P30 (A), Bio Gel P100 (B) e Bio Gel P300 (C)	107
32	Filtração em gel de LXC ₃ em Sephadex G50 (A), Bio Gel P100 (B) e Bio Gel P300 (3)	108
33	Filtração em Bio Gel P100 dos sobrenadantes etanólicos da 1ª degradação enzimática da hemicelulose A ..	111
34	Filtração em Bio Gel P100 do resíduo da 3ª degradação enzimática de hemicelulose A (HAE _{p3})	112

L I S T A D E S I G L A S

CDCl ₃	-	clorofórmio deuterado
¹³ C-n.m.r.	-	ressonância nuclear magnética de carbono treze
DMSO	-	dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	-	dimetilsulfóxido deuterado
d.i.	-	diâmetro interno.
D ₂ O	-	óxido de deutério
EDTA	-	ácido etilenodiaminicotetraacético.
fig.	-	figura
g.c.- m.s.	-	cromatografia gás-líquido e espectrometria de massa
g.l.c.	-	cromatografia gás - líquido
GP	-	grau de polimerização
HA	-	hemicelulose A
HB	-	hemicelulose B
¹ H-n.m.r.	-	ressonância nuclear magnética protônica
I.V.	-	infra vermelho
NaBH ₄	-	boroidreto de sódio.
p.p.m.	-	parte por milhão
T	-	tempo de retenção
t.l.c.	-	cromatografia em camda delgada
TMS	-	tetrametilsilano
U.V.	-	ultra violeta
V	-	volume
Fração I	-	<u>O</u> -acetil-xilana obtida por extração com benzeno-etanol em Soxhlet, EDTA e oxalato de amônio, Cl ₂ , etano <u>l</u> lamina em etanol fervente, DMSO.
Fração II	-	<u>O</u> -acetil-xilana obtida por extração com benzeno-etanol a 28 ^o , Cl ₂ , etanol a temperatura ambiente, DMSO.

- Fração III - O-acetil-xilana obtida por extração com benzeno-etanol a 28°, Cl₂, etanol fervente, DMSO.
- Fração IV - O-acetil-xilana obtida por extração com benzeno-etanol em Soxhlet, EDTA e oxalato de amônio, etanol em Soxhlet, DMSO.
- Fração V - xilana parcialmente acetilada por síntese com 0,5 equivalentes de anidrido acético por mol de xilana.
- Fração VI - xilana parcialmente acetilada por síntese com 1 equi valente de anidrido acético por mol de xilana.
- Lignina TFA - lignina obtida pela hidrólise da HA com TFA.
- LXC - complexo lignina-carboidrato ou lignina-xilose.
- LXC₁ - complexo obtido por dois processos degradativos tipo Smith, insolúvel pela adição de ácido.
- LXC₂ - complexo obtido por dois processos degradativos tipo Smith, solúvel pela adição de ácido.
- LXC₃ - complexo obtido por um processo degradativo tipo Smith.
- HAE_{s1} - sobrenadante etanólico do 1º ciclo da hidrólise enzimática da HA.
- HAE_{p1} - precipitado etanólico do 1º ciclo da hidrólise enzimática da HA.
- HAE_{p2} - precipitado etanólico do 2º ciclo da hidrólise enzimática da HA.
- HAE_{p3} - precipitado etanólico do 3º ciclo da hidrólise enzimática da HA.

RESUMO

O caule de bracatinga (Mimosa scabrella) foi delignificado por tratamento com cloro a temperatura de $\sim 4^{\circ}$ e extraído com etanol a temperatura ambiente ou a refluxo. Do produto parcialmente delignificado, por extração com dimetilsulfóxido (DMSO) obteve-se um polissacarídeo complexo formado de unidades de D-xilopiranoses, ácido 4 - O-metil-D-glucurônico, grupos O-acetílicos e lignina numa relação percentual de 72: 13: 9: 6. Os grupos O-acetílicos, conforme determinado por análise de metilação com bloqueio prévio das hidroxilas livres por fenilisocianato, foram localizados em O-2 (14%), O-3 (16%) e O-2,3 (5%) das unidades de D-xilopiranoses da O-acetil-(4-O-metil glucurono) xilana. O uso do etanol a refluxo não causou nenhuma alteração significativa relativa aos grupos O-acetílicos.

A análise por ^{13}C -n.m.r. de xilanas acetiladas sinteticamente e de estrutura conhecida, bem como do metil 4-O-metil-2-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo utilizados como modelos antes e após o tratamento com Cl_2 a temperatura de $\sim 4^{\circ}$ demonstrou que o processo de delignificação não causa migração ou remoção dos grupos O-acetílicos.

A distribuição dos grupos O-acetílicos na xilana nativa sugere que os mesmos tenham relação com a conformação da molécula.

A lignina está associada à xilana nativa de três maneiras distintas: interação secundária, ligação ester e ligação benzil eter.

1 - INTRODUÇÃO

Uma parede celular rígida, rica em carboidratos, geralmente contorna cada célula vegetal. Esta parede celular era considerada meramente um envelope secretado, exterior e inativo, conceito há muito superado. Hoje suas funções específicas, vitais para a existência da célula são reconhecidas. As estruturas de muitos dos componentes da parede celular são agora bem documentadas, porém a arquitetura geral não está completamente elucidada (4, 5, 9, 17, 42, 78, 105, 113, 140).

Os principais componentes da parede celular são celulose, hemicelulose e lignina. As primeiras frações a serem formadas numa nova célula de madeira são a lamela média e a parede primária, que é rica em material pectico. Durante o espessamento da parede celular, celulose e hemicelulose são depositadas na parede secundária. A lignina, cuja função principal é cimentar as fibras da madeira, se forma principalmente na lamela média, aparecendo também na parede secundária.

1.1 - CELULOSE

A celulose, que constitui cerca de 45% da madeira é uma D-glucana, ligada β -(1 \rightarrow 4). Aparece na parede celular na forma de fibrilas de 35 Å de diâmetro, cada uma contendo aproximadamente 40 cadeias de celulose. Foi amplamente estudada e sua estrutura é bem compreendida (37, 117). Os usos práticos e a importância biológica da celulose dependem de sua alta resistência, caráter fibroso e insolubilidade. Estas características advem da forma da molécula e não de propriedades inerentes aos blocos construtivos, pois outros polímeros da glucose não as possuem. Portanto, a conformação da celulose é de extrema importância para suas funções estruturais. A conformação de Hermans ou "bent chain" é aceita para as duas formas cristalinas da celulose (118). Sua estabilidade pode ser racionalizada através dos métodos de análise conformacional de polissacarídeos, que foram introduzidos por Ramachandran, (148). A conformação da molécula é construída, de maneira regular, por segmentos idênticos de 10,3 Å de comprimento (celobiose) e a cadeia tem um eixo de simetria (two fold screw axis), permitindo a formação das fibras.

1.2 - HEMICELULOSES

Wenzel (108), em sua tese de mestrado, discute o termo "hemicelulose", introduzido por Schulze (167) em 1891, que apresenta muitas controvérsias. O termo é comumente usado para englobar os polissacarídeos de matriz, diferentes da celulose e pectina (13, 180, 193).

As hemiceluloses das plantas terrestres são constituídas de um número relativamente limitado de unidades de açúcar, sendo os principais: D-xilose, D-manose, D-glucose, D-galactose, L-arabinose, ácidos 4-O-metil-glucurônico e D-galacturônico; em menor proporção aparecem L-ramnose, L-fucose e açúcares neutros O-metilados.

As hemiceluloses são frequentemente classificadas entre os polissacarídeos estruturais, apresentando-se sob forma fibrosa, cristalina, ou como um gel compactado. As diferenças na sua constituição nas paredes celulares das espécies são atribuídas aos sítios de reconhecimento, através do qual os parasitas reconhecem seu hospedeiro (172).

Grupos substituintes podem ter funções específicas. Em polissacarídeo extraído de Cryptococcus neoformans, (22) foi demonstrado que os grupos O-acetílicos e carboxílicos são importantes determinantes na especificidade antigênica do polissacarídeo.

Nas paredes de células vegetais em crescimento aparecem hemiceluloses que formam geis com funções biológicas importantes. Trabalho realizado com grãos de cevada (128), mostra que paredes celulares e gomas da camada de aleurona e do endosperma diminuem e tem sua composição alterada durante a germinação. Após 6 dias estes polissacarídeos contribuíram para o suprimento dos tecidos vivos com 18,5% dos polissacarídeos degradados durante o crescimento, sendo o restante proveniente do amido. Modificações de polissacarídeos hemicelulósicos em diferentes estágios de maturidade foram descritos por Morrison (132).

As hemiceluloses com função estrutural extraídas de madeira são polissacarídeos complexos (8, 36, 181, 182). Madeiras moles (gimnospermas) contêm basicamente glucomananas, que frequentemente

estão associadas à galactose, formando galactoglucomanas e, em menores proporções ocorrem arabino (4-O-metil) glucurono-xilanas e arabinogalactanas. Nas madeiras duras (angiospermas) a principal hemicelulose é constituída por 4-O-metil-glucurono-xilanas.

Grupos acetílicos esterificam unidades de açúcar nas hemiceluloses. Eles aparecem associados principalmente às glucurono-xilanas nas madeiras duras e às glucomanas das madeiras moles. Madeiras moles contêm menos acetil do que madeiras duras.

Devemos ainda considerar as hemiceluloses de angiospermas herbáceas, as gramíneas e leguminosas, que foram amplamente revisadas (13, 193). As xilanas de gramíneas são heteroglicanas e geralmente possuem unidades de L-arabinofuranose e ácido glucurônico ou seu 4-O-metil eter ligados a unidades de xilose da cadeia principal. Um grande número de variações estruturais foram descritas e o termo xilana neste caso, engloba todas as heteroxilanas. O fato das homoxilanas como de "esparto grass" (43) terem sido primeiramente descritas parece indicar o isolamento de uma parte de população mais rica em unidades de xilose, devido aos métodos de extração (193).

Com relação aos grupos O-acetílicos, claramente presentes nas xilanas de madeira, (28) Wilkie (193) afirmou que "se eles estão presentes nas gramíneas, são saponificados durante o tratamento alcalino". Por outro lado, preparações de paredes celulares de diversas gramíneas maduras, incluindo folhas, bainha e caules, analisadas por I.R., indicaram a presença de grupos O-acetílicos perfazendo de 1,5 a 2% das paredes celulares (12).

Waite e Gorrod (187) determinaram a concentração de O-acetil em holoceluloses de gramíneas e concluíram que o grau de acetilação aumenta com a maturidade da grama, podendo atingir 2,7% da matéria seca. Os mesmos autores verificaram que ocorre também uma queda da digestibilidade da grama com a maturação e, através de uma série de considerações, sugerem que o grau de acetilação contribuiu para tal fato. Por outro lado, Oliveria (143) submetendo a O-acetil xilana de M. scabrella a tratamentos com extrato bruto de D. dendroides, obteve como produtos xilose e oligossacarídeos.

Em trabalho realizado com caule de A. donax, foram estudadas as modificações das paredes celulares durante a maturação (103).

A estrutura da principal hemicelulose, uma arabino-glucurono-xilana, permanece a mesma, apesar da idade dos tecidos, havendo aumento do GP médio. Foi constatado também, que o número de grupos O-acetílicos na cadeia da D-xilana aumentou durante a maturação.

As O-acetil (4-O-metil-glucurono) xilanas encontradas nas madeiras duras constituem 18 a 35% da madeira. Através de extrações alcalinas diretas pode-se obter de 80 a 95% do polímero desacetilado. As extrações alcalinas geralmente são realizadas a temperatura ambiente, por tempo limitado e sob atmosfera de nitrogênio. Nestas condições, as modificações da xilana pelo alcali são mínimas, a não ser a completa desacetilação. Para isolá-las na forma acetilada deve-se remover a lignina da lamela média e parede secundária. O material remanescente da completa delignificação é denominado holocelulose, devendo ser constituído unicamente por hemicelulose e celulose, o que na prática não ocorre. Há numerosos métodos para o isolamento de holoceluloses de madeiras, sendo que os principais envolvem o uso de cloro, dióxido de cloro, ácido peroxiacético ou clorito, como agentes delignificantes (37, 180).

Os agentes delignificantes podem causar modificações nos polissacarídeos da madeira. Quando a cloração é realizada em água e gelo, parece não haver perda em grupos O-acetílicos (28, 179). Garegg (72) demonstrou que o tratamento subsequente com 2-amino-etanol, em etanol, a quente, utilizado normalmente para remover a lignina clorada, causa considerável migração de grupos O-acetílicos. A estrutura da xilana, determinada por métodos convencionais (metilação e período) apresenta uma cadeia principal de unidades de β - D (1 \rightarrow 4) xilopiranoses (180). O ácido 4-O-metilglucurônico está distribuído randomicamente ao longo da cadeia, ligado ao carbono 2 dos resíduos da xilose (156).

Numa série de investigações sobre os grupos O-acetílicos, Hagglund e colaboradores (85) isolaram uma holocelulose por tratamento do pó da madeira com clorito e sucessivas extrações com dimetilsulfóxido e água. O extrato apresentou uma xilana contendo 11,4% de grupos O-acetílicos. Resultados diferentes foram obtidos quando uma holocelulose da mesma madeira tratada com cloro foi extraída de igual maneira. Neste caso, obteve-se uma xilana pura, com 16,9% de grupos O-acetílicos.

Bouveng (29, 30) desenvolveu um método para localizar grupos O-acetílicos em hemiceluloses de madeiras duras, utilizando fenilisocianato como grupo protetor. Este composto reage quantitativa_umente com os grupos hidroxílicos, originando derivados fenil carbamatos completamente substituídos (29,194). Esta propriedade foi utilizada por Bouveng na localização de grupos O-acetílicos, em O-acetil glucurono-xilana obtida de holocelulose de betula (birch), preparada pelo método do clorito e extraída com DMSO. Assim, a O-acetil xilana (13,2% de O-acetil) foi tratada com solução de fenilisocianato em N,N-dimetil formamida, bloqueando os grupos hidroxílicos livres. A seguir, os grupos O-acetílicos foram removidos por hidrólise ácida moderada e as hidroxilas resultantes foram metiladas com iodeto de metila e óxido de prata. Finalmente, os grupos O-fenilcarbamoilas foram removidos por redução com hidreto de alumínio e lítio e a posição dos grupos O-metílicos na xilana parcialmente metilada foi determinada por métodos convencionais, indicando a posição dos grupos O-acetílicos originais. Os resultados indicaram que 58,1% das unidades de xilose encontram-se não substituídas, 11,8% estão substituídas por grupos O-acetílicos na posição O-2, 24% na posição O-3 e 6,1% simultaneamente nas posições O-2 e O-3.

Corrêa et al (47) introduziram uma modificação no método de Bouveng, na qual a desacetilação acídica foi substituída por desacetilação e metilação simultânea, usando dimetilsulfato e hidróxido de sódio pulverizado em tetraidrofurano seco. Os grupamentos fenilcarbamoilas foram removidos por metil sulfinil carbanion. Utilizando-se esta metodologia, os grupos O-acetílicos foram localizados numa xilana acetilada sinteticamente, tendo-se encontrado 54,30% de unidades de xilose não substituídas, 14,38% substituídas na posição O-2, 9,95% na posição O-3 e 21,45% simultaneamente nas posições O-2 e O-3.

De Belder e Norman (18) descreveram outro método para localização de grupos O-acetílicos que emprega metil vinil eter como grupo protetor. Este método foi utilizado para localizar grupos O-acetílicos em lipopolissacarídeo de Salmonella typhimurium (94) e também em xilana de bétula (115). Esta xilana foi obtida de uma holocelulose delignificada pelo método do clorito e seu conteúdo em grupos O-acetílicos foi de 11,7%. A análise dos produtos de metilação do polissacarídeo previamente tratado com metil vinil eter, na forma de metil glicosídeos, demonstrou que as proporções entre as unidades de D-xilose não acetiladas e aquelas acetiladas nas posições O-2, O-3 e O-2,3, respectivamente, são 44: 24: 22: 10.

Horton and Lanterbach (99) descreveram uma metodologia baseada em espectroscopia de ressonância protônica para determinar quantitativamente o grau de acetilação em carboidratos.

Estudos de oxidação com periodato de glucuronoxilanas (179) e glucomanas (125) naturalmente acetiladas indicaram que os grupos O-acetílicos estão ligados em O-2 e em O-3 das unidades monossacáridicas.

Em química de carboidratos há vários exemplos de migração intramolecular de grupos substituintes, a maior parte envolvendo grupos acíclicos (86). O fato foi descoberto por Emil Fischer em 1920. O rearranjo é catalizado por ácidos e bases, podendo ocorrer em condições alcalinas suaves. Consubstanciada por vários exemplos, existe uma generalização de que os grupos acíclicos (acetílicos) migram sempre em direção oposta ao C-1, portanto aproximando-se de C-6 (34). Não há base teórica para esta observação e exceções foram observadas (45).

A ocorrência de migração de grupos acíclicos pode depender do solvente (6, 7), da alcalinidade ou acidez do meio (7) e da configuração relativa dos dois centros envolvidos (7). A migração de grupos O-acetílicos foi observada durante o processo de metilação pelos métodos de Purdie e Kuhn. Como exemplos, metil-2,4,6-tri-O-acetil β -D-glucopiranosídeo originou o metil 3,4,6-tri-O-acetil-2-O-metil β -D-glucopiranosídeo, pelo método de Purdie (55). Um rearranjo O-2 \rightarrow O-3 semelhante foi observado quando, pela metilação de 2,4,6-tri-O-acetil β -D-manose, o principal produto obtido foi o metil-3,4,6-tri-O-acetil-2-O-metil β -D-manopiranosídeo (144). Na metilação de 2-O- e 3-O-acetil 4-O-metil β -D-xilopiranosídeo pelo método de Kuhn, ambos os monoacetatos produziram 2,4 e 3,4 dimetil éteres, na relação de aproximadamente 2:1 (72).

Alguns trabalhos em espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. sobre o efeito dos grupos O-acetílicos nos deslocamentos químicos dos anéis piranosídicos tem sido reportados. Para exemplificar, foram estudados os tri- e tetra-acetatos de α e β D-xilopiranosose (184), L-ramnopiranosose parcialmente e totalmente acetilados (146) e derivados de D-glucopiranosose (107). Uma manana linear α -D-(1 \rightarrow 3) foi isolada de um extrato etanólico a 70%, a quente, de frutos de Dictyophora induciata, contendo 11,4% de grupos O-acetílicos (88), cuja localização

foi determinada pelo método de de Belder e Norman (18). Os resultados indicaram que 88% dos grupos O-acetílicos estão localizados no O-6 das unidades de manopiranosose. Pequenas proporções de grupos O-acetílicos estão localizados em O-2,6, O-4,6, O-2, e O-4. Os estudos espectrais por ^{13}C -n.m.r. confirmaram os dados da localização de O-acetil pela acetalação. O sinal do metil do grupo acetílico localiza-se a 21,3 ppm e o do carbonil em 174,6 ppm. Os dados de ^{13}C , de acordo com Gorin (79) e Ogawa (142) indicaram que os deslocamentos químicos de C-1, C-2, C-3 e C-4 não são afetados pela presença do grupamentos O-acetílicos em O-6, enquanto C-5 e C-6 o são. Observou-se uma diferença de solubilidade entre a O-acetil manana (solúvel em água) e o polímero desacetilado (insolúvel), que foi atribuída aos grupos O-acetílicos.

Num exaustivo trabalho, McEwan e colaboradores (123) compararam os deslocamentos químicos por espectroscopia de ^{13}C e ^1H n.m.r. do metil α e β -D-xilopiranosídeos (compostos de origem) com os diferentes mono, di e tri -O-acetil derivados. Os sinais dos β -D-xilopiranosídeos estão localizados em campo mais baixo que os α . Comparando-se o metil 2-O-acetil β -D-xilopiranosídeo, com o metil 3-O-acetil β -D-xilopiranosídeo os deslocamentos químicos para C1 são de -2,81 ppm e -0,25 ppm respectivamente, com relação ao composto de origem ($\delta = 104,57$) (3-O-campo mais baixo que o 2-O-). A introdução dos grupos O-acetílicos em O-2 ou O-3 promove deslocamentos também nos C-2, C-3, C-4 e C-5, com relação aos compostos de origem. As ressonâncias dos grupos CH_3 e $\text{C}=\text{O}$ do acetil estão compreendidas entre δ 20,30-21,03 e 169,06-170,16, respectivamente.

1.3 - CONFORMAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

A conformação do polissacarídeo, isto é, a forma que a macromolécula adota é determinada pelo tipo de ligação entre as unidades monossacarídicas da cadeia, por modificações oriundas da presença de ramificações ou substituintes, e por interações com moléculas vizinhas (147).

O gel é o estado típico para os polissacarídeos, quer nos sistemas biológicos ou artificiais. Polissacarídeos fibrosos ou parcialmente cristalinos, a exemplo da quitina e celulose, bem como grãos de amido, representam uma classe de gel no qual o solvente tenha sido eliminado. Por outro lado temos as verdadeiras soluções onde o polissacarídeo está desagregado e a interação entre as cadeias é mínima (151). Nas considerações abaixo nos referimos ao primeiro caso.

Matematicamente, qualquer cadeia com conformação ordenada, pode ser considerada uma hélice, definida por dois parâmetros: n , o número de resíduos por volta (turn), e h , o comprimento de cada unidade sobre o eixo (152).

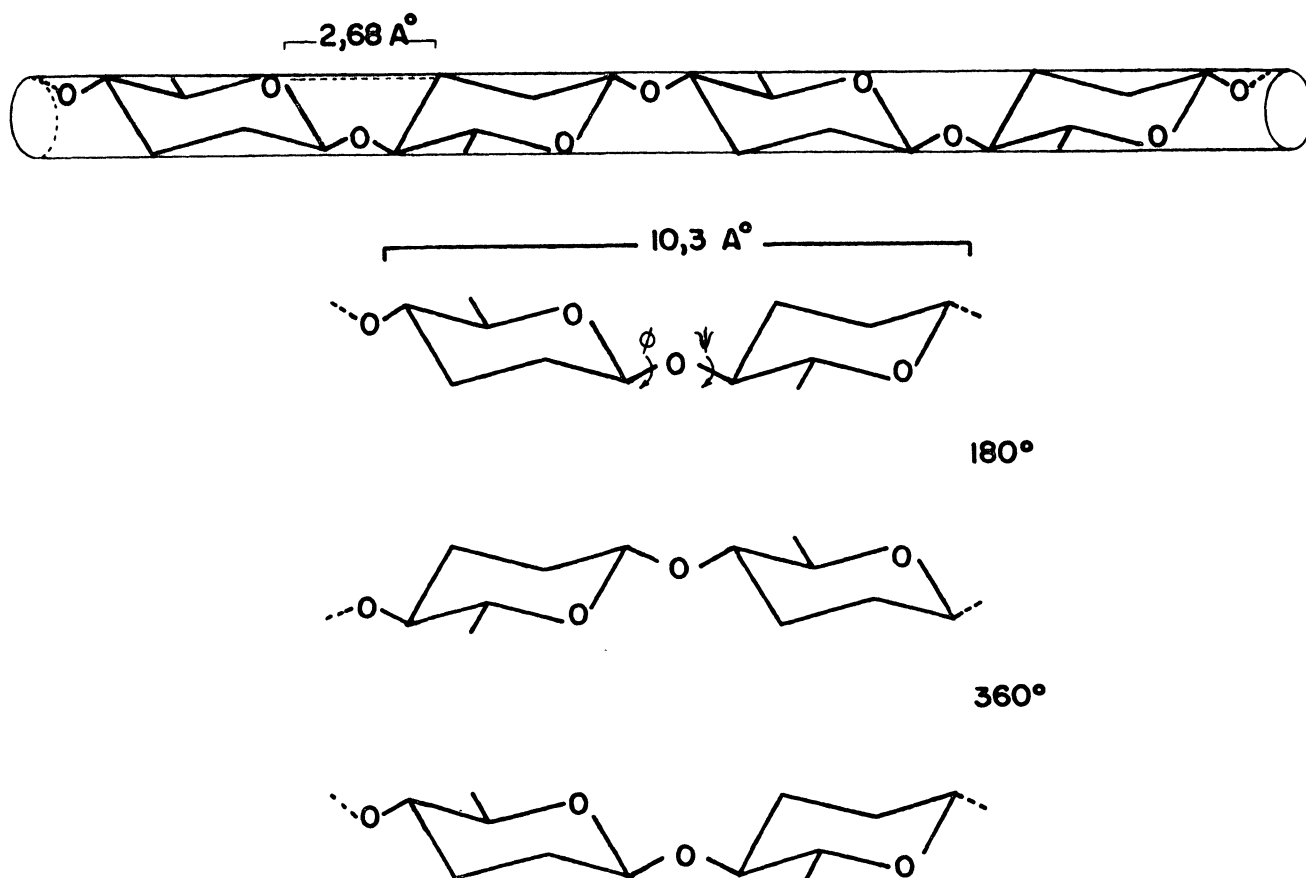
A celulose, conforme já citado, é um componente das paredes celulares dos vegetais, formada por unidades de β -(1 \rightarrow 4) D-glucopiranoses que ocorre no seu estado nativo, em parte, na forma cristalina. Além de celulose, ocorrem em forma cristalina as mananas β -(1 \rightarrow 4) e as xilanas β (1 \rightarrow 3), que são polissacarídeos estruturais de algas (10, 61, 62). A manana, no que se refere a conformação, é semelhante à celulose, somente formando pontes de hidrogênio distintas, o que lhe confere menor estabilidade do que à celulose. As xilanas β (1 \rightarrow 3), quando cristalinas, adotam uma conformação helicoidal, com três cadeias unidas enroladas em tripla hélice, a qual é estabilizada por pontes de hidrogênio entre as 3 cadeias e pela presença de água na rede, o que a diferencia da celulose e da manana, que não permitem a entrada de água.

Para justificar a estrutura cristalina da celulose poderíamos prever o mínimo de energia de conformação; portanto, sabendo-se que a conformação 4C_1 é mais estável, pode-se supor que esta seja a forma esperada para todas as unidades de glucose da cadeia.

Os ângulos de rotação determinam o contorno da cadeia. Se os mesmos ângulos ϕ e ψ ocorrem a cada ligação no polímero, pode-se esperar que a conformação geral seja como uma rosca (151). As forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio também são determinantes na conformação.

Foi postulado que, se um par de átomos se aproximar mais que uma determinada distância (a soma dos raios de Van der Waals), a repulsão é tão severa que a conformação torna-se impossível e, se dois grupos são suscetíveis a formar uma ponte de hidrogênio forte, a conformação é favorecida. Pontes de hidrogênio (O-H.....O) resistentes são formadas somente quando existem dois átomos de oxigênio separados por 2,6-2,8 Å (150).

Na celulose sabe-se que a conformação da cadeia é determinada por unidades repetitivas que possuem 10,3 Å de comprimento ($h=0,515\text{nm}$) e correspondem à celobiose e que portanto a cadeia tem um eixo de simetria, em que cada passo corresponde a 2 unidades de glucose (two fold screw axis of symmetry, $n=2$). Esta simetria pode ser ilustrada pela figura abaixo.



Considerando um eixo desenhado em 3 dimensões que una os átomos de oxigênio do anel na estrutura, cada anel pode ser movido para a posição do seguinte pela rotação de 180° da cadeia em torno do eixo. A cada giro de 360° , ou seja, uma volta completa, as unidades de celobiose se repetem. Esta relação é correta também para eixos que unam as ligações glicosídicas ou os átomos de carbono C-6. Este arranjo é a conformação ideal para cada ligação β (1 \rightarrow 4) e para explicar as atrações entre as cadeias de celulose. A formação de feixes que contém em média 100 cadeias é explicada pelas pontes de hidrogênio entre as cadeias.

Quando o grupo volumoso, $-\text{CH}_2\text{OH}$ (C-6 das hexopiranoses) não está presente em cada unidade de açúcar, como na xilana, a rotação das ligações é menos restrita, pois não há repulsão de Van der Waals. Neste caso, cada passo no eixo de simetria corresponde a 3 unidades de xilose (three fold). Esta conformação é consistente com a evidência de filmes e fibras de xilana hidratada, pela difração de raios X e espectroscopia de infra-vermelho. Na conformação "three fold", a distância entre $\text{O-H}\dots\dots\text{O}$ não permite formar as pontes de hidrogênio intra cadeia, como ocorre no caso da celulose.

Atraves de estudos da (4-O-metil-glucurono)-xilana de betula (birch) concluiu-se que a cadeia principal da xilana possui um eixo, onde cada passo corresponde a 3 unidades, (three fold screw axis) conforme o desenho abaixo (150).



A similaridade do diagrama de raio X da xilana seca e da xilopentaose sugeriu que os grupamentos ácidos não interferem na cristalinidade. Isto foi confirmado pela verificação de que xilanas

com diferentes números de grupos laterais acídicos deram o mesmo diagrama de raio X (180). Os estudos de cristalinidade das xilanas foram realizados com polímeros extraídos com soda (24). As O-acetil-xilanas nativas das angiospermas não foram estudadas neste aspecto.

Nas xilanas, segmentos não ramificados da cadeia tem um eixo com $n=3$, e o comprimento da unidade repetitiva é igual a 15 \AA , ao invés de $10,3 \text{ \AA}$, como no caso da celulose e manana, onde $n=2$. A análise conformacional indica (147) que quando o passo é igual 2 unidades há maior estabilidade que quando são 3 unidades, em 4-5 KCal / mol resíduo.

Fowle e colaboradores (59) afirmaram que esta conformação é conservada em xilanas ramificadas em C-2 ou C-3 por cadeias curtas contendo D-galacto-piranoses e L-arabino-furanoses.

Por outro dado, quando a xilana é peracetilada, a cadeia toma uma conformação onde a distância repetitiva é de $10,3 \text{ \AA}$, como no caso da celulose (117,119). Na xilana diacetato as pontes de hidrogênio intermoleculares seriam substituídas por interações de Van der Waals e dipolo fracas. Somente uma conformação similar faria a xilana compatível com a celulose ou manana. De acordo com Preston a própria xilana deve estar mais firmemente ligada a celulose (147).

As características conformacionais da xilana foram comparadas com as da celulose. Apesar da conformação proposta para a xilana ser do tipo "three fold axis", Rees (153) sugere que deve haver um único eixo de simetria para ambos. Essa suposição resultou da análise das medidas da energia de Van der Waals e do comprimento da ponte de hidrogênio (desfavoráveis) e da interação de dipolos atômicos (favorável).

Devido a similaridade entre as ligações glicosídicas da xilana e da amilose, a conformação deste último polissacarídeo também deve ser considerada. A maltose representa o arranjo mais estável para os pares de glucose α (1 \rightarrow 4) ligados. Cada seis unidades de glucose toma uma forma circular de ciclohexamilose formando um passo de hélice. Esta estrutura foi comprovada pela complexação com iodo. O complexo amilose iodo é o responsável pela coloração negro azulada tão utilizada para a caracterização de amido em tecidos vegetais e em titulações iodométricas. A celulose não forma complexo com o iodo. Assim podemos comparar a amilose a um longo tubo oco como uma mola de metal e a celulose a uma fita plana. Muitas das propriedades

físicas de celulose essenciais para suas funções biológicas e usos práticos são explicadas em termos desta conformação de fita.

A conformação de amilose com seis unidades de glucose unidas em cada hélice é estável somente quando moléculas não carboidrato ocupam a cavidade da hélice.

Gaillard e colaboradores (67,68, 69 , 70) e Wenzel e Corrêa (189) mostraram que muitos polissacarídeos lineares apresentam a capacidade de formar complexos de cor azul com iodo; limitado grau de ramificação no polissacarídeo não é impecilho para a formação dos complexos. É essencial para a formação do complexo que as ligações glicosídicas no polissacarídeo sejam do tipo (1→4).

Oliveira (143) estudou o comportamento da O-acetil xilana de M.Scabrella, um homopolissacarídeo linear, frente a complexação com o iodo. Houve formação do complexo do iodo com a O-acetil xilana após sua desacetilação por saponificação, da mesma forma que com a hemicelulose A obtida da mesma fonte. A hemicelulose nativa (acetilada) todavia não formou o complexo iodo-polissacarídeo.

Nieduszynski e Marchessault (139), em trabalho sobre estrutura de β -D·(1→4) xilanas, concluíram que, o grau de acetilação é provavelmente importante na determinação de sua natureza hidrofílica, mas que são necessárias mais pesquisas sobre sua distribuição na parede celular para que haja maior compreensão sobre seu papel.

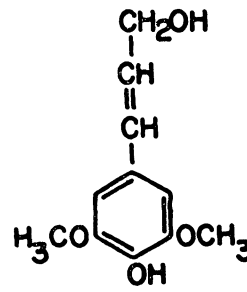
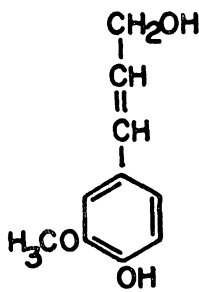
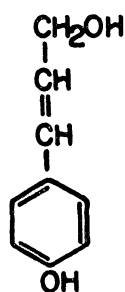
1.4 - LIGNINA

A lignina é um componente essencial dos caules lenhosos das gimnospermas e angiospermas arborescentes, nos quais aparece em proporções que variam de 15 a 36 %. Entretanto, a presença da lignina não é restrita a árvores e ela é parte integral dos constituintes das paredes celulares de todas as plantas vasculares, incluindo as variedades herbáceas. É encontrada não só no caule mas também em folhas e raízes.

Suas funções biológicas, vitais para a planta são: diminuir a permeabilidade da água, contribuindo com o transporte de líquidos, nutrientes e metabólitos no xilema; conferir rigidez à parede celular

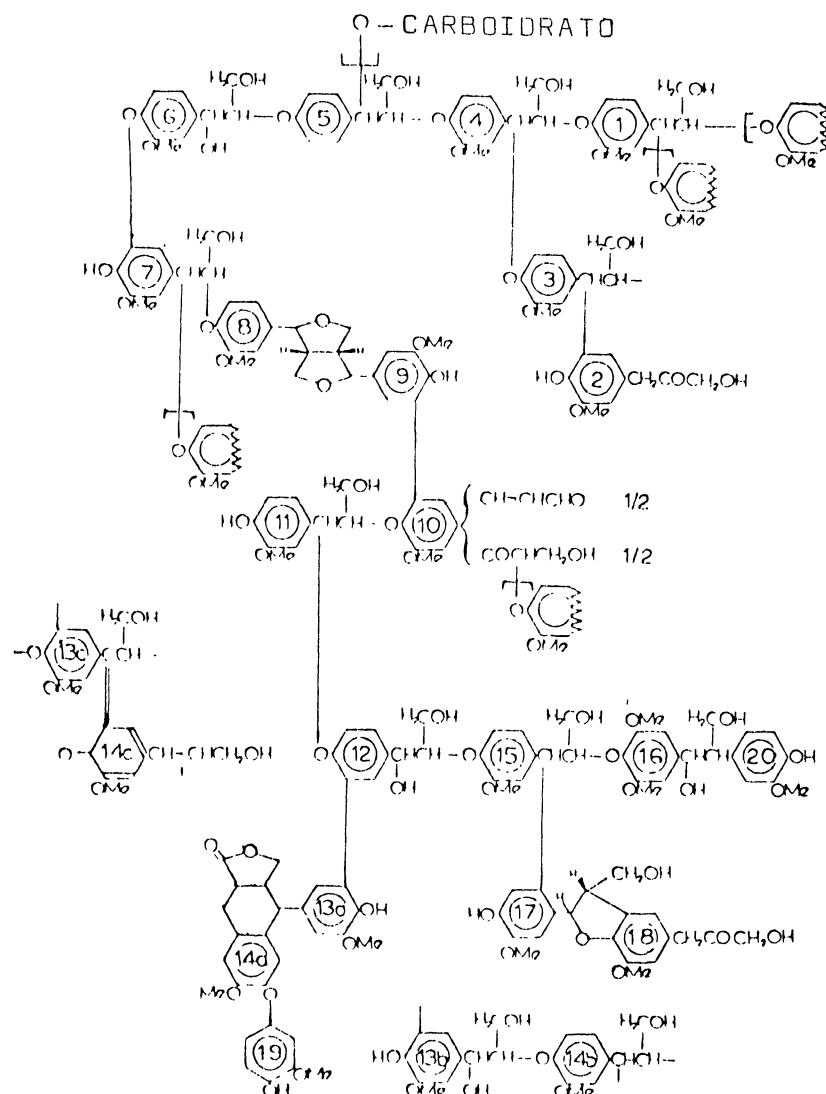
atuando como um agente cimentante entre as células e protegendo-as contra impactos, compressões e inclinações; e, finalmente proporcionar aos tecidos lignificados resistência a ataques por microrganismos (162).

O estudo da lignina é considerado difícil porque, em contraste com a celulose, não possui regularidade estérica nem quiralidade e por este motivo tem sido negligenciado. A sua estrutura varia não somente de espécie para espécie mas, também, entre árvores da mesma espécie (135). Apesar do alto grau de variação estrutural, todos os tipos de lignina são oriundos de 3 precursores básicos, do tipo fenil propano (C9), o álcool *p*-cumarílico e suas formas mono e di metoxiladas, respectivamente o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, abaixo indicados.



álcool *p*-cumarílico álcool coniferílico álcool sinapílico

A estrutura proposta por Freudenberg, que foi um dos maiores contribuintes para a compreensão da biogênese e estrutura da lignina (63, 64) dá uma idéia razoável de sua arquitetura molecular. Modificações a estrutura original foram introduzidas por Freudenberg e Harkin (66) e mais tarde por Harkin (89), conforme mostra o esquema na página seguinte.



A principal ligação entre os monômeros é do tipo aril-eter unindo a cadeia lateral propanoide de uma unidade ao anel aromático de outra. Outras ligações C-O e C-C foram descritas, incluindo ligações bifenil entre os anéis aromáticos (166).

As ligninas têm sido classificadas de acordo com sua estrutura química, propriedades físicas, e origem genética (162). A mais comum é a que as classifica em ligninas de gimnospermas ou madeiras moles, de angiospermas ou madeiras duras e de gramíneas. Esta classificação, entretanto, é insatisfatória pois não engloba as angiospermas herbáceas e as Pteridophytas e, também, porque algumas gimnospermas excepcionais contêm lignina do tipo angiosperma. Assim, Gïbs introduziu uma divisão em dois grandes grupos denominados guaiacil-ligninas (coníferas) e guaiacil-siringil-ligninas (angiospermas).

Estes dois tipos podem ser reconhecidos pelos produtos formados na oxidação com nitrobenzeno (guaiaçil-siringil produz quantidades significativas de siringaldeído, enquanto que guaiaçil somente traços), técnica que foi inicialmente aplicada na caracterização de lignina por Creighton e colaboradores (41).

As formas de obtenção de lignina alteram sua composição química original e a falta de um método adequado de isolamento tem sido um problema na determinação da estrutura do produto natural. As formas mais comuns de isolamento são (112) "milled wood" lignina (pó de madeira tratado em moinho de bolas, seguindo-se extração com solvente orgânico); lignina de Brauns (extração direta com etanol); lignina liberada por enzimas (ação de fungos e posterior extração com etanol); periodato lignina (conversão das unidades monossacarídicas a dialdeídos e hidrólise dos mesmos com água a 100°); métodos baseados na hidrólise ácida dos polissacarídeos, como H₂SO₄ 72% (Klason lignina) ou HCl; cuoxano lignina (reagente de Schweizer); lignina extraída com alcali (NaOH 5%, 130 a 150°); lignina ácido tioglicólico (ácido tioglicólico em HCl 2N); lignina obtida pela ação de HCl: dióxano.

Glasser e colaboradores (75), em trabalho atual, mostraram as variações estruturais em ligninas de diferentes origens genéticas e de origens industriais, tais como "Milled wood" lignina, Kraft lignina, lignosulfonatos, organosolov lignina (obtidas pela ação de alcoólise), lignina obtida por explosão de vapor, etc. Para este fim os autores utilizaram metodologias sofisticadas como degradação da lignina por oxidação com permanganato (114) e identificação dos produtos degradados por cromatografia gasosa acoplada a um programa computadorizado para a interpretação dos resultados em termos da composição das unidades fenil-propano, bem como determinação de pesos moleculares por gel permeação a alta pressão e por osmometria.

Interessante técnica analítica não destrutiva foi desenvolvida recentemente, a espectroscopia fotoacústica (157), que fornece informação sobre a absorção na região do ultravioleta, visível ou infra-vermelho, para materiais sólidos ou opacos, impossíveis de serem analisados por espectrometrias convencionais. Este método foi utilizado por Gould (82) que demonstrou diferenças significativas entre ligninas nativas em amostras de madeira e as correspondentes "milled wood" ligninas. Esta técnica está sendo utilizada para moni

torar o progresso de lignificação de tecidos em maturação e também para acompanhar as diferenças resultantes da degradação biológica e ou química da lignina.

A crescente produção de combustíveis líquidos a partir de matérias primas renováveis dá origem a um resíduo rico em lignina, geralmente utilizado como fonte de energia calorífica. Entretanto este material pode produzir importantes produtos de valor comercial, cujas características podem ser aprimoradas por modificações químicas do polímero (74, 196). Os mercados potenciais para a lignina são: óleos, fertilizantes, pesticidas, fibras sintéticas, adesivos, dispersantes, etc. Também os estudos de degradação da lignina através de microorganismos, purificação de enzimas e engenharia genética proporcionaram novas perspectivas de aplicações deste material (33, 106).

1.5 - COMPLEXOS LIGNINA-CARBOIDRATO

A madeira pode ser considerada uma substância naturalmente complexa, que exibe a mais eficiente interação entre os polímeros que a constituem. A elucidação da natureza das forças que mantêm a coesão da parede celular pode ser alcançada pelo isolamento dos componentes da família dos carboidratos, ou seja, pectina, hemicelulose e celulose, e dos não carboidratos, lignina e proteínas, através de reagentes químicos ou enzimas específicas. As possibilidades de interações são numerosas e diversificadas, podendo ser covalentes (éster, éter, glicosídicas) ou ligações mais fracas (pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas).

Muitas preparações de lignina, tais como "milled wood lignina", lignina de Brauns e outras contêm constituintes carboidratos, não removíveis por fracionamentos com solventes, sugerindo a presença de ligações entre lignina e carboidratos (112).

Complexos de lignina-carboidrato tem sido isolados por diferentes processos que visam obter lignina como produto majoritário. O mais utilizado é o processo de Bjorkman (112), que se constitui na obtenção de "milled wood lignina", que consiste na extração do pó de madeira, previamente tratado em moinho de bolas, com mistura de dioxano e água. Também é frequente a utilização de processos envolvendo a degradação microbiana do vegetal (71, 145).

Há muitas controvérsias quanto aos tipos de ligações existentes entre estes complexos. Foram propostos diferentes tipos de ligações entre lignina e carboidrato tais como: ester entre o grupo carboxílico do ácido urônico e o grupo hidroxílico da lignina; β -D-fenol glicosídica; acetálica, benzil-eter e benzil-glicosídica. As ligações ester e fenol glicosídicas são alcali-sensíveis (35, 58, 64, 93, 109, 127).

Bolker e Wang (27) estudaram complexos lignina-carboidrato isolados de betula branca com água fervente os quais, através de hidrólise ácida, liberaram lignina insolúvel e carboidratos, indicando a existência de ligação covalente entre a lignina e carboidrato.

Kringstad e Cheng (110) isolaram um complexo lignina-hemicelulose de holocelulose de abeto por filtração em gel, concluindo que a lignina está quimicamente ligada a polissacarídeos.

Merewether e Samsuzzaman (127) estudaram um complexo de lignina e carboidrato, solúvel em água, extraído de Eucalyptus obliqua com alcali diluído. A hidrólise ácida do complexo originou lignina insolúvel, xilose, arabinose e galactose e um composto não identificado. Devido a estabilidade em alcali deste complexo, os autores sugeriram que a natureza da ligação entre a lignina e o polissacarídeo seja do tipo benzil eter ou benzil glicosídica.

Das e colaboradores (48) trataram fibra de juta com boroidreto de potássio, originando uma fibra modificada contendo 77% da lignina original e um complexo lignina-carboidrato solúvel em água. Após separação e hidrólise, tanto a fibra tratada como o complexo forneceram um novo açúcar, 4-O-metil-glucose. O produto da extração alcalina das holoceluloses da fibra original e da tratada produziram polímeros contendo respectivamente, 15,9 e 10,5 unidades de ácido urônico por 100 resíduos de xilose, indicando que 34% das unidades de ácidos urônicos estavam originalmente formando ligação ester com a lignina.

Em experimento similar (170), hemiceluloses foram extraídas de fibras de folhas de ananás delignificada por clorito de sódio, antes e após o tratamento das mesmas com boroidreto de sódio. Os produtos obtidos por extração alcalina (4%) foram comparados, indicando uma diminuição de 28% de ácido urônico na fração pré-tratada com boroidreto.

Isto demonstra que os ácidos urônicos encontram-se parcialmente esterificados por lignina admitindo-se, ainda, a possibilidade de outros tipos de ligações entre lignina e carboidrato.

Complexos de lignina-xilose em madeiras duras foram descritos por Aaltio e Roshier (1), Stewart e Mc Pherson (176) e Simonson (171) e colaboradores. Em madeiras moles, complexos lignina-manana foram descritos por Meier (124) Linnell et al (116), Eriksson et al (53) e Fengel e Przyklenik (54). Os dois últimos, concluíram que existem ligações entre a arabinose da cadeia lateral da xilana e lignina. Neste caso a arabinose atua como ponte entre o polissacarídeo e a lignina. Os resultados indicam que existe ainda outro tipo de ligação entre a lignina e a xilana (54), além da descrita acima.

Azuma (11) isolou complexos - lignina carboidrato de "milled wood" lignina de Pinus densiflora, os quais foram fracionados por filtração em gel em Sepharose 4 B em 3 frações. Os açúcares neutros de 2 frações foram identificadas como L - arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glucose, sendo o arcabouço da estrutura um manana (1 → 4) ligada. Também foi identificada uma cadeia de unidades de xilopiranoses ligadas (1 → 4). Estes resultados sugerem uma estrutura com ligações cruzadas de lignina e vários tipos de hemiceluloses. Em trabalho subsequente (177) as propriedades hidrofóbicas destes complexos foram analisadas, sendo atribuídas à fração lignina e consideradas de extrema importância na elucidação da função biológica dos complexos lignina- carboidrato (os esqueletos benzênicos das unidades de lignina nos complexos estão fortemente ligados uns aos outros, resultando na imobilização da hemicelulose).

Os animais ruminantes utilizam em sua dieta os polissacarídeos de parede celular de vegetais como fonte de energia. A porção dos carboidratos digerível pelo animal é dependente da maturida

de da planta, a qual é diretamente relacionada à quantidade de lignina, estando os complexos lignina - hemicelulose também implicados. Isto justifica o grande número de trabalhos existentes sobre complexos lignina - carboidrato em gramíneas (32,90, 91, 131, 133, 178). As cadeias de xilanas de gramíneas aparecem muitas vezes interligadas através de pontes de ester com ácidos ferrúlico. Morrison (131) isolou complexos lignina - carboidrato de paredes celulares de gramínea com vários solventes. O extrato com alcali e o com dimetilsulfóxido deram maiores rendimentos, sendo que o espectro de UV do DMSO apresentou absorção em 280 nm e uma absorção secundária a 325 nm. Esta última absorção, devido a ligação ester, não ocorreu no extrato alcalino. O mesmo autor (133) constatou que os complexos isolados de bainha foliar e do caule contém maiores proporções de lignina e maior quantidade de ácidos fenólicos esterificados do que os isolados do tecido foliar. Posteriormente, através de tratamento de paredes celulares com uma preparação de celulase, foram isoladas duas classes de complexos carboidrato-fenol com variações na composição dos açúcares neutros. Ambas continham ácido ferrúlico que foi liberados por saponificação, ligados ao C-3 de unidades de xilose. Foi constatado, ainda, que deve haver lignina ligada covalentemente via ponte de L-arabinofuranose (178).

Neilson e Richards (137) isolaram um complexo lignina-carboidrato, do rumen de novilhas, alimentadas com gramíneas, que foi purificado por filtração em gel. O complexo purificado apresentou 7,4% de carboidrato contendo D-glucose como principal componente, além de D-xilose, L-arabinose, L-rhamnose e traços de D-galactose e D-manose. O autor conclui que D-xilose, D-glucose e L-rhamnose estão glicosidicamente ligadas a lignina, embora os resultados não tenham sido suficientes para informar sobre a natureza estrutural da lignina no complexo ou do sítio de ligação do açúcar à lignina.

Se por um lado a lignina diminui a digestibilidade de vegetais fibrosos, por outro há indícios de que sua presença seja benéfica em alimentos. Deste modo, há vários estudos epidemiológicos sobre cancer de colo no homem indicando a importância da dieta (alta ingestão de lipídeos e baixo consumo de fibras e certos vegetais) na etiologia desta moléstia. Assim sendo, Reddy et al (149) demonstraram o efeito protetor da dieta de lignina na incidência de tumores intestinais induzidos em ratos. O fato foi explicado devido às propriedades antioxidantes da lignina. É possível, também, que ocorra a formação de uma ligação entre a lignina e certas substâncias carcinogênicas (158).

A importância do conhecimento da natureza estrutural dos complexos poliméricos da parede celular no seu estado nativo é fundamental para a elucidação de suas verdadeiras funções fisiológicas. Deste modo, o presente trabalho tem por finalidade estudar hemiceluloses de madeiras duras em condições tais que suas peculiaridades não sejam modificadas, preservando-se os grupamentos O-acetílicos na sua posição original, bem como as ligações com a lignina. O material escolhido como modelo foi caule de Mimosa scabrella.

A M.scabrella, anteriormente denominada M.bracatinga e conhecida popularmente por bracatinga, é uma Angiosperma arborecente que ocorre nas zonas temperadas do sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) e em São Paulo. É uma espécie de crescimento rápido, alcançando 15 metros de altura em 4 a 6 anos, que se presta a reflorestamento, regeneração do solo, auxílio no combate a erosão e produção de lenha (97). Instruções sobre sua cultura foram publicadas por Viana, em 1942 (186). O caule pode atingir 40cm de diâmetro. O reflorestamento espontâneo de florestas de bracatinga ocorre após queimadas (98). As folhas podem ser utilizadas como forrageiras e foram bem aceitas pelos bovinos, apresentando 18,23 % de proteínas (base seca), conforme análise realizada pelo TECPAR em agosto de 1974. Seu caule produz lenha de alto teor calorífico. É empregado na construção civil, podendo ser utilizado na fabricação de celulose de fibra curta. Aspectos tecnológicos para a produção de carvão ativo e celulose, bem como parasitas de bracatinga foram pesquisados (16, 38, 126, 141).

Corrêa e colaboradores vem ha muitos anos estudando as hemiceluloses do caule da bracatinga (46, 47, 50, 73, 143, 197), A hemicelulose

lose A, uma 4-O-metil-glucurono-xilana, ligada β (1 \rightarrow 4), apresentou alguns indícios de ligação com lignina (197). Uma hemicelulose com arcabouço estrutural semelhante a HA foi obtida do caule delignificado, por extração com DMSO, tratando-se de uma xilana acetilada (143). Uma tentativa de localização dos grupos O-acetílicos neste polissacarídeo foi realizada pela técnica de Bouveng porém, devido a dificuldade na separação dos derivados 2-O e 3-O-metil-xilose os resultados não foram conclusivos. Doroso e colaboradores (50) estudando a hemicelulose B da bracinga, descreveram como principais componentes uma 4-O-metil-glucurono-xilana, uma glucomana e, em menor proporção uma arabinoglucoxilana ramificada (4,0, 6,0 e 3,0% respectivamente, em relação as hemiceluloses totais).

Dando sequência a estes estudos preliminares pretende - se atingir os seguintes objetivos:

1- Estabelecer condições de extração da xilana acetilada nativa evitando a migração dos grupos O-acetílicos;

2- Sintetizar derivados monossacarídicos (metil 2-O-e 3-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos) que sirvam de modelo para determinar os fatores que causam migração de grupos O-acetílicos;

3- Analisar por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. a migração dos grupos acetílicos nos modelos obtidos;

4- Determinar a localização e proporções exatas dos grupos O-acetílicos nos polissacarídeos pela técnica de Bouveng modificada;

5- Determinar a localização de grupos O-acetílicos em xilanas acetiladas sinteticamente, preparadas com concentrações variadas de agente acetilante;

6- Relacionar os resultados de localização dos grupos O-acetílicos por metilação (Bouveng modificado) com a espectroscopia de ^{13}C -n.m.r.;

7- Comprovar a existência de Lignina ligada à Xilana;

8- Estudar os tipos de ligações possíveis entre a xilana e a lignina;

9- Estudar os possíveis sítios envolvidos nas ligações entre a lignina e a xilana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1 MÉTODOS GERAIS.

As rotações óticas foram obtidas com polarímetro Perkim-Elmer, modelo 141, a 25°.

As análises por g.l.c. foram realizadas em cromatógrafo Variam, modelo 2440, com detector de ionização de chama, utilizando-se nitrogênio como gas de arraste e as seguintes colunas:

(a) 3% de ECNSS sobre "gas chrom Q" de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável 200 x 0,15cm (d.i), (detector 240°), e fluxo de nitrogênio 37.5 ml/min;

(b) 3% de OV-225 sobre "gas chrom Q" de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável de 200 x 0,15cm (d.i) a 190° (detector 240°) e fluxo de nitrogênio a 40.0 ml/min;

(c) 14% p/p succinato de etileno glicol (LAC-4R.886) sobre "chromosorb W" DMSC, em tubo de cobre de 100 x 0,4cm (d.i) a 155° (detector 240°) e fluxo de nitrogênio 40 ml/min;

(d) para análise da mistura dos acetatos de 0-metil-xilitol foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida de 30 m (d.i 0,25mm) com DB 210, em aparelho Finnegan g.l.c.-m.s. modelo 4000, acoplado a um sistema de dados Inco 2300. Os espectros foram obtidos por impacto de eletrons, repetitivamente a cada 2 segundos, desde massa 40 até 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna, a 50° e então o aparelho foi programado [40°min/até 195° (hold)]. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 35 cm /segundo. As áreas foram calculadas por triangulação (165). Outras colunas de 30 m foram testadas;

(e) de sílica fundida contendo Durowax - 4,

(f) de vidro, contendo OV-225,

(g) de vidro, contendo OV-17.

Para g.l.c.-m.s. dos complexos lignina-carboidrato utilizou-se coluna capilar com OV-225 (f). O programa utilizado foi 50-182° (hold) 40°/min. e programado para massa de 40 a 420 cada 2 segundos a 70 e/v. Foi utilizado detector por impacto eletrônico e ionização química.

Espectroscopia de p.m.r: para ressonância de p.m.r. a amostra (LXC 3 acetilada) foi dissolvida em CDCl_3 e os espectros obtidos em

espectrômetro Jeol J. NM-PMx60. Os deslocamentos químicos (δ) foram referidos ao TMS contido num capilar coaxial ao tubo de amostra (TMS externo).

Espectroscopia de ^{13}C -n.m.r: Os espectros foram obtidos utilizando-se espectrômetro com operação de transformação Fourier. Foram utilizados os aparelhos:

(a) Varian XL-100-15; soluções (10-100 mg em 0,85 ml de D_2O , CDCl_3 ou DMSO-d_6) contidas num cilindro coaxial foram colocadas em tubo de 20cm de comprimento e 12 mm de diâmetro, "spectral width" 5000 Hz, "aquisition time" 0.8s e "pulse width" 9,5 μs ;

(b) Bruker AM-360-WB: as amostras contidas em 3 ml de solvente foram examinadas em tubo de 20cm e 10mm de diâmetro. Os parâmetros espectrais foram: "sweep width" 20.000 Hz, "aquisition time" 0,8s e "pulse width" 23 μs . Os deslocamentos químicos (δ em p.p.m.) são expressos em relação a ressonância de Me_4Si (TMS), determinada em experimento separado;

(c) aparelho de 100 MHz , com as condições espectrais acima, utilizado nos experimentos quantitativos, onde a relação das áreas dos sinais de C-1 dos derivados metil 2-O-acetil-4-O-metil- e metil 3-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos foram comparadas. Os resultados encontrados foram os mesmos que os obtidos em experimentos quantitativos (188) (medida de T1 por modificação de Freeman Hill dos sinais de C_1). Neste caso, utilizou-se o programa IPDNA que é um experimento com um pulso com o desacoplador ligado durante "aquisition" e desligado durante a "delay" de mais de 5 vezes ao tempo de ressonância de T1. [1.03 segundo e 1.1 segundo ($\pm 0,01$) respectivamente] (60), a temperatura ambiente em D_2O .

Os espectros de ultra violeta foram realizados em espectrofotômetro UV-VIS Variam, modelo 635.

Os espectros de infra vermelho foram obtidos em espectrofotômetro Beckman AcculebTM 10, em discos de KBr ou filme de CHCl_3 sobre célula de NaCl.

As determinações espectrofotométricas para a região do visível foram realizadas em aparelho Coleman Junior, modelo 6A.

As análises cromatográficas em papel (c.p.) foram realizadas pela técnica ascendente, utilizando-se papel Wathman nº 1, com o sistema de solventes benzeno - n-butanol-piridina- água -

(1:5:3:3 v/v fase superior) e como revelador usou-se nitrato de prata alcalino (183). As análises cromatográficas em camada delgada (t.l.c.) foram realizadas em placas (20 x 20cm) de sílica gel, em suporte de alumínio (Merck), com 0,25 mm de espessura, empregando os seguintes sistemas de solventes e visualizadores respectivamente:

- (a) n-Butanol-acetona-tampão fosfato pH 5 (5:5:2), em placa tamponada no mesmo tampão;
- (b) Benzeno;
- (c) Solução de clorofórmio etanol 19:1;

Visualização:

- (a₁) Fosfato de anilina
- (b₁) Ácido sulfúrico a 5% em metanol ou Ácido fosfomolídico
- (c₁) Observação em Lâmpada UV.

As dosagens de carboidrato total foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (51), leituras a 480 nm para pentoses e 490 nm para hexoses, utilizando-se como padrões soluções de D-xilose ou D-glucose a 40 ug/ml; açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (174) e Nelson (138); ácido urônicos pelo método de Bitter e Muir (25) usando-se ácido D-glucurônico como padrão (14,8 µg/ml); O-acetil pelo método de Hestrin (96), utilizando-se um padrão de glucose-penta-acetato (3 umoles/ml); nitrogênio total e proteína foram determinados pelo método de micro Kjeldahl (104); desproteíntização foi realizada pelo método de Sevag (175); lignina foi determinada conforme ADAMS (.3) ou pelo método de Bar-lev (15) que consiste no seguinte:

As amostras foram cuidadosamente pesadas e tratadas com solução de NaOH 5M (5 ml), durante 2 horas, em estufa a 110^o, com agitação ocasional. Após esfriar, o volume foi completado para 10 ml com água destilada. Os tubos foram agitados, centrifugados, o sobrenadante apropriadamente diluído e sua absorbância determinada a 280 nm, em relação a um padrão de álcool coniferílico 10 ug/ml.

Hidrólises Ácidas (168):

- (a) com ácido trifluoroacético 1N ou 2N, durante 4 horas em banho de água fervente.
- (b) com ácido sulfúrico 72%, a frio, durante 2 horas (pré-hidrólise). Após diluição para 7% a hidrólise foi completada, durante 5 horas, em banho de água fervente. (hidrólise de Saeman).

O excesso de ácido trifluoracético foi removido por sucessivas evaporações a vácuo, das soluções hidrolisadas. O excesso de ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário até pH 4,5 - 5,0 e, o sulfato de bário formado eliminado por centrifugação. O sobrenadante foi tratado com resina trocadora de ions Dowex 50W-x8, forma H^+ (200- 400 mesh).

Redução e acetilação dos produtos das hidrólises ácidas.

As amostras foram reduzidas com boroidreto de sódio, a temperatura ambiente por 16 horas e tratadas com resina Dowex 50W x 8 , forma H^+ , para eliminar os ions sódio. Após filtrar, as soluções foram concentradas sob pressão reduzida, a 45° . O ácido bórico foi eliminado por codestilação com metanol na forma de borato de metila. Os alditois foram submetidos a acetilação com uma mistura de anidrido acético- piridina 1:1, à temperatura ambiente por 16 horas, quando o processo foi interrompido pela adição de água gelada. Os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi eliminada da preparação por tratamentos com H_2SO_4 0,1 N e a solução clorofórmica foi lavada várias vezes com água destilada, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada (195).

2.2 OBTENÇÃO DAS HEMICELULOSES.

Todas as amostras de caule de M. Scabrella utilizadas foram obtidas junto a coordenação do curso de Engenharia Florestal, após classificação, descascamento e estabilização.

2.2.1 Preparo da 0-acetil-xilana, Fração I.

Uma amostra de 20-25 cm de diâmetro foi moída em moinho Wiley, com peneira de 20 mesh. A madeira moída foi extraída em Soxhlet, durante 24 horas, com mistura de benzeno-etanol (2:1,v/v), (2). O extrato foi descartado e o resíduo, após secar na capela, foi submetido a sucessivas extrações, por 5 horas, em banho-maria (70°) com solução de EDTA 0,2%(193), alternadas com solução de oxalato de amônio 0,25% (23). O resíduo foi lavado com água à mesma temperatura e secado ao ar. Após estes tratamentos, o resíduo foi delignificado por uma combinação de métodos descrita por Green (83). O pó (30g) foi submetido a 3 tratamentos com cloro, em água gelada ($\sim 4^{\circ}$), durante 5 minutos . Ao final de cada tratamento, o material foi filtrado, o

resíduo lavado com água gelada e em seguida com álcool. A lignina clorada foi extraída com solução fervente de etanolamina alcoólica (3 % v/v). O resíduo foi filtrado e submetido à extração exaustiva com álcool, em soxhlet. A clorolignina foi analisada por U.V. A holo celulose obtida (28,5 g) foi tratada com DMSO (31) em frasco fechado, a vácuo, em shaker a 28° durante 1 semana. Após filtração, a fração polissacarídica foi precipitada com etanol (4 v) e o meio tratado com ácido acético diluído.

O precipitado foi dissolvido em água, centrifugado 5 minutos a 2.000 x g. Descartado o resíduo, o sobrenadante foi dialisado contra água destilada por 48 horas e reprecipitado por etanol. O precipitado foi lavado com etanol e acetona sucessivamente e secado em aparelho de Abderhalden (rendimento 1.8g, 6%) $[\alpha]^{25}_{D} -62$ (C 1, H₂O); carboidrato total 72%; O-cetil 14% (96); ácido urônico 13% (25) em relação ao carboidrato dosado; lignina 6% (15); proteína 0,8% (104); em relação ao peso.

2.2.2 Preparo das O-acetil-xilanas - frações II e III.

Discos obtidos em diferentes alturas de caules provenientes de 5 árvores diferentes, foram convertidos a serragem, que foi deslipidificada com solução de Benzeno-Etanol (2:1 v/v), a 28°, em Shaker, 3 vezes (12 horas cada). O resíduo (30g) foi tratado com cloro, em água gelada, da mesma forma que a fração I. Para remover a lignina degradada o resíduo foi extraído com etanol 3 vezes (12 horas cada) à temperatura ambiente, com agitação. O material insolúvel foi extraído com DMSO, conforme descrito para a fração I (rendimento 0,4%); carboidrato total 76%; ácido urônico 15%; acetil 9%.

Em experimento similar, apenas utilizando-se etanol fervente em vez de etanol a frio, obteve-se a fração III (rendimento 0,5%) carboidrato total 77%, ácido urônico 15% e acetil 8,2%.

2.2.3 Preparo da O-acetil-xilana, fração IV.

Neste caso, o pó da madeira (usado na fração I) foi deslipidificado em Soxhlet com uma solução de benzeno etanol (2:1 v/v) e em seguida tratado três vezes com oxalato de amônio a 70°, por 5 horas, seguido por extração com EDTA 0,2% (193). Em seguida ao tratamento com cloro (da mesma forma que a fração I), o material, após secar, foi extraído em soxhlet, com etanol (55-60°) durante 20 horas. O polissacarídeo foi obtido por extração com DMSO, da maneira usual (rendimento 0,3%); carboidrato total 76%; ácido urônico 13%; acetil 11,4%.

Todas as 4 frações foram hidrolisadas com TFA 1 N, reduzidas, acetiladas e analisadas por g.l.c. (col a e b).

2.2.4 Preparo das xilanas parcialmente acetiladas por síntese (Frações V e VI) e da xilana peracetilada.

Xilana (0,5g , da Nutritional Biochemicals corp, Cleveland Ohio) foi dissolvida em formamida (20/ml) permanecendo em um banho-maria fervente durante 16 horas. Piridina (0,3ml) foi adicionada , mantendo-se o sistema em agitação. Adicionou-se então, gota a gota, uma solução de anidrido acético (0,18 ml; 0,5 equivalentes) em formida (3ml) e a mistura reativa permaneceu à temperatura ambiente por 16 horas, sendo a reação interrompida com água gelada, a mistura dialisada e liofilizada (Fração V). Em outro experimento nas mesmas condições, utilizou-se 1 equivalente de anidrido acético (0.36 ml) por mol de xilana, obtendo-se a fração VI. Em um terceiro experimento , utilizou-se 10 equivalentes de anidrido acético (3,6 ml) por mol de xilana, obtendo-se a xilana , peracetilada.

2.2.5 Extração alcalina, preparo das hemiceluloses A e B.

A mesma serragem deslipidificada e despectinizada utilizada para a obtenção da fração I, foi submetida a extração com hidróxido de sódio a 8% sob atmosfera de nitrogênio (fluxo contínuo), durante 16 horas, a temperatura ambiente, com agitação, de acordo com Whistler and Feather (188). Boroidreto de sódio foi utilizado durante a extração a fim de evitar a degradação oxidativa dos polissacarídeos. O resíduo foi filtrado por pano, a vácuo e lavado exaustivamente com água destilada. O extrato alcalino e os líquidos de lavagem foram reunidos e neutralizados com ácido acético a 50%, até pH 5. Nestas condições a fração hemicelulose B permaneceu em solução. As duas frações hemicelulósicas foram separadas por centrifugação, após 24 horas de repouso a 4^o. O precipitado de hemicelulose A foi lavado sucessivas vezes com água acidulada com ácido acético a pH 4,5 (para eliminar traços de HB e sais), redissolvido em NaOH 1 N, em atmosfera de nitrogênio e centrifugado (para eliminar eventuais traços de serragem). O sobrenadante foi dialisado contra água corrente durante 48 horas, precipitado com etanol (4v), lavado duas vezes com acetona e secado a vácuo no aparelho de Abderhalden, a 50^o, $[\alpha]_D^{25} = -60$; lignina 1,4%; proteína 0,9%. A fração hemicelulose B foi concentrada em evaporador a vácuo a 40^o, precipitada com etanol (4v)

e centrifugada 15 minutos a 2.000xg. O precipitado, (hemicelulose B) foi dissolvido em NaOH diluída, neutralizado com ácido acético a pH 5, centrifugado 10 minutos a 2.000xg, e o sobrenadante límpido dialisado durante 48 horas em água corrente. A hemicelulose B foi reprecipitada e lavada com etanol e acetona e secada a vácuo a 50° em aparelho de Abderhalden, $[\alpha]_D^{20} - 63,3$; lignina 1,4%; proteína 1%.

2.2.6 Obtenção de Klason Lignina (3).

O pó de bracinga (lg) deslipidificado e despectinizado foi tratado com H₂SO₄ 72% (15 ml) por duas horas, a frio. Após diluir a concentração do ácido para 7%, a hidrólise foi completada, por 5 horas sob refluxo. O material foi filtrado por placa porosa e lavado com água destilada até que todo o ácido foi eliminado. O resíduo Klason lignina (padrão) foi secado a vácuo, em atmosfera de pentóxido de fósforo e analisado por UV e IR.

As frações hemicelulósicas, O-acetil-xilana, (fração I), hemicelulose A e B receberam o mesmo tratamento que o pó de madeira. Os resíduos insolúveis foram coletados por centrifugação, lavados com água até pH neutro, secados em atmosfera de pentóxido de fósforo, pesados e analisados por UV e IR comparativamente ao padrão de Klason lignina.

Os resíduos das hidrólises ácidas das hemiceluloses, o padrão de Klason lignina e um padrão de álcool coniferílico previamente tratado com ácido foram tratados com boroidreto de sódio, acetilados e analisados por g.l.c. (coluna b).

2.3 LOCALIZAÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS NAS XILANAS, PELO MÉTODO DE BOUVENG MODIFICADO POR CORRÊA

A determinação de grupos O-acetílicos nas xilanas foi feita pelo método de Hestrin (96) e a localização dos mesmos pelo método de Bouveng (30) modificado por Corrêa et al (47).

2.3.1 Tratamento das xilanas com fenilisocianato.

As xilanas (frações I, II, III, IV, V e VI) foram secadas a vácuo, em atmosfera de pentóxido de fósforo, e toda a sequência que conduziu a localização dos grupos O-acetílicos foi efetuada para

cada fração. Uma alíquota de cada (50 mg) foi dissolvida em N,N dimetilformamida anidra (5ml) e tratada com fenilisocianato durante 12 horas a 50^o (19). O polissacarídeo foi precipitado com etanol, centrifugado, lavado 3 vezes com o mesmo solvente, secado a vácuo em atmosfera de pentóxido de fósforo e submetido a um segundo tratamento com fenilisocianato, nas mesmas condições.

Os derivados fenil carbamato dos O-acetil xilanas foram analisados por IR.

2.3.2 Metilação e desacetilação simultânea das O-acetil-xilanas-fenilcarbamato.

Cada amostra (50 mg) foi dissolvida em tetrahidrofurano anidro (10 ml) contendo hidróxido de sódio pulverizado e seco (1 g). O sistema foi mantido sob agitação e dimetilsulfato (1.5 ml) foi adicionado gota a gota. Após 24 horas a temperatura ambiente, a reação foi interrompida. O sistema foi resfriado a 0^o, o excesso de NaOH neutralizado com H₂SO₄ 0,5 M e o tetrahidrofurano removido por destilação. A xilana fenilcarbamato metilada foi extraída com clorofórmio e a solução clorofórmica tratada com sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente o material foi secado em atmosfera de pentóxido de fósforo. Toda a operação foi repetida.

2.3.3 Remoção dos grupos fenilcarbamoilas.

A xilana fenilcarbamato metilada foi dissolvida em DMSO (5 ml) e tratada com hidreto de sódio, permanecendo a temperatura ambiente durante 16 horas. O metilsulfinil carbanion formado em excesso foi decomposto pela adição de água (0,25 ml) e o polissacarídeo parcialmente metilado foi precipitado com etanol (3 vol), ressuspendido em água, precipitado com etanol e secado.

2.3.4 Metanólise das xilanas parcialmente metiladas.

O polissacarídeo parcialmente metilado (10 mg) foi tratado com metanol contendo cloreto de hidrogênio a 3%, a 100^o, durante 5 horas. A mistura reativa foi neutralizada com carbonato de prata e filtrada em placa porosa. O sobrenadante foi concentrado e analisado por g.l.c. na coluna (c).

2.3.5 Hidrólise, redução e acetilação das xilanas parcialmente metiladas.

Uma amostra da xilana parcialmente metilada (20 mg) foi tratada com H_2SO_4 a 72% (0,5 ml) a frio, durante 1 hora. Adicionou-se H_2O (4 ml) e o material foi hidrolisado a 100° durante 4 horas. Após neutralização com carbonato de bário, os açúcares foram reduzidos com $NaBH_4$, acetiladas, e os acetatos de alditois analisados por g.l.c. nas colunas (a) e (d).

2.3.6 Análise das O-acetil-xilanas por ^{13}C - n.m.r.

As O-acetil-xilanas foram analisadas por ^{13}C -n.m.r., conforme os materiais e métodos gerais.

2.4 ESTUDO DE MIGRAÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS NOS POLISSACARÍDEOS.

2.4.1. Tratamento das O-acetil-xilanas (frações V e VI) com cloro.

Soluções das O-acetil-xilanas (100 mg) em água (20 ml) foram esfriadas a 0° e cloro foi borbulhado durante 15 minutos, mantendo-se a temperatura com adição de gelo. O material foi dialisado durante 18 horas, liofilisado e analisado por ^{13}C - n.m.r.

2.4.2 Tratamento das O-acetil-xilanas a 70° (frações V e VI)

Soluções das O-acetil-xilanas (25 mg) em água (5 ml), foram aquecidas a 70° , durante 64 horas. O mesmo tratamento foi realizado com as amostras dissolvidas em dimetilsulfóxido. Os polissacarídeos foram também refluxados em etanol, permanecendo em suspensão, durante 18 horas. Após este tratamento as amostras foram analisadas por ^{13}C - n.m.r.

2.5 SÍNTESE DOS PADRÕES METIL 2-O-ACETIL-4-O-METIL -
β-D-XILOPIRANOSÍDEO E METIL 3-O-ACETIL-4-O-METIL -
β-D-XILOPIRANOSÍDEO (fig. 11) .

2.5.1 Obtenção do metil 3,4-O-isopropilideno - β-D-arabinopirano-
sídeo.

Metil β-D-arabinopiranosídeo (1, fig.11) (sigma,10g), foi agitado em acetona (400 ml), contendo uma gota de ácido sulfúrico e sulfato de cobre anidro. Após 18 horas a suspensão foi filtrada e o filtrado neutralizado pela rápida adição de piridina (10 ml). A solução foi evaporada a um xarope e agitada com uma mistura de acetato de etila (450 ml) e bicarbonato de sódio aquoso a 5% (50 ml). A fase do acetato de etila foi separada (por partição) e evaporada a um xarope (7,7g), contendo o derivado 3,4-isopropilideno (2). O metil glicosídeo original que não tenha reagido permaneceu na fase aquosa.

2.5.2 Obtenção do metil 3,4 - O-isopropilideno 2-O-p-toluenosulfonil
β-D-arabinopiranosídeo (3).

Metil 3,4-O-isopropilideno β-D-arabinopiranosídeo (7,7 g) em piridina (100 ml) foi tratado com cloreto de p-toluenosulfonila (13g), por 20 h a 40°. O sistema foi esfriado com a mistura de gelo-seco-acetona e água. O excesso de reagente foi destruído após o sistema atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se clorofórmio (400 ml) e solução de bicarbonato de sódio a 5% (100 ml). Após agitar, a camada clorofórmica foi evaporada a fim de promover a cristalização. O produto (3) foi recristalizado em etanol (11,9g) e apresentou ponto de fusão 133°, de acordo com a literatura. (134) .

2.5.3 Obtenção do metil 2,3-anidro-β-D-ribopiranosídeo (5).

Metil 3,4-O-isopropilideno - 2-O-p-toluenosulfonil β - D - arabinopiranosídeo (11,9g) foi parcialmente hidrolisado com ácido acético a 80% (100 ml), a 100° durante 4 horas. A solução foi evaporada e o resíduo secado exaustivamente a fim de remover completamente o ácido acético. O produto resultante, metil 2-O-p-toluenosulfonil β-D-arabinopiranosídeo (4) foi tratado com metóxido de sódio (2g de sódio 500 ml metanol). Após 18 horas a temperatura ambiente, a solução foi neutralizada com gelo seco e evaporada a um resíduo

que foi tratado com acetato de etila e água (partição). A fase do acetato de etila foi evaporada obtendo-se o metil 2,3-anidro- β -D-ribopiranosídeo (5) cru. O bicarbonato de sódio e p-toluenosulfonato de sódio permaneceram na fase aquosa (14).

2.5.4 Obtenção do metil 2,3-anidro-4-O-metil β -D-ribopiranosídeo (6)

O metil 2,3 anidro β -D-ribopiranosídeo (3,6 g) previamente obtido, foi agitado em iodeto de metila (20 ml) contendo óxido de prata (12 g) e peneira molecular (4 A, 10 g). A finalidade da peneira molecular foi remover a água que poderia reagir formando subprodutos. Após 18 horas a mistura reativa foi diluída com diclorometano, filtrada e o filtrado evaporado. O resíduo foi cristalizado em hexano, originando o metil 2,3 -anidro 4-O-metil- β -D-ribopiranosídeo (3,05g) (6) com ponto de fusão 76° (100).

2.5.5 Metil 3-O-benzil -4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (7).

Potássio (0,1g) foi dissolvido em álcool benzílico (5 ml), sob fluxo contínuo de nitrogênio a fim de prevenir combustão. Adicionou-se metil 2,3-anidro-4-O-metil β -D-ribopiranosídeo (6; 0,7g) e a mistura foi mantida a 125° durante 4 horas. A solução foi neutralizada com ácido acético, adicionou-se água (50 ml) e o produto metil-3-O-benzil-4-O-metil β -D-xilopiranosídeo (7) foi extraído com clorofórmio (100 ml). Após a evaporação do solvente, o resíduo cristalisou e foi recristalizado em hexano, dando um produto (0,83g), m.p. 120° , $[\alpha]_D^{25} - 42^{\circ}$ (c 1,3 etanol); ^{13}C -n.m.r. 100 MHz (cloroformio-d); δ 138.6, 128.5, 127.9, 127.8 (carbonos aromáticos), 103,9 (C-1), 81.0, 79.0, 74.1 (CH₂ do benzil), 72.2, 62.0 (C-5), 58,4 e 56.7 (OCH₃). Análise elementar calculada para C₁₄H₂₀O₅: C, 62.67; H, 7.51. Valor encontrado C, 62.78; H, 7.45.

2.5.6 Metil-2-O-acetil-3-O-benzil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (8).

O composto 7 (0,67g) foi dissolvido em piridina (2 ml) contendo anidrido acético (1 ml), aquecido a 100° durante 15 minutos e evaporado até a obtenção de um xarope. A recristalização em hexano originou o produto (8) (0,65g) m.p. 42° , $[\alpha]_D^{25} - 18^{\circ}$ (c 0.8, etanol). ^{13}C -n.m.r.; 100 MHz (cloroformio-d) δ 169.6 (C=O), 138.5, 128.4, 127.8, 127.6 (carbonos aromáticos) 102.2 (C-1), 80.5, 79.6, 74,2 (CH₂ do benzil), 72.1, 62.9 (C-5), 58.7, 56.4 (OCH₃'s), 21,0 (CH₃). Análise elementar calculada para C₁₆H₂₂O₆: C, 61.92; H, 7.15 Encontrado: C, 61.98; H, 7.15.

2.5.7 Metil 2-O-acetil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (9).

Do composto obtido (8) (200 mg) foi removido o grupo benzil por hidrogenólise em ácido acético (10 ml) usando 5% de paládio em carvão ativo como catalizador. A mistura reativa foi filtrada e o filtrado liofilizado, originando um resíduo que foi extraído com diclorometano gelado. Obteve-se assim um dos produtos finais (9) (135 mg) $[\alpha]_D^{25} - 48^\circ$ (c 0,9 etanol). ^{13}C -n.m.r. 100 MHz (DMSO- d_6): 169,14 (C=O), 101,44 (C-1), 79.1, 73.4, 72.9, 62.7 (C-5) 58.1, 55.7 (OCH₃'s) 20.77 (CH₃). ^{13}C -n.m.r. (DMSO- d_6 a 50°): δ 169.04 (C=O), 101.50 (C-1), 79.1, 73.5, 72.8, 62.8 (C-5), 58.0, 56.6 (OCH₃'s) 20,70 (CH₃). ^{13}C -n.m.r. (D₂O): δ 174.74 (C=O), 102.8 (C-1), 79.5, 74.6, 73.3, 63.5 (C-5), 59.4, 58.0 (OH₃'s), 21.56 (CH₃). Análise elementar calculada para C₉H₁₆O₆: C 49,08 ; H 7,32. Encontrado: C, 49.22; H, 7.09.

2.5.8 Obtenção da mistura de 2-O- e 3-O-acetatos de metil 4-O-metil-β-D-xilopiranosídeos (9 e 14).

Metil 2,3-anidro-4-O-metil-β-D-ribopiranosídeo (6; 1,5g) foi tratado com uma solução de hidróxido de bário a 4% (50 ml), a 100°, durante 20 horas. Após tratamento com gelo seco, o carbonato de bário formado foi eliminado por filtração. O filtrado foi evaporado e, do resíduo cristalizado em eter, obteve-se o metil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (10; 1,04g). Ponto de fusão 93°. ^{13}C -n.m.r. 100 MHz (DMSO- d_6 , 50°): δ 104,40 (C-1) 79.3 (C-4), 75.3, 73.1, 62.7 (C-5) 57.9, 55.7 (OCH₃'s). O metil 4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (10; 0,54g) foi dissolvido em N,N. dimetil-formamida (3ml) e adicionou-se óxido de prata (3,0g). Brometo de benzila (0,43 ml ; 1,2 equivalentes) foi gotejado à suspensão, que foi mantida em agitação durante 18 horas. A mistura reativa foi diluída com diclorometano, filtrada e o filtrado evaporado até xarope. Análise em t.l.c. (solvente d) indicou sinais correspondentes ao material não modificado com (Rf 0,2; 10); mono O-benzil derivados (Rf 0,4 ; 11 e 7), e di-O-benzil derivado (Rf 0,7; 12). Por separação em coluna de ácido silícico obteve-se o di-O-benzil-derivado (0,08g; eluente: CHCl₃) e os mono-O-benzil derivados [0,35g; eluente CHCl₃-MeOH (50:1 v/v)]. A última fração contém os derivados 2- e 3-O benzilados (11 e 7) numa relação de 2,5:1 de acordo com a área do sinal de C-1 em ^{13}C -n.m.r. ^{13}C -n.m.r. do 2-O-benzil-derivado: (100 MHz , CHCl₃-d): δ 138.56, 128.50, 128.03, 127.81 (carbonos aromáticos), 104.8 (C-1), 82.0, 79.1, 75.1, 74.2, 63.2 (C-5), 58.7, 56.8 (OCH₃'s). Os sinais dos deslocamentos químicos do 3-O-benzil derivado já foram anteriormente indicados.

A mistura de 2- e 3-O-benzil derivados de 4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (11 e 7) foi tratada com anidrido acético e piridina conforme descrito nos métodos gerais e transformados em seus acetatos 13 e 8. ^{13}C -n.m.r. (100 MHz) do componente 3 - acetato (13) (CHCl_3 -d); δ 170,12 (C=O), 128.3, 127.9, 127.6 (carbonos aromáticos), 105.1 (C-1), 79.0, 77.6, 74.6, 74.2, 63.2 (C-5), 58.5, 56.45 (OCH₃'s) 21,07 (CH₃); (DMSO-d₆, 50°) δ 169.36, 104.1 (C-1), 76.9, 75.8, 70.9, 62.5 (C-5), 57.5, 55.9 (OCH₃'s), 20.79 (CH₃); (D₂O): δ 174.30 (C=O), 104.8 (C-1), 77.8, 76.9, 72.2, 63.7 (C-5), 59.2, 58.4 (OCH₃'s) , 21.68(CH₃). A remoção do grupo benzil com paládio em carvão ativo em ácido acético, na presença de hidrogênio resultou numa mistura de 3-O (14) e 2-O acetatos (9) de 4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos, numa relação de 2,3:1, conforme determinado por espectroscopia de ^{13}C -nmr.

2.6 ESTUDO DA MIGRAÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS NOS MODELOS MONOSSACARÍDICOS.

2.6.1 Migração dos grupos O-acetílicos dos derivados metil O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos. (9 e 14)

Os derivados 2-O e uma mistura contendo 70% do 3-O-acetil-xilopiranosídeos foram dissolvidos em D₂O e submetidos às seguintes condições: temperatura ambiente durante 3 dias; 50° durante 3 e 21 horas; 70° num intervalo de 0 a 100 horas; após cada tratamento as soluções foram analisadas por ^{13}C -n.m.r.

O derivado 2-O-acetil foi dissolvido em DMSO-d₆ e submetido as seguintes condições: temperatura ambiente durante 3 dias; 50° durante 21 horas; 70° durante 3 e 19 horas; após cada tratamento as soluções foram analisadas por ^{13}C -n.m.r.

2.6.2 Tratamento do metil 2-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (9) com cloro.

Numa solução aquosa de 9 (23 mg/5 ml) esfriada 0 a 4°, borbulhou-se gas cloro durante 15 minutos. O produto foi extraído com acetato de etila, que foi lavado com água (2 x), evaporado a um xarope, e analisado por espectroscopia ^{13}C -n.m.r. (D₂O).

2.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE A XILANA E COMPOSTOS FENÓLICOS (LIGNINA).

2.7.1 Fracionamento da O-acetil-xilana (Fração I) em coluna de DEAE celulose.

Uma amostra de O-acetil-xilana (fração I, 150 mg) em água (5 ml) foi aplicada a uma coluna (20 x 2 cm) de resina trocadora de ions, DEAE celulose, forma cloreto, e eluida sequencialmente com H₂O, soluções de NaCl (0.1, 0.3 e 1N) e com ácido acético 10%. O fluxo foi mantido a 2 ml/min. As 5 frações obtidas, de acordo com a ordem de eluição foram denominadas Ia, Ib, Ic, Id e Ie; alíquotas (2 mg) de cada fração foram hidrolisadas com TFA 1N, os açúcares convertidos a acetatos de alditois e analisados por g.l.c., (coluna b) conforme mostra a tabela VI.

A fração mais abundante (Ib) foi dialisada contra água corrente, durante 24 horas e precipitada com etanol (4 V). O precipitado, obtido por centrifugação foi lavado com etanol, acetona e secado a vácuo. (78 mg), $[\alpha]_D^{25} - 81$ (c 0,25 H₂O).

2.7.2 Filtração em gel das O-acetil-xilanas Fração I e Fração Ib.

As hemiceluloses (Fração I e Ib) foram dissolvidas (3 mg de cada) em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,2) e gel permeados isoladamente em coluna (38 x 0.8 cm) de Bio Gel P300. As colunas foram eluídas com o mesmo tampão e as frações analisadas para carboidrato (fenol sulfúrico) e lignina (D.O. a 280 nm). Os perfis de eluição estão mostrados na fig. 18.

2.8 ESTUDO DA LIGAÇÃO ESTER ENTRE O ÁCIDO 4-O-METIL-GLUCORÔNICO DA XILANA E COMPOSTOS FENÓLICOS (LIGNINA).

A hemicelulose (40 mg) em água (20 ml) foi tratada alternadamente com gotas de uma solução de boroidreto de sódio (1M) e de ácido bórico (1M), mantendo-se o pH em torno de 7-7,5. Após duas horas, adicionou-se NaBH₄ até pH 8,67 e a solução permaneceu em repouso por 12 horas. O polissacarídeo foi precipitado com etanol (4 V) e o sobrenadante analisado em UV (280 nm). O polissacarídeo precipitado foi suspenso em água e dialisado. Todo o processo foi repetido mais duas vezes. Ácidos urônicos e lignina foram determinados com

relação ao carboidrato total nas amostras antes e após as 3 reduções tamponadas, pelos métodos de carbazol (25) e Bar-lev (15) respectivamente.

Aliquotas da hemicelulose antes e após o processo de redução tamponada foram hidrolisadas com TFA 1N e os açúcares constituintes analisados na forma de acetatos de alditois. (coluna a).

2.9 OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS LIGNINA-CARBOIDRATO- ESTUDO DA LIGAÇÃO ÉTER ENTRE A XILANA E COMPOSTOS FENÓLICOS (LIGNINA).

2.9.1 Obtenção do complexo lignina-carboidrato por degradação dos carboidratos com metaperiodato de sódio.

Amostras da fração I (previamente desacetilada com alcali), hemicelulose A e hemicelulose B (100 mg) foram tratadas com solução de metaperiodato de sódio 0,05 M (20 ml), e mantidas à temperatura ambiente, na obscuridade, durante 15 dias. A reação foi interrompida pela adição de etileno glicol (0,5 ml) e as soluções dialisadas contra água corrente por 24 horas. As amostras foram então reduzidas com um excesso de NaBH_4 , durante 5 horas e dialisadas contra água corrente durante 24 horas. As frações não dialisáveis foram reoxidadas nas mesmas condições e, após redução e diálise, os produtos foram tratados com H_2SO_4 , sendo a concentração final do ácido 1N, por 24 horas. Os precipitados formados na adição do ácido foram centrifugados e lavados originando complexos lignina-xilose (LXC) precipitados. Os sobrenadantes foram dialisados em água corrente por 48 horas e concentrados a secura em evaporador rotatório, obtendo-se os complexos lignina-xilose (LXC) sobrenadantes.

2.9.2 Obtenção preparativa do complexo lignina-carboidrato (LXC), a partir de hemicelulose A.

Hemicelulose A (5 g) foi oxidada com periodato de sódio (2 x) da mesma forma que as amostras anteriores (HA, HB e fração I desacetilada). Os complexos lignina-xilose precipitado e sobrenadante obtidos, foram denominados, respectivamente LXC_1 e LXC_2 .

Outro complexo lignina carboidrato foi obtido a partir de hemicelulose A, por oxidação com metaperiodato de sódio (LXC_3). Neste

caso foi realizado somente um tratamento com metaperiodato de sódio.

2.9.3 Obtenção de lignina por hidrólise de Hemicelulose A com ácido trifluoracético.

Hemicelulose A (10g) foi hidrolisada com TFA 2N (1000 ml) durante 5 horas, a refluxo e, em seguida dialisada contra água corrente por 48 horas. O material não dialisável, foi centrifugado, lavado, secado e denominado lignina TFA. A lignina TFA (180 mg) foi acetilada com uma mistura de anidrido acético e piridina e analisada por ^1H -n.m.r. em solução de CDCl_3 .

2.10 ANÁLISE DOS COMPLEXOS LIGNINA-CARBOIDRATO.

2.10.1 Análises Gerais.

Os complexos lignina-xilose (LXC) foram analisadas por UV; IR, hidrolisados com H_2SO_4 72%, reduzidos, acetilados e analisados por g.l.c. na coluna b.

Amostras (20 mg) de LXC_1 e LXC_2 foram suspensas em DMSO seco (3 ml) e tratadas com metilsulfinil carbanion (4,5 meq) em atmosfera de nitrogênio, por 18 horas, a temperatura ambiente e dialisadas contra água corrente por 24 horas. O material não dialisável foi concentrado, hidrolisado com H_2SO_4 72%, reduzido com NABH_4 , acetilado e analisado por g.l.c. (coluna b). Tratamento semelhante foi feito utilizando-se NaOH e KOH 2N em vez do metilsulfinil carbanion.

2.10.2 Metilação dos complexos lignina-carboidrato (XLC) e do padrão de álcool coniferílico.

A metilação dos complexos lignina-carboidrato foi realizada pelo método de Hakomori (87), modificado por Sanford e Conrad (160). Amostras dos complexos obtidos (LXC_1 e LXC_2) e do padrão de álcool coniferílico foram dissolvidos em DMSO (5 ml) e tratadas com metilsulfinil carbanion (4,5 meq), em atmosfera de nitrogênio, sob constante agitação e à temperatura ambiente durante 5 horas. Formado o alcóxido, iodeto de metila (1 ml) foi gotejado. Após 16 horas, adicionou-se água à mistura reativa e o material foi extraído com

clorofórmio (3 x) concentrado à secura e metilado novamente, pelo mesmo método. Os produtos metilados foram hidrolisados com ácido fórmico 90% (3 ml, 2h, 100°). Após remoção do ácido fórmico por evaporação, a hidrólise foi completada com H₂SO₄ 0,5N a 100°, durante 12 horas. O excesso de ácido foi neutralizado com carbonato de bário e o material foi analisado por g.l.c. (coluna b) e t.l.c. (solvente b). A faixa do cromatograma que apresentou fluorescência em U.V. foi isolada por t.l.c. preparativa e analisada por g.l.c.-m.s.

Uma amostra de LXC₁ (10 mg) foi metilada 2 vezes, e hidrolisada com ácido sulfúrico 72% (0,5 ml) em banho de gelo por 1 hora. Adicionou-se água (4 ml) e a hidrólise foi completada a 100°, durante 4 horas. O produto foi reduzido, acetilado e analisado por g.l.c. (coluna a) e, analisado por g.l.c.-m.s. sem o fracionamento por t.l.c.

2.10.3 Filtração em gel do complexo lignina-carboidrato.

Aliquotas de LXC₂ (3 mg) foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7.2) e aplicadas separadamente em colunas (38x0.8 cm) de Bio Gel P30, P100 e P300. As colunas foram eluídas com o mesmo tampão. Frações (1,5 ml) foram coletadas a temperatura ambiente e analisadas para lignina (D.O. 280 nm) e carboidratos (D. O. 480 nm). Os perfis de eluição estão indicados na figura 31.A, B e C. O complexo lignina carboidrato (LXC₃ 3 mg), foi dissolvido em tampão fosfato 25 mM e aplicado:

- (a) em coluna (38 x 0,8 cm) de Sephadex G50 (fig. 32.A);
- (b) em coluna (38 x 0,8 cm) de Bio Gel P100 (fig. 32.B);
- (c) em coluna de DEAE celulose forma C1; a amostra foi eluída com água, o volume foi reduzido a 0,3 ml e o mesmo material foi aplicado em coluna de Bio-gel P300 (fig. 31.C).

Todas as frações coletadas foram analisadas para carboidrato e lignina.

2.11 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

Hemicelulose A (1 g) foi suspensa em água (45 ml) e aquecida a 70° durante 16 horas. Após esfriar, adicionou-se 4,5 ml de tampão acetato 0,5 M, pH 5 e 0,4 ml de uma solução de celulase Bio-ferm (20 mg/ml). Paralelamente fez-se um controle, contendo água, tampão e enzima. O experimento foi realizado a 36°.

Foram retiradas alíquotas nos tempos zero, 18,26 e 43 horas e determinado o poder redutor pelo método de Somogyi - Nelson (138). A amostra e o controle foram isoladamente precipitados com etanol gelado (4^o,3v) e centrifugados em centrífuga refrigerada (9.000 RPM, 15 minutos). O precipitado da amostra foi denominado HAEp₁. No sobrenadante etanólico do controle determinou-se DO a 280 nm (=zero) e no sobrenadante etanólico da amostra HAE s₁, determinou-se a concentração de açúcar total (332,0 mg) e a absorbância a 280 nm.

Após a remoção do etanol por evaporação a vácuo (40^o), observou-se que parte do material precipitou, o qual foi separado da porção solúvel em água. Esta foi aplicada em coluna de DEAE celulose, forma Cl⁻ e eluída sequencialmente com H₂O, NaCl 0,25N e NaOH 0,3N. As frações eluídas com NaCl e NaOH foram filtradas por coluna de Bio Gel P100 e eluídas com tampão fosfato, pH7,2 (perfis de eluição figura 33. I e II).

O material não hidrolisado pelo 1^o ciclo de hidrólise enzimática (HAEp₁) foi ressuscitado em 45 ml de H₂O e 4,5 ml de tampão acetato 0,5M e incubado nas mesmas condições anteriores. A partir de 23 horas não houve aumento de teor de açúcar redutor.

A uma alíquota desta solução (1 ml) adicionou-se o substrato original (200 ug) e determinou-se o poder redutor. Adicionou-se ao sistema total 0,2 ml de solução de enzima e alíquotas foram retiradas nos tempos zero, 5 h, 21 h, 29 h e 45 h. O material não hidrolisado foi precipitado (HAEp₂) com etanol a 4^o (3 vol), e centrifugado a 9.000 RPM durante 15' (experimento para testar a estabilidade da enzima).

O precipitado HAEp₂ total (328 mg) foi dissolvido em 45 ml de H₂O, e reincubado com 0,2 ml de solução de enzima. A fração não hidrolisada foi precipitada com etanol como das 2 vezes anteriores (HAEp₃).

O resíduo HAEp₃ (284 mg) foi suspenso em água; uma alíquota foi dissolvida em NaOH diluída e centrifugada. No sobrenadante determinou-se o espectro de absorção por U.V.

O material HAEp₃ foi tratado com NaBH₄, a quente, dializado e novamente centrifugado. O precipitado foi descartado e o sobrenadante desproteínizado 3 x pelo método de Sevag (175). Uma alíquota

do material desproteínizado foi aplicada em coluna de Bio Gel P100 e eluído com tampão fosfato 25 mM; pH7,2 (figura 34).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.

Escolhido o caule de Mimosa scabrella como modelo para o estudo da O-acetil-xilana e complexo lignina-xilana em madeiras duras, procurou-se inicialmente um método de extração que preservasse as características nativas do polímero. Para obter uma amostragem média representativa foram utilizados discos de madeira provenientes de diferentes alturas (base, meio e topo), de 5 árvores, com idades de 4 a 7 anos. Após moagem, o pó foi tratado com uma mistura de benzeno e etanol, a fim de se eliminar lipídeos, ceras e pigmentos. Este tratamento é normalmente realizado em Soxhlet (2) durante tempo prolongado. Entretanto para evitar aquecimento, fator passível de causar migração de grupos O-acetílicos, nas frações II e III estas extrações foram feitas em "Shaker", a 28^o; os tratamentos com oxalato de amônio e EDTA a 70^o, (23, 193), foram evitados na obtenção das frações II e III. A pectina ocorre em baixas concentrações em caules lenhosos, e foi eliminada nas sucessivas lavagens com H₂O, no processo de delignificação com cloro.

O dimetilsulfóxido é considerado um bom solvente para a obtenção de polissacarídeos não desnaturados (85). É um solvente aprótico, isto é não contém hidrogênio acídico, polar, e possui constante dielétrica moderadamente alta. [(CH₃)₂ S=O]. É miscível com a maioria dos solventes orgânicos e com a água, sendo fortemente higroscópico e recuperável por destilação sob pressão reduzida. Observou-se, porém, que sua ação extrativa é extremamente baixa sem a prévia delignificação da madeira. Assim, a delignificação é um passo decisivo no processo e pode, em alguns casos, alterar os polissacarídeos. Bouveng (30), trabalhando com caule de bétula, utilizou o método do clorito (182), a 60^o, pH 4,5 e obteve uma holocelulose cujo conteúdo em lignina era menor que 1%. O método consiste em suspender o pó, previamente extraído, com ácido acético e clorito de sódio, sob agitação e aquecimento durante 5 a 7 horas. Após decantação, o pó da madeira deve ser lavado até que todo o ácido seja eliminado. O produto final deve conter de 2 a 3% de Klason lignina (3); a completa remoção da lignina implica em perda de carboidratos.

Timell (179) e Bouveng e colaboradores (28) concluíram que a delignificação com cloro em água gelada não promove perdas de grupos O-acetílicos. Entretanto, Garegg (72) demonstrou que a remoção da clorolignina com etanolamina (2-amino-etanol) alcoólica, a quente, causa migração de grupos O-acetílicos. Devido a estes fatos, optou-se pela delignificação com cloro, de acordo com Green (83).

Na obtenção da fração I foi utilizada solução de etanolamina alcoólica a quente para extrair a clorolignina, enquanto que nas frações II, III e IV esta solução alcalina foi descartada, utilizando-se em seu lugar, respectivamente, etanol a frio, etanol fervente e etanol a refluxo em Soxhlet. O rendimento em polissacarídeos na extração subsequente com DMSO foi baixo, conforme indicado na tabela I, fato que foi atribuído à grande quantidade de lignina remanescente na holocelulose. Na fração I, somente 5% da lignina original foi removida, indicando que, mesmo neste caso, com a utilização de etanolamina a delignificação foi baixa, embora Bouveng utilizando processo mais drástico obteve um alto rendimento de delignificação (30). Por outro lado uma delignificação drástica poderia alterar os polissacarídeos. A fração II, na qual a clorolignina foi extraída somente com etanol a frio, representa a hemicelulose nativa. A extração da clorolignina com etanol fervente e etanol em Soxhlet utilizados respectivamente nas frações III e IV tiveram 2 objetivos: aumentar o rendimento na extração com DMSO, o que efetivamente não ocorreu (tabela I), e verificar se o refluxo em etanol seria fator de migração de grupos O-acetílicos, conforme será discutido mais adiante.

A hidrólise com TFA 1 N, seguida de redução, acetilação e análise por g.l.c. (coluna b) indicou que todas as frações são constituídas essencialmente por unidades de D-xilose, contendo traços de D-ramnose, L-arabinose, D-glucose, D-manose e D-galactose. As O-acetil-xilanas obtidas são solúveis em água e contêm grupamentos O-acetílicos e ácidos urônicos, nas proporções indicadas na tabela I.

As hemiceluloses A e B foram obtidas através de extrações alcalinas convencionais (191).

Observou-se que todas as hidrólises ácidas das hemiceluloses deram origem a um resíduo insolúvel, que apresentava absorção na região de 280 nm. Este material foi comparado com Klason lignina (3) de bracinga. As hemiceluloses A, B e O-acetil-xilana (fra-

Tabela I - COMPOSIÇÃO E RENDIMENTO DAS O-ACETIL-XILANAS
(FRAÇÕES I a IV), OBTIDAS DE CAULE DE M.SCABRELLA.

Polissacarídeo	Rendimento % ^a	Xilose % ^b	Ácido Urônico% ^c	Acetil ^d
Fração I	6,0	72	13	14,0
Fração II	0,4	76	15	9,0
Fração III	0,5	77	15	8,2
Fração IV	0,3	75	13	12,0

^a Em relação ao pó de madeira pré-extraído com Benzeno-Etanol

^b Pelo método fenol-sulfúrico (51).

^c Pelo método do carbazol (25).

^d Pelo método de hidroxilamina (96).

ção I) foram submetidas a hidrólise ácida total. Os resíduos insolúveis isolados por centrifugação bem como a Klason lignina e um padrão de álcool coniferílico (monômero de lignina, ver pag.13) quando tratados com boroidreto de sódio, acetilados e analisados por g.l.c. (colb) apresentaram um componente que se repetiu em todas as análises, com tempo de retenção de 10,4, relativo a um padrão de 1,5 - di-O-acetil-2,3, 4,6 - tetra - O-metil-D-glucitol (figs. 1-5). Esta análise sugere a presença de lignina nas frações hemicelulósicas conforme mostra a tabela II. A lignina foi determinada pelo método de Bar-Lev (15). A fig. 6 mostra o espectro de U.V. da O-acetil xilana (fração I) dissolvida em água, que é característico de lignina. Os espectros de U.V. de diferentes tipos de lignina são usualmente semelhantes apresentando um máximo na região de 230 nm que vai decrescendo, ocorrendo um ombro na região de 280 nm; o decréscimo continua a medida que se aproxima a região do visível (76). Os carboidratos não são detectados nesta região do espectro.

Conforme já citado na introdução(43,50,143) estudos realizados neste Departamento caracterizaram a O-acetil-xilana (fração I), a HA e a HB como xilanas lineares, ligadas glicosidicamente por ligações tipo β (1 \rightarrow 4) e que contém ácido 4-O-metil-glucurônico ligado no carbono 2 de algumas unidades de D-xilopiranoses.

As xilanas acetiladas sinteticamente, frações IV e V, contendo respectivamente 4 e 8 % de O-acetil (96) foram preparadas com a finalidade de se comparar a localização dos grupos O-acetílicos entre estas e as nativas.

Observando-se a tabela I verifica-se que a quantidade de O-acetil varia nas frações isoladas. Conforme indicado em materiais e métodos, as frações I e IV provem de uma amostra isolada de caule, enquanto que as frações II e III representam a média de várias árvores. Isto sugere a possibilidade de variação em conteúdo de grupos O-acetílicos em amostras provenientes de árvores com diferentes estágios de desenvolvimento e condições ambientais.

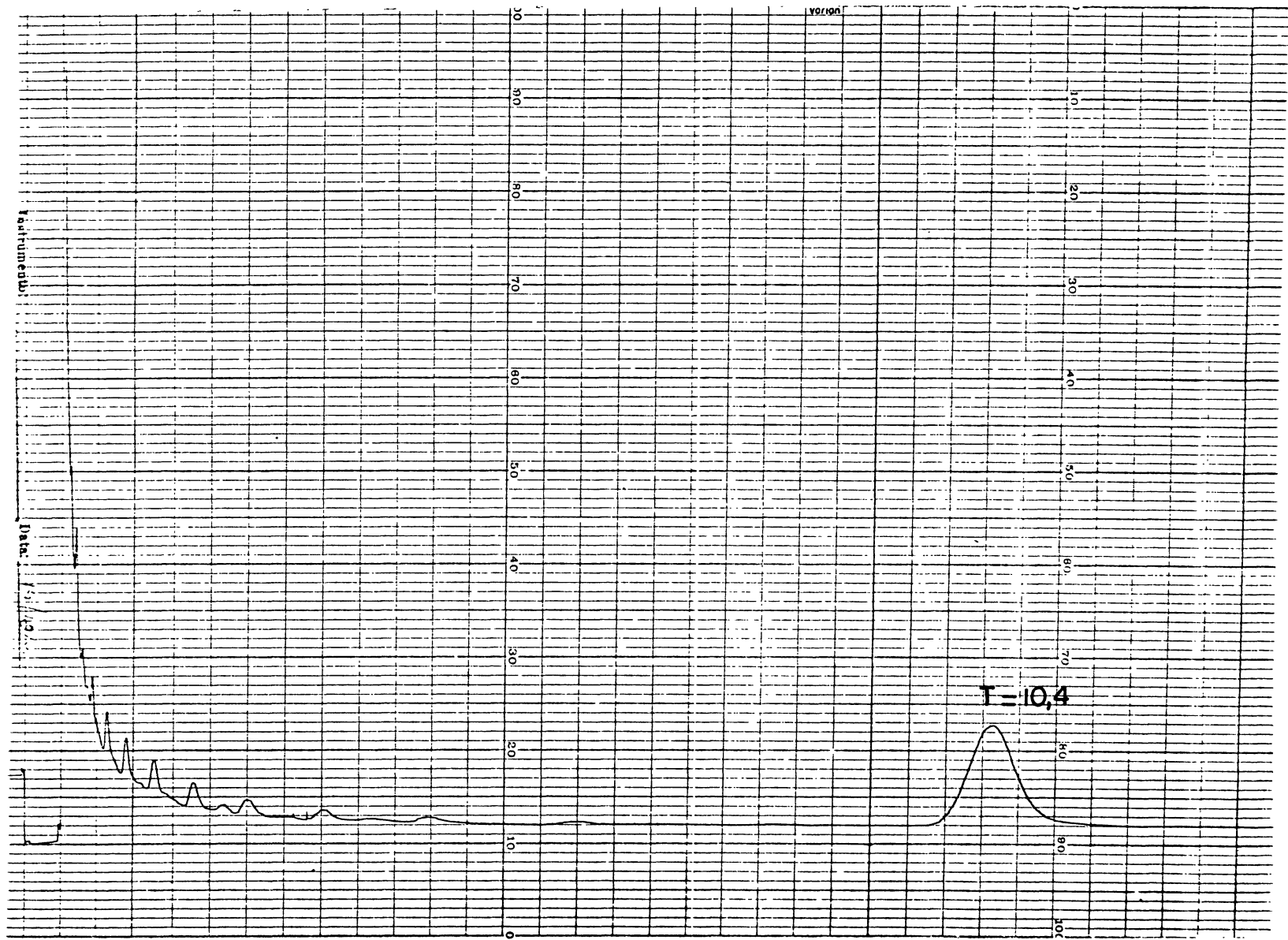


Fig. 1- Cromatograma em g.l.c. (col. b) de Klason ligninã acetilada, obtida do caule de M.scabrella.

T = 10,4 em relação ao 1,5 - di-O-acetil - 2, 3, 4, 6 - tetra-O-metil-D-glucitol.

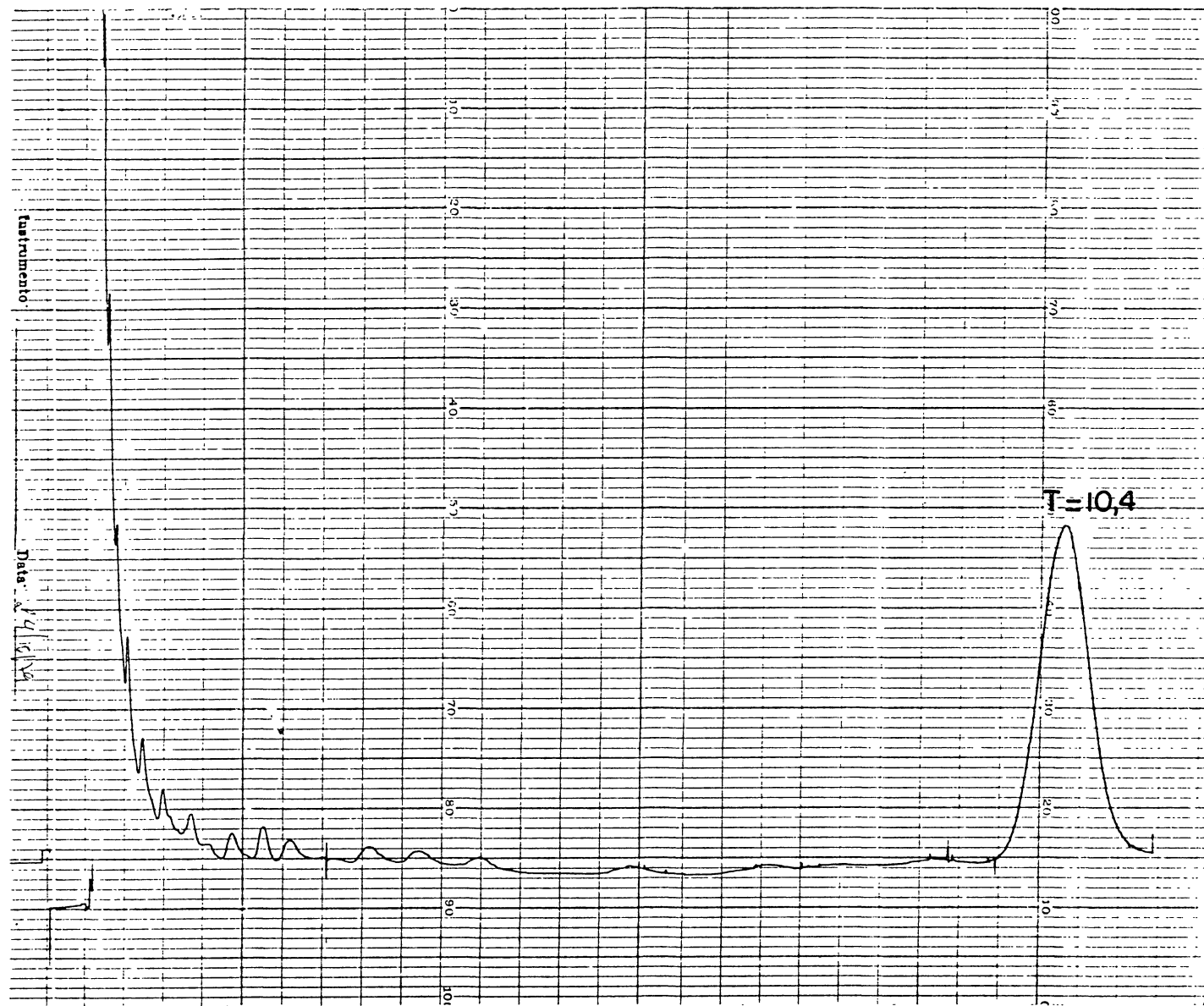


Fig. 2- Cromatograma em g.l.c. (col. b) do resíduo da hidrólise ácida (Saeman), após acetilação, da O-acetil xilana (Fração I), obtida do caule de M.scabrella.

T = 10,4 em relação ao 1,5 -di-O-acetil- 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

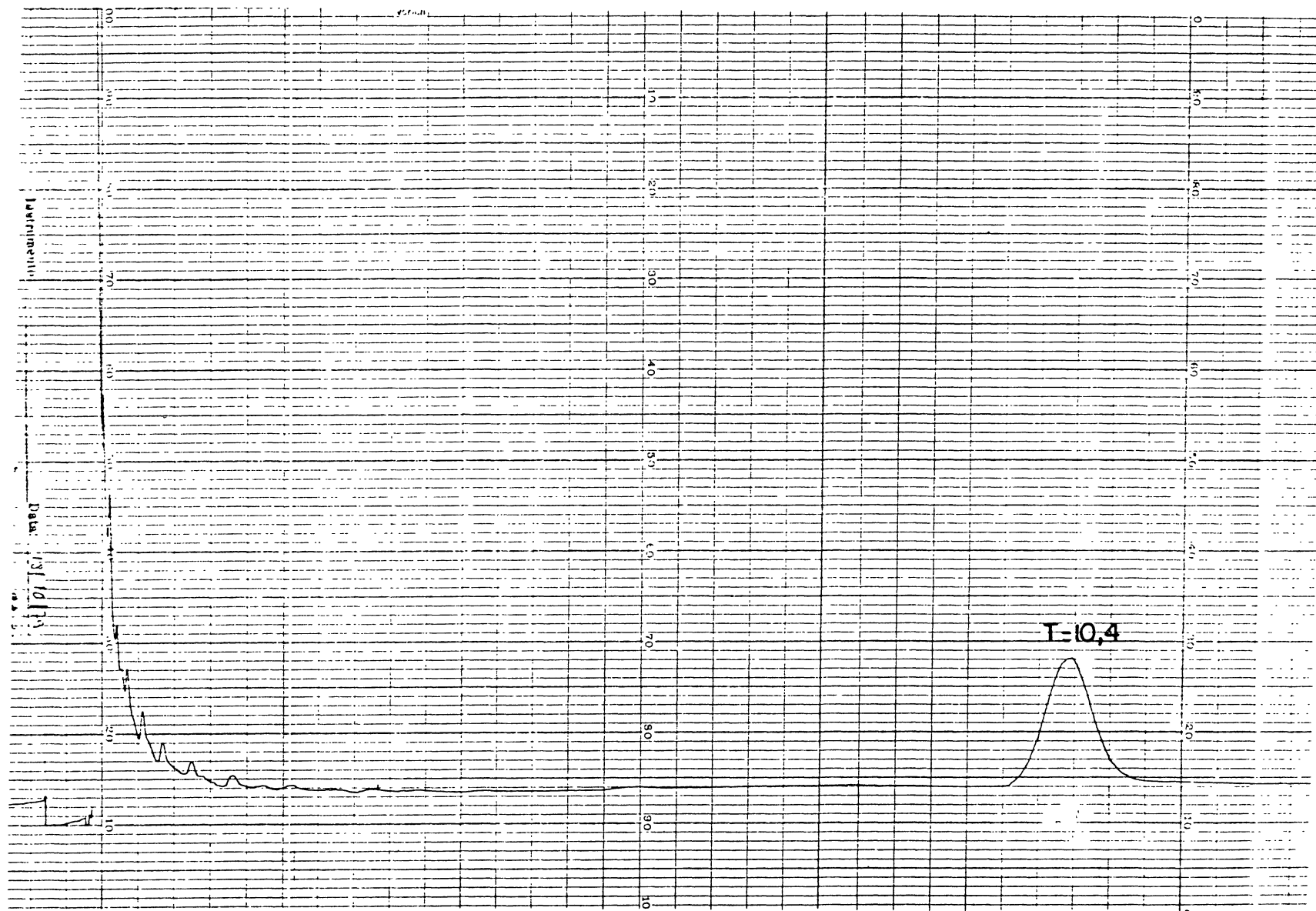


Fig. 3- Cromatograma em g.l.c. (col. b) do resíduo da hidrólise ácida (Saeman), após acetilação, da hemicelulose A obtida do caule de M. scabrella.

T = 10,4 com relação ao 1,5 - di-O-acetil - 2, 3, 4, 6 - tetra-O-metil-D-glucitol

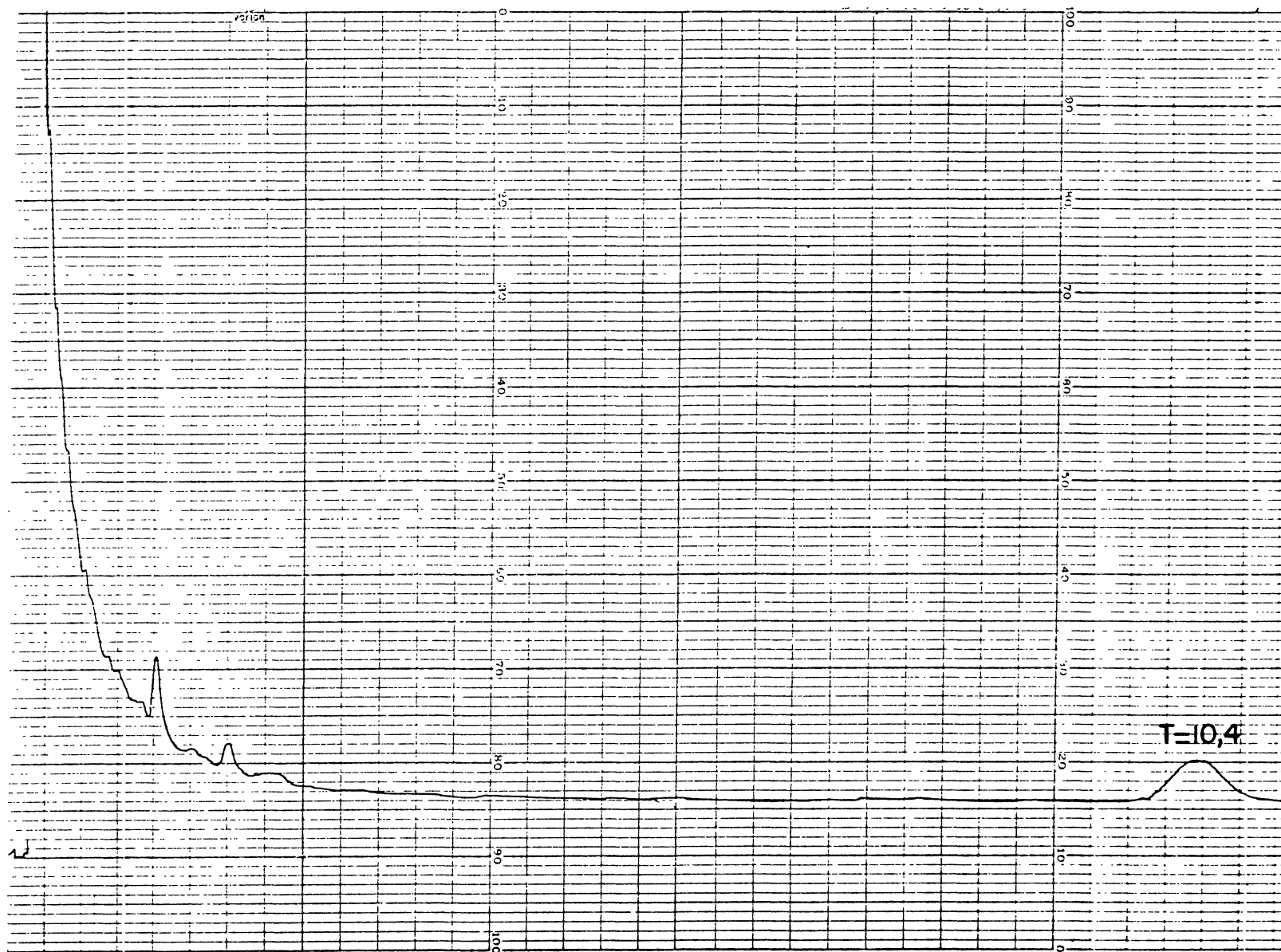


Fig. 4- Cromatograma em g.l.c. (col. b) do resíduo da hidrólise ácida (Saeman) após acetilação, da hemicelulose B obtida do caule de *M. scabrella*.

T = 10,4 com relação ao 1,5 - di-O-acetil- 2, 3, 4, 6- tetra-O-metil-D-glucitol.

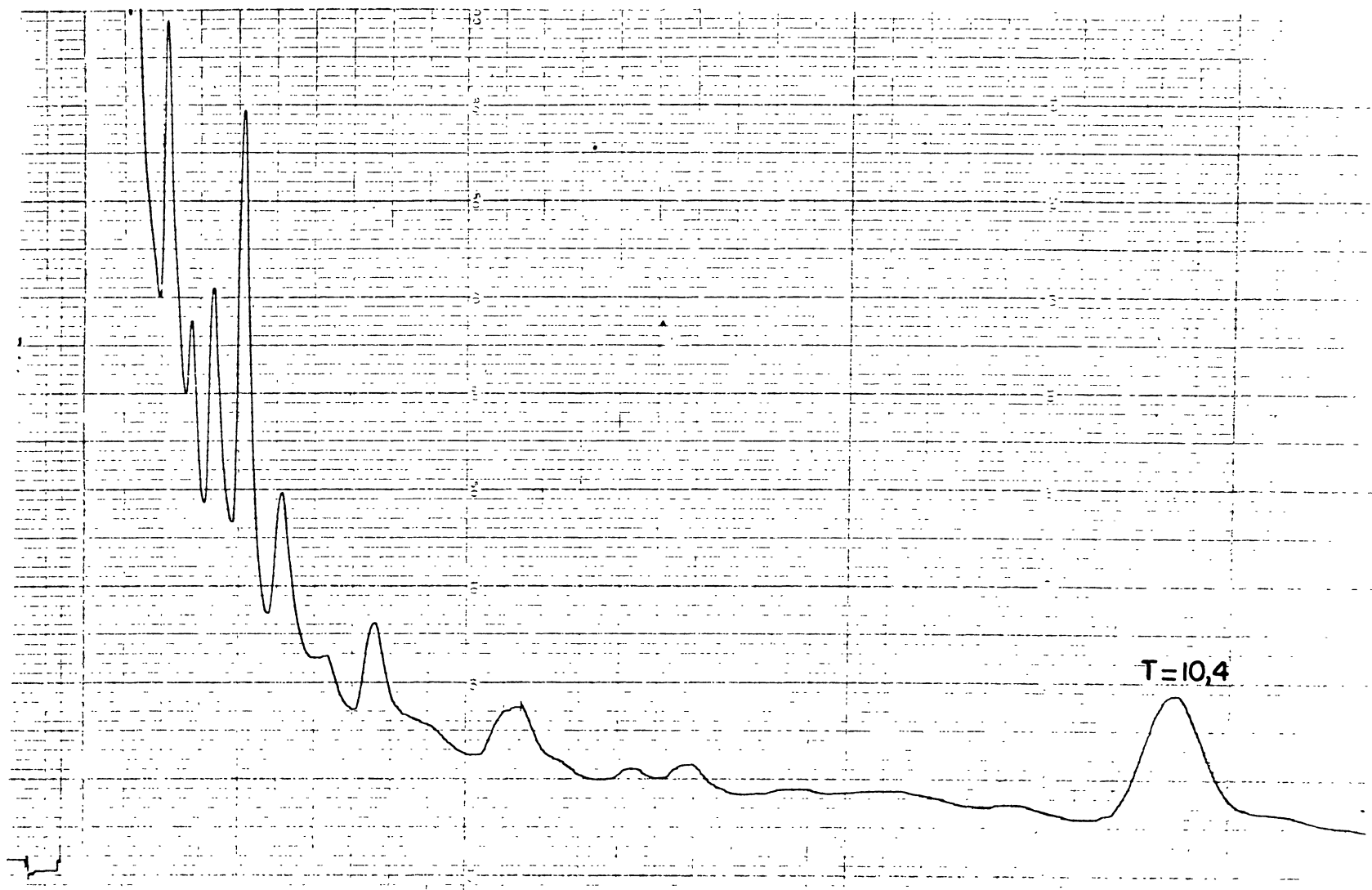


Fig. 5- Cromatograma em g.l.c. (col. b) do Álcool Coniferílico, tratado com H_2SO_4 , (Saeman) e acetilado.

T = 10,4 com relação ao 1,5 - di-O-acetil - 2, 3, 4, 6 - tetra-O-metil-D-glucitol.

Tabela II- DETERMINAÇÃO DE LIGNINA NA FRAÇÃO I
E HEMICELULOSES A e B.

Polissacarídeo	Lignina ^a %
Fração I	6,0
Hemicelulose A	1,4
Hemicelulose B	1,5

^a Determinado pelo método de Bar-Lev, (15),
com relação a um padrão de álcool coniferílico.

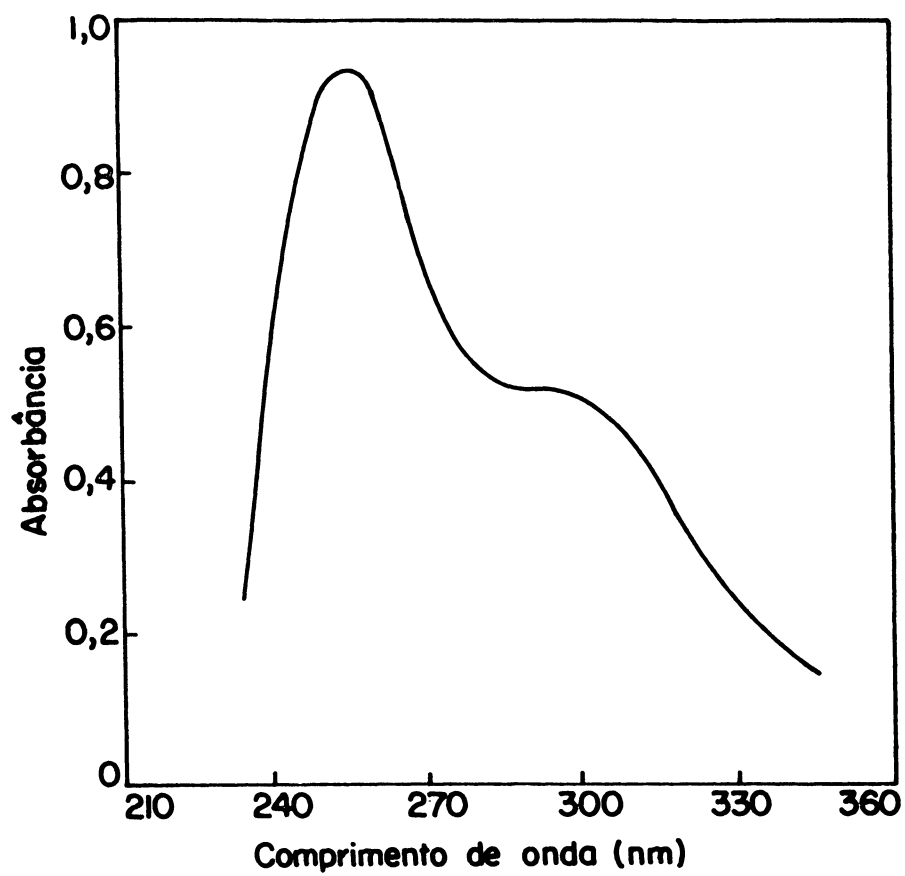


Fig. 6- Espectro de U.V. da O-acetil-xilana (fração I; 1,35 mg/ml) em H₂O.

3.2 LOCALIZAÇÃO DOS GRUPOS O-ACETÍLICOS NAS O-ACETIL-XILANAS (155)

A localização dos grupamentos O-acetílicos nas xilanas foi realizada pela técnica de Bouveng (30), modificada por Corrêa e colaboradores (47). Esta modificação simplificou a metodologia, promovendo a metilação com desacetilação simultânea e a remoção dos grupos fenilcarbamoilas com o metilsulfinil carbanion. Tanto Bouveng (30) como Corrêa (47) trataram os polissacarídeos dissolvidos em N,N dimetil formamida com fenilisocianato durante 3 horas, a 100°. Entretanto, em trabalho realizado com celulose parcialmente acetilada (30,8% de O-acetil), verificou-se que a totalidade das hidroxilas livres foram substituídas por grupamentos fenilcarbamoilas, após tratamento com fenilisocianato durante 10 horas a 50° (19). Assim sendo, esta última condição foi escolhida no estudo das O-acetil-xilanas de bracatinga, a fim de se evitar altas temperaturas. Para assegurar a completa carbamilação das xilanas, o tratamento foi repetido duas vezes e os produtos analisados por infra vermelho, em discos de KBr. Os espectros apresentaram intensas bandas de absorção a 1730 e 1200 cm⁻¹, características da frequência de grupamentos carbonilas de carbamatos, amidas e ésteres; 1530 cm⁻¹, CN em carbamatos e grupamentos amida; 3350 cm⁻¹, NH em carbamatos e amidas; 1380 - 1310 cm⁻¹, ligação fenólica com nitrogênio; 1600, 1440 e 740 cm⁻¹, região de anéis aromáticos. A banda a 3430 cm⁻¹, característica de grupos OH e presente no material de origem, desapareceu após os tratamentos com fenilisocianato, indicando completa substituição.

As O-acetil-xilanas fenilcarbamato foram metiladas com desacetilação simultânea (os grupamentos metil entram no lugar dos acetil). Após a remoção dos grupos fenilcarbamoilas pela ação do metilsulfinil carbanion, as xilanas parcialmente metiladas foram metanolizadas e analisadas por g.l.c. (col. c). Houve a formação dos α e β anômeros dos dois mono-metil-xilosídeos e dos anômeros do di-O-metil-xilosídeo. A resolução destes componentes por g.l.c. foi muito precária, impossibilitando a quantificação de suas áreas relativas. Assim sendo, as xilanas parcialmente metiladas foram convertidas a uma mistura de acetatos de alditóis parcialmente metilados e analisadas por g.l.c. (col. b). Não se obteve nenhuma separação entre os mono metil (T = 2,7, com relação ao 1,5 - di - O - acetil - 2, 3, 4, 6 - tetra - O - metil - D - glucitol);

os tempos de retenção do 2,3-di-O-metil-xilitol e do xilitol são respectivamente 1,45 e 4,60, com relação ao mesmo padrão. Tentou-se, então, a separação por intermédio de colunas capilares em g.l.c. associada a espectrometria de massa. Os resultados obtidos com OV - 225 e Durowax - 4 foram infrutíferos. Jansson e colaboradores (101) conseguiram separar os dois isômeros 2-O-metil-xilitol do 3-O-metil-xilitol utilizando SP - 1000. A resolução satisfatória foi alcançada com OV - 17 e com DB - 210. Entretanto os picos obtidos com DB - 210 foram mais simétricos e por esta razão optou-se por esta fase estacionária para o presente estudo. Os cromatogramas das frações I, II, III e IV estão mostrados na fig. 7 e das frações V e VI na fig. 8. Os tempos de retenção relativos ao pico do solvente são: 2,3-di-O-metil - xilitol (7,20 min), 3-O-metil-xilitol (11,35 min), 2-O-metil-xilitol (11,61 min), xilitol (não substituído 16,53 min). As quantidades relativas de cada componente foram calculadas pela medida das áreas dos picos e estão indicadas na tabela IV. Os espectros de massa estão indicados nas figs. 9 e 10 e os valores dos fragmentos correspondentes na tabela III.

Verificou-se que, durante a hidrólise do polissacarídeo parcialmente metilado, ocorre a decomposição dos produtos formados em diferentes proporções. Assim, quando uma mistura de padrões dos quatro produtos resultantes foi submetida às mesmas condições da hidrólise, a análise por g.l.c. indicou que o 3-O-metil derivado era o componente mais estável. Comparado a ele, a recuperação dos derivados foi: 2-O- (92%); 2,3-di-O-metil-(94%); xilose (77%). Com base nestes resultados, as áreas calculadas para os picos foram corrigidas (tabela IV). Os valores encontrados para a fração II (O-acetil-xilana nativa) correspondem a 65% de unidades de D-xilopiranoses β (1 \rightarrow 4) interligadas não acetiladas, 14 e 16 % de unidades 2-O- e 3-O-acetiladas, respectivamente, e 5% de unidades di-O-acetiladas. Estes resultados estão coerentes com os encontrados por Lindberg et al (115).

A análise dos resultados da metilação (tabela IV) indicou que a distribuição de grupos O-acetílicos na fração III é virtualmente a mesma que na fração II (tabela IV). Também os conteúdos de ácido 4-O-metilglucurônico (15%), xilose (77%) e acetil (8,2%) são similares (tabela I). Conforme descrito em materiais e métodos, as O-acetil-xilanas (fração II e III) provêm da mesma amostragem de madeira e todos os tratamentos para a sua obtenção foram idênticos, com exceção da fase de extração da clorolignina na qual se usou respectivamente etanol a frio e etanol fervente. Estes resultados indicam que não

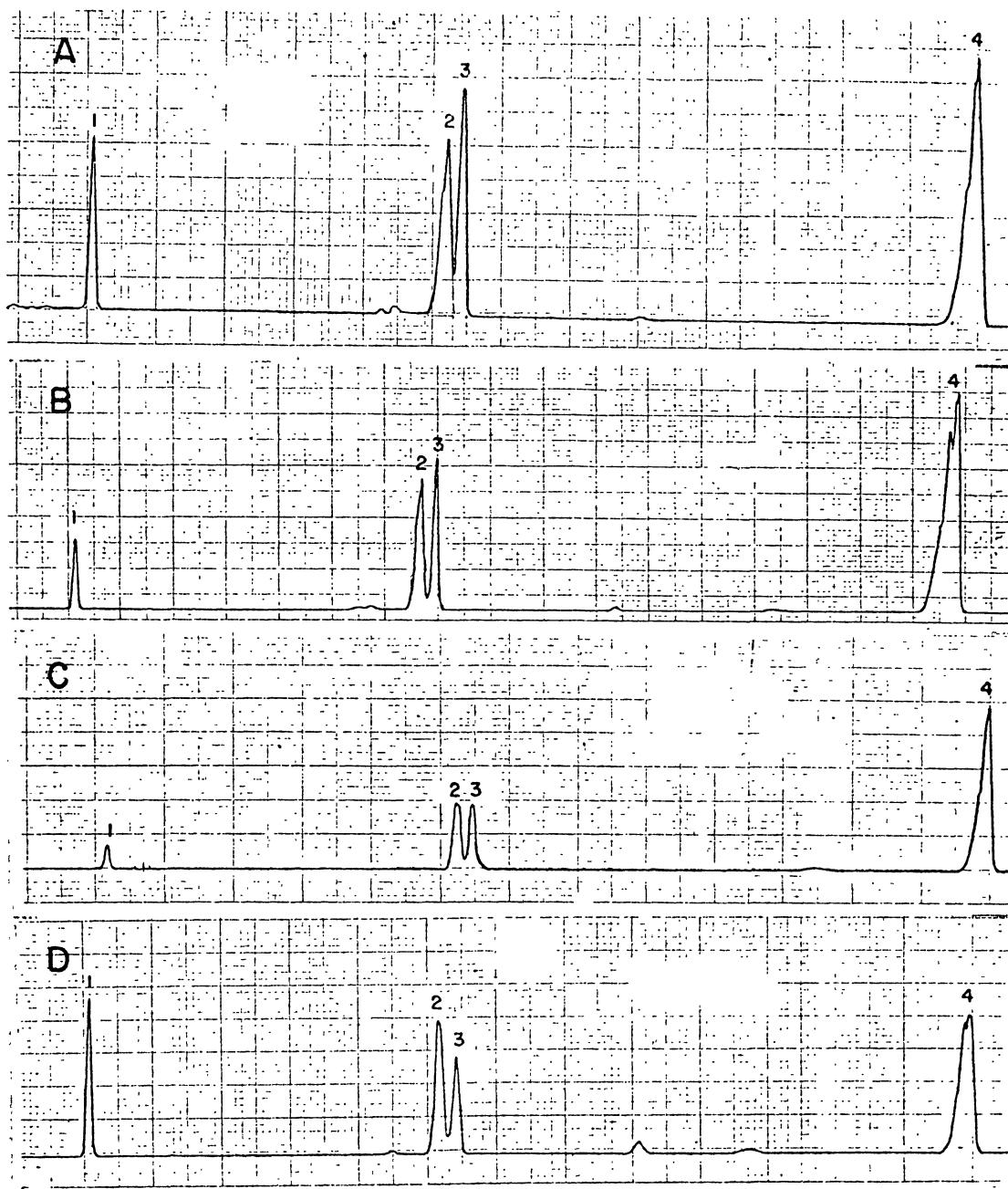


Fig. 7- Cromatogramas em g.l.c. (coluna capilar d) das O-acetil-xilanas parcialmente metiladas, na forma de acetatos de alditois, previamente tratadas com fenilisocianato de acordo com o método de Bouveng (30) modificado por Corrêa (47). A: fração I; B: fração II; C: fração III e D: fração IV.

Os picos foram identificados como (ver espectros de massa figs. 9 e 10):

- (1) 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-xilitol
- (2) 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-xilitol
- (3) 1,3,4,5-tetra-O-acetil-2-O-metil-xilitol
- (4) xilitol penta acetato.

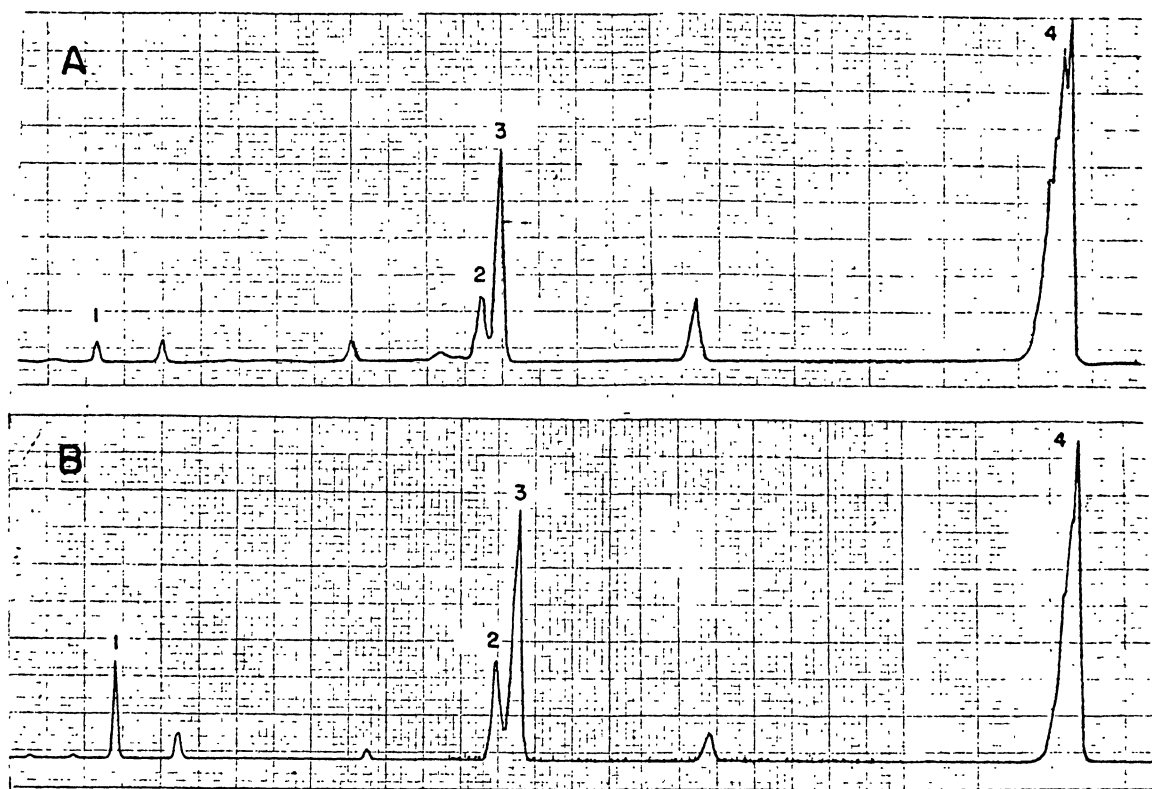


Fig. 8- Cromatogramas em g.l.c. (coluna capilar d) das O-acetil-xila nas sintéticas parcialmente metiladas, na forma de acetatos de alditois, previamente tratadas com fenilisocianato, de acordo com o método de Bouveng (30) modificado por Corrêa (47).

A: fração V (obtida com 0,5 equivalentes de anidrido acético por unidade de xilose);

B: fração VI (obtida com 1,0 equivalente de anidrido acético por unidade de xilose):

Os picos foram identificados como (ver espectros de massa figs. 9 e 10).

- (1) 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-xilitol
- (2) 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-xilitol
- (3) 1,3,4,5-tetra-O-acetil-2-O-metil-xilitol
- (4) xilitol penta acetato.

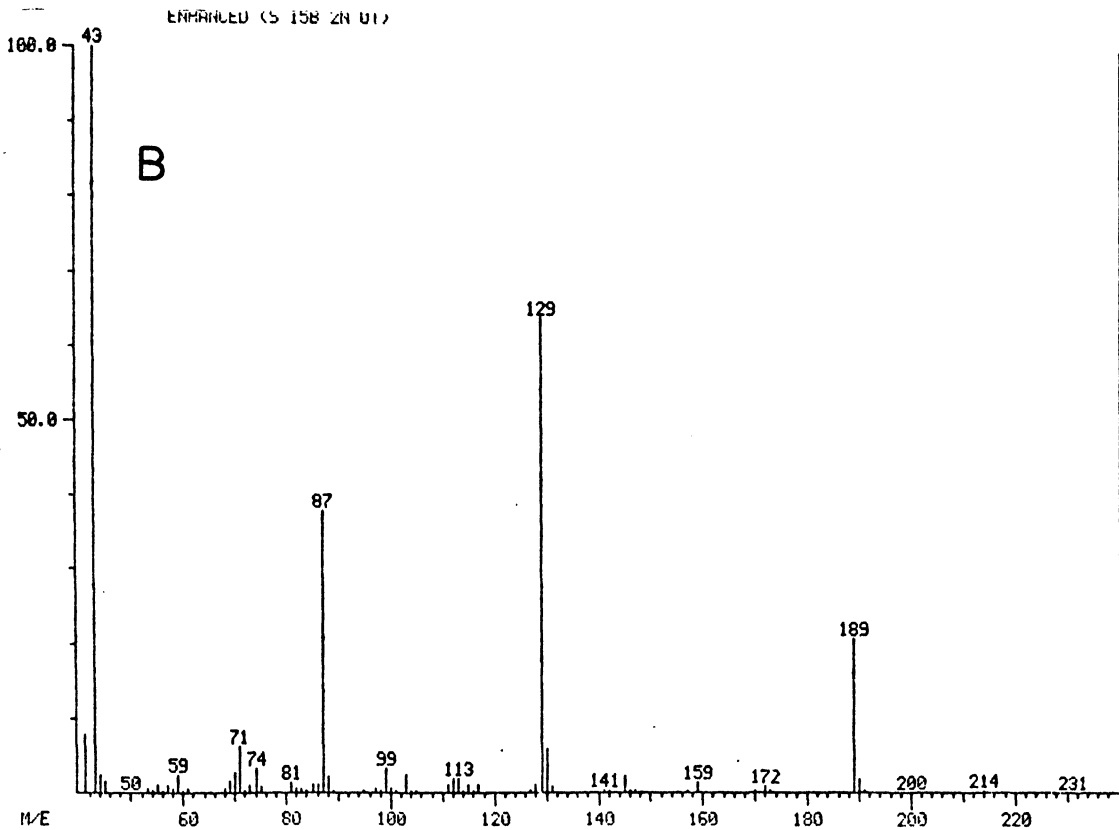
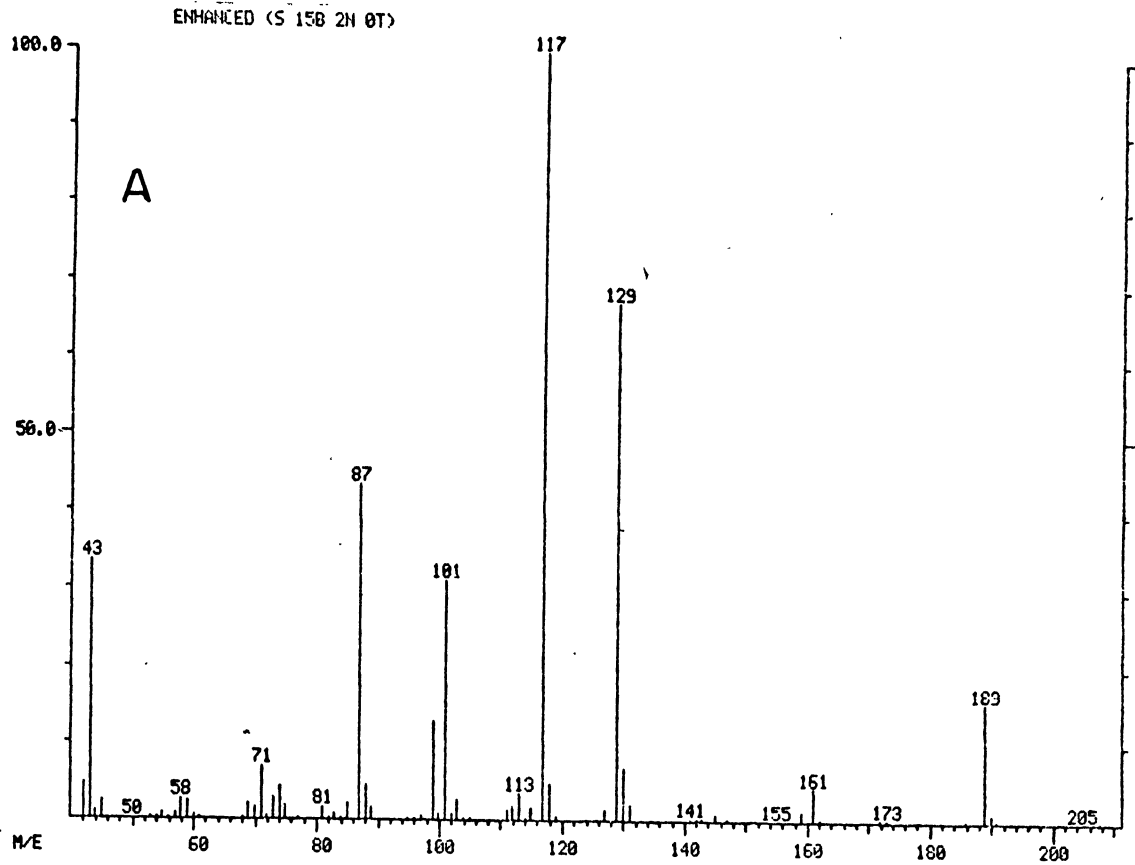


Fig. 9- Espectros de massa de

A: 1, 4, 5 - tri-O-acetil-2, 3 - di-O-metil-xilitol (ver pico 1; figs. 7 e 8);

B: 1,2,4,5- tetra-O-acetil-3-O-metil-xilitol (ver pico 2; figs. 7 e 8).

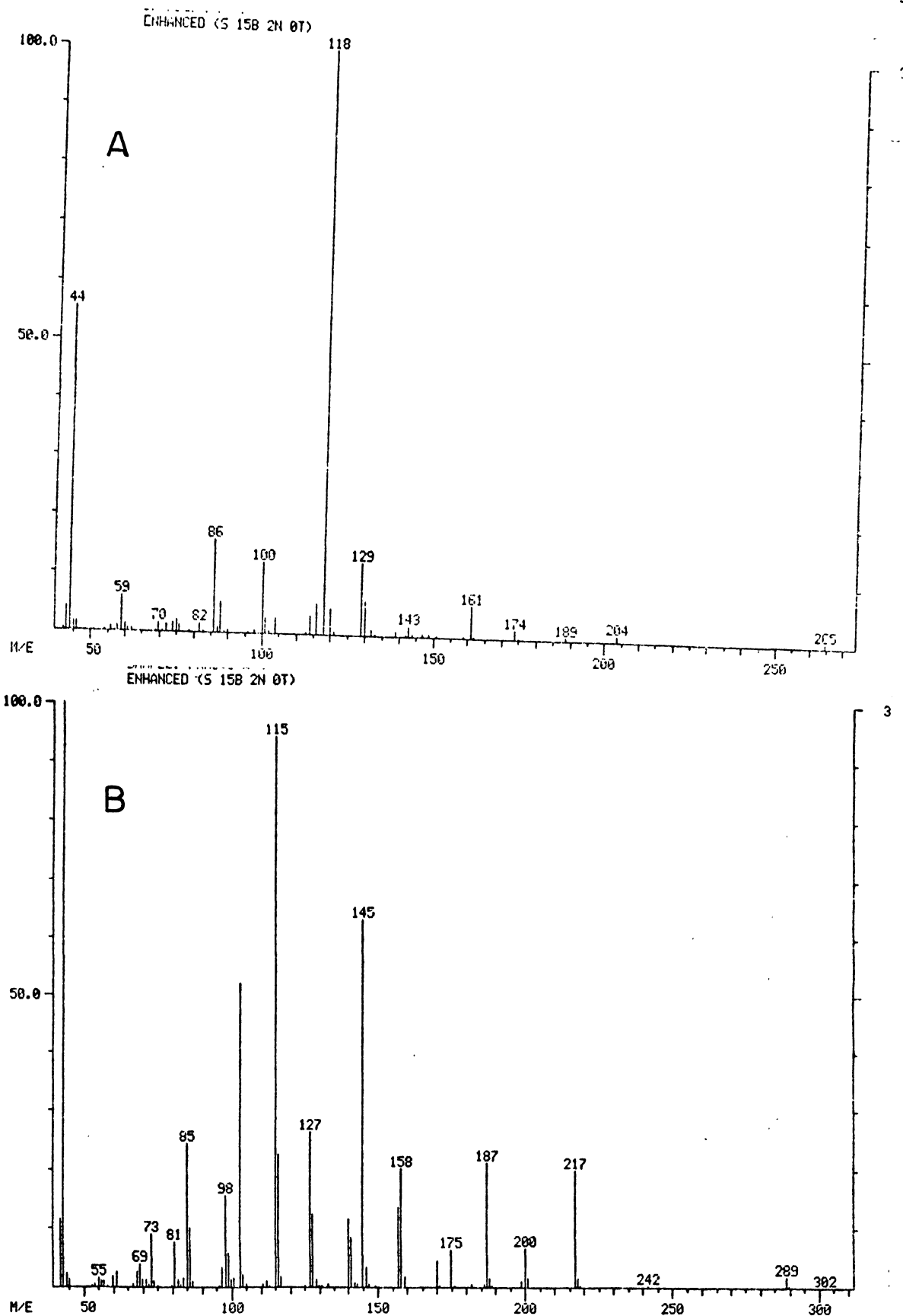


Fig. 10- Espectros de massa de:

A: 1,3,4,5-tetra-O-acetil-2-O-metil-xilitol (ver pico 3, figs. 7 e 8. Obs.: Devido a um problema do computador os picos 44, 59, 70, 100, 118 e 161 sofreram deslocamento para a direita; ver tabela III);

B: Xilitol penta acetato (ver pico 4, figs. 7 e 8).

Tabela III- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA EM G.C.-M.S. DAS O-ACETIL-XILANAS PARCIALMENTE METILADAS, NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS, PREVIAMENTE TRATADAS COM FENILISOCIANATO, DE ACORDO COM O MÉTODO DE BOUVENG (30) MODIFICADO POR CORRÊA (47).

Picos ^a	RT Coluna DB210 (min) ^b		Fragmentação em massa (m/e)												
1	7,20	1,4,5-Tri- <u>O</u> -acetil-2,3-di- <u>O</u> -metil-xilitol.	43	71	87	99	101	117	129	161	139				
2	11,35	1,2,4,5-Tetra- <u>O</u> -acetil-3- <u>O</u> -metil xilitol.	43		87	99	127	129	159	189					
3	11,61	1,3,4,5-Tetra- <u>O</u> -acetil-2- <u>O</u> -metil-xilitol	43	58	69	87	97	117	129	139	159	259			
4	16,53	Xilitol pentaacetato	43	73	81	85	98	103	115	127	145	158	175	187	217

^a Ver cromatogramas, figs. 7 e 8.

^b Com relação ao pico do solvente.

Tabela IV- DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS ACETÍLICOS NAS O-ACETIL-XILANAS.

Polissacarídeo	% de grupos <u>O</u> - acetílicos nas unidades de β - <u>D</u> -xilopiranoses. ^a			
	Não substituídas	2- <u>O</u> -	3- <u>O</u> -	2,3-di- <u>O</u> -
1. Xilana de Betula ^b	58	12	24	6
2. Fração I	50 (54)	17 (16)	21 (18)	12 (11)
3. Fração II	60 (65)	15 (14)	19 (16)	6 (5)
4. Fração III	62 (67)	15 (14)	18 (15)	5 (4)
5. Fração IV	43 (48)	15 (14)	26 (22)	17 (16)
6. Fração V (0,5 equivalente Ac ₂ O)	74 (78)	18 (16)	6 (5)	1 (1)
7. Fração VI (1,0 equivalente Ac ₂ O)	57 (63)	25 (23)	11 (9)	6 (5)

^a As porcentagens em parêntese indicam os valores corrigidos para os diferentes índices de degradação da xilose e de seus 2-, 3- e 2,3-O-metil derivados durante a hidrólise do polissacarídeo per-O-metilado.

^b As posições dos substituintes nesta fração foram determinadas pela análise dos metil-O-metil-xilosídeos por g.l.c. (30).

ocorre migração de grupos O-acetílicos durante o tratamento com etanol fervente. A análise espectral por ^{13}C -n.m.r., que será discutida posteriormente, confirma que o etanol a refluxo não causa migração.

Se compararmos estes resultados experimentais com os obtidos por Bouveng (30) para a O-acetil-xilana de bétula proveniente de uma holocelulose drasticamente delignificada (tabela IV) podemos verificar que ele encontrou os grupos O-acetílicos distribuídos com maior frequência em O-3 das unidades de xilose (12% em O-2 e 24% em O-3). Esta predominância de grupos O-acetílicos em O-3 poderia ser atribuída a dois motivos: à maior estabilidade do 3-O-metil derivado durante a hidrólise ácida e, principalmente, à ocorrência de migração. Brown e colaboradores (34) estabeleceram uma generalização de que os grupos O-acetílicos nas unidades monossacarídicas migram em direção contrária a C-1. Vários exemplos deste fato foram citados no capítulo introdutório deste trabalho. Garegg (72) verificou que não ocorre migração de grupos O-acetílicos pelo tratamento do benzil 4-O-metil-3-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo em DMSO, nas condições usadas no processo de extração das acetil-4-O-metil-glucuronoxilanas. Entretanto, uma leve migração ocorreu com o isômero 2-acetato, nas mesmas condições, confirmando a proposição de Brown e colaboradores (34).

Nos estudos de equilíbrio, por ^{13}C -n.m.r., com os modelos monossacarídicos sintetizados, metil 2-O-acetil-4-O-metil-e metil 3-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos, também constatamos a predominância do 3-O-derivado, conforme será discutido (fig. 17). Assim sendo, parece provável que a maior frequência de grupos O-acetílicos em O-3 encontrada por Bouveng (30) seja devido à migração no sentido O-2 \rightarrow O-3, conforme a regra de Brown e colaboradores (34).

Analisando-se os resultados da metilação das frações I e IV (tabela IV) que provêm de um mesmo caule, verificamos que na fração I há um equilíbrio na distribuição dos grupos O-acetílicos entre O-2 e O-3 (16 e 18%), o que não ocorre na fração IV (14 e 22%). No preparo de ambas as frações polissacarídicas os lipídios foram removidos por Soxhlet e a pectina por tratamentos prolongados e alternados com EDTA e oxalato de amônio a 70°, seguido de cloração. Na fase seguinte, para a fração I, utilizou-se etanolamina alcalina a quente enquanto que, a fração IV, usou-se somente etanol em Soxhlet, com a finalidade de

extrair a clorolignina. É possível que os tratamentos com EDTA e oxalato de amônio, devido a temperatura elevada e variação de pH, possam causar migração de grupos O-acetílicos. Como na fração IV, obtivemos 14% de 2-O-e 22% de 3-O-acetil derivados e como já foi comprovado que o etanol a refluxo não promove migração, esta pode ser seguramente atribuída aos tratamentos com EDTA e oxalato. Portanto, mais uma vez verificamos que a migração ocorreu no sentido O-2 → O-3.

Já na fração I deve ter ocorrido, também, migração pelo tratamento idêntico com EDTA e oxalato, porém o uso subsequente de etanolamina a quente deve ter promovido um equilíbrio posterior na distribuição, conforme aparece na tabela IV (16% de 2-O- e 18% de 3-O-acetil derivado). De fato, Garegg (72) verificou que os monoacetatos de benzil -4-O-metil-β-D-xilopiranosose, na presença de etanolamina, são convertidos a uma mistura na qual o 3-acetato predomina sobre o 2-acetato.

Analisando-se os resultados da metilação das O-acetil-xilanas sintéticas, frações V e VI, obtidas, respectivamente, pelo uso de 0,5 e 1,0 equivalente de anidrido acético por mol de xilose, verificamos que os grupos O-acetílicos estão distribuídos preferencialmente em O-2 das unidades de D-xilopiranososes (tabela IV). Estes resultados estão de acordo com Garegg (72), que em estudo sobre a acetilação parcial do benzil -4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo, demonstrou que a reatividade dos grupos hidroxílicos dos carbonos C-2 e C-3 depende do agente acetilante. Utilizando-se anidrido acético e acetato de sódio, a relação dos grupos O-acetílicos entre O-2 e O-3 foi, respectivamente, de 2:1; com anidrido acético e piridina foi de 1,7:1, processo escolhido no presente trabalho; com anidrido acético e ácido perclórico foi de 1:3. Estes resultados foram obtidos por observação visual de cromatogramas em camada delgada. Corrêa e colaboradores (47) em estudo da distribuição de grupos O-acetílicos pelo método de Bouveng (30) em xilana acetilada sinteticamente com anidrido acético e piridina, também encontraram substituição predominante em O-2 (1,5:1).

Comparando-se a O-acetil-xilana nativa com as acetiladas por síntese, quanto a solubilidade em água, verificou-se que a primeira é totalmente solúvel, o que não ocorre com as outras. A xilana desacetilada também é insolúvel em água. Assim, parece que os grupos O-acetílicos são importantes na determinação da natureza hidrofílica da molécula. Entretanto, a O-acetil-xilana sintética (fração VI), em cujo

preparo se utilizou um mol de anidrido acético por mol de xilose , contém, por dosagem pelo método de Hestrin (96) aproximadamente a mesma quantidade de O-acetil que a fração II. Se verificarmos (tabela IV) a soma das substituições para a O-acetil xilana nativa (fração II) encontramos 35% (14 + 9 + 5) e para a fração VI temos 37 % (23 + 9 + 5). Portanto, podemos concluir que a solubidade da xilana em água não depende somente da presença de O-acetil mas principalmente da sua distribuição na molécula.

3.3 SÍNTESE DOS PADRÕES METIL 2-O-ACETIL-4-O-METIL-β-D-XILOPIRANOSÍDEO (9) E METIL 3-O-ACETIL-4-O-METIL-β-D-XILOPIRANOSÍDEO (14, figura 11).

Para a obtenção dos padrões 2-O-e 3-O-acetil derivados do metil 4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo, partiu-se do metil-β-D-arabinopiranosídeo (1, Sigma). Este composto foi tratado com acetona, na presença de ácido sulfúrico e sulfato de cobre, com função de agente desidratante, originando o derivado 3,4 - isopropilideno (2). O composto 2 foi tosilado por cloreto de p-toluenosulfonila e o produto, metil 3,4 -O-isopropilideno -2-O-p-toluenosulfonil-β-D-arabinopiranosídeo (3) foi cristalizado em etanol e apresentou ponto de fusão de 133^o, de acordo com a literatura (134). A hidrólise parcial deste último, com ácido acético a 80% originou o metil - 2-O-p-tolueno sulfonil -β-D-arabinopiranosídeo (4) que, por tratamento com metóxido de sódio forneceu o metil 2,3-anidro-β-D-ribopiranosídeo (5). A metilação de (5) com iodeto de metila e óxido de prata deu origem ao metil 2,3 anidro-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (6) com ponto de fusão 76^o. A partir deste ponto foram tomados caminhos diferentes para se obter os 2 isômeros.

O metil 2,3 - anidro-4-O-metil-β-D-ribopiranosídeo (6) (100%) foi convertido a metil 3-O-benzil -4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (7), pela ação, a 125^o de álcool benzílico, no qual potássio foi previamente dissolvido. A acetilação sucessiva com ácido acético-piridina a quente originou o composto (8), que pela remoção do grupo benzil por hidrogenólise em ácido acético, na presença de 5% de paládio em carvão ativo como catalizador, foi transformado no primeiro padrão, o metil 4-O-metil-2-O-acetil-β-D-xilopiranosídeo (9).

O segundo padrão, metil 4-O-metil -3-O-acetil-β-D-xilopiranosídeo (14) não foi obtido na forma pura e sim em mistura com o

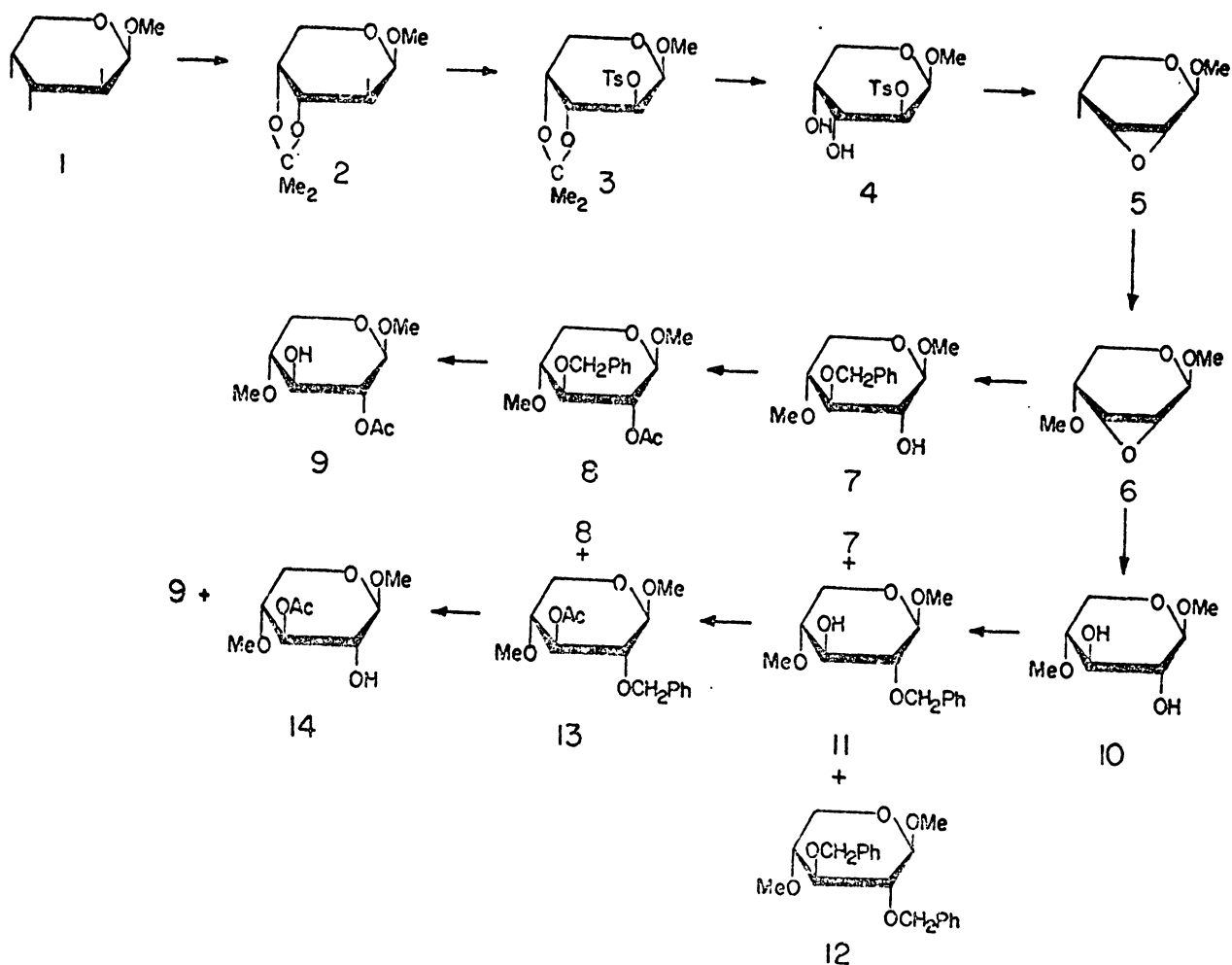


Fig. 11 - Síntese dos padrões metil 2-O-acetil-4-O-metil- e metil 3-O-acetil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeos (9 e 14).

(1) metil-β-D-arabinopiranosídeo; (2) metil 3,4-O-isopropilideno-β-D-arabinopiranosídeo; (3) metil 3,4-O-isopropilideno 2-O-p-toluenosulfonil β-D-arabinopiranosídeo; (4) metil 2-O-p-toluenosulfonil β-D-arabinopiranosídeo; (5) metil 2,3-anidro-β-D-ribofuranosídeo; (6) metil 2,3-anidro-4-O-metil β-D-ribofuranosídeo; (7) metil 3-O-benzil-4-O-metil β-D-xilopiranosídeo; (8) metil 2-O-acetil-3-O-benzil-4-O-metil β-D-xilopiranosídeo; (9) metil 2-O-acetil-4-O-metil β-D-xilopiranosídeo; (10) metil 4-O-metil β-D-xilopiranosídeo; (11) metil 2-O-benzil-4-O-metil β-D-xilopiranosídeo; (12) metil 2,3-di-O-benzil-4-O-metil β-D-xilopiranosídeo; (13) metil 2-O-benzil-3-O-acetil-4-O-metil β-D-xilopiranosídeo; (14) metil 3-O-acetil-4-O-metil β-D-xilopiranosídeo.

composto (9). O metil 2,3-anidro-4-O-metil- β -D-ribopiranosídeo (6) foi tratado com hidróxido de bário aquoso, ao invés de hidróxido de sódio a quente conforme Hough e Jones (100), originando o metil 4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (10). Este foi tratado com N.N.-dimetil formamida contendo óxido de prata e brometo de benzila, originando uma mistura onde estava presente o material não modificado (10), os mono-O-benzil derivados (7 e 11) e o di-O-derivado (12). Os mono-O-benzil-derivados (7 e 11) foram isolados dos outros componentes por coluna de sílica, e a análise por ^{13}C -n.m.r. indicou uma relação de 2,5:1 entre o 2-O- e o 3-O-benzil derivados. Sucessivas acetilações e hidrogenólise originaram uma mistura de 3-O- e 2-O-acetil derivados do metil 4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos (14 e 9), numa relação de 2,3:1, de acordo com os dados de ^{13}C -n.m.r. Apesar do produto não ser puro, foi apropriado para um dos estudos de migração, no qual foi determinada a composição dos isômeros no equilíbrio (figura 17).

As estruturas do 2-O- e 3-O-acetil derivados do metil 4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos (9 e 14), foram confirmadas pela análise dos seus espectros de ^{13}C -n.m.r. (fig. 12). Os sinais de C-1 e C-4 do 2-acetato (9), quando comparados aos do composto não acetilado (10), foram deslocados de -3,0 e -0,2 ppm, respectivamente. Estes resultados eram esperados, com base nos deslocamentos dos carbonos β que ocorrem durante mono-O-acetilação (39). No caso do 3-acetato (14), C-1 e C-4 sofreram deslocamentos de -0,3 e -2,3 (ou 3,2) p.p.m. respectivamente, correspondendo a acetilação de O-3.

3.4 ESTUDO DAS O-ACETIL-XILANAS E MODELOS SINTETISADOS POR ^{13}C -n.m.r.

A análise da O-acetil-xilana nativa por ^{13}C -n.m.r. (80) apresentou um espectro bem resolvido que possibilitou o seu estudo por este método espectroscópico (fig. 13). Os sinais dos grupos CH_3 do acetil aparecem em campo alto, na região de δ 20 a 23 p.p.m. enquanto que os sinais de $\text{C}=\text{O}$ aparecem em campo baixo, região de δ 172-176 p.p.m.. A fig. 14 mostra as ampliações nas regiões de $\text{C}=\text{O}$ e CH_3 . Verificou-se que os grupos acetílicos em O-2, O-3 e O-2,3 dão origem a sinais típicos de CH_3 e carbonila. Destes, os sinais de CH_3 do acetato apresentaram-se melhor resolvidos, o que pode ser

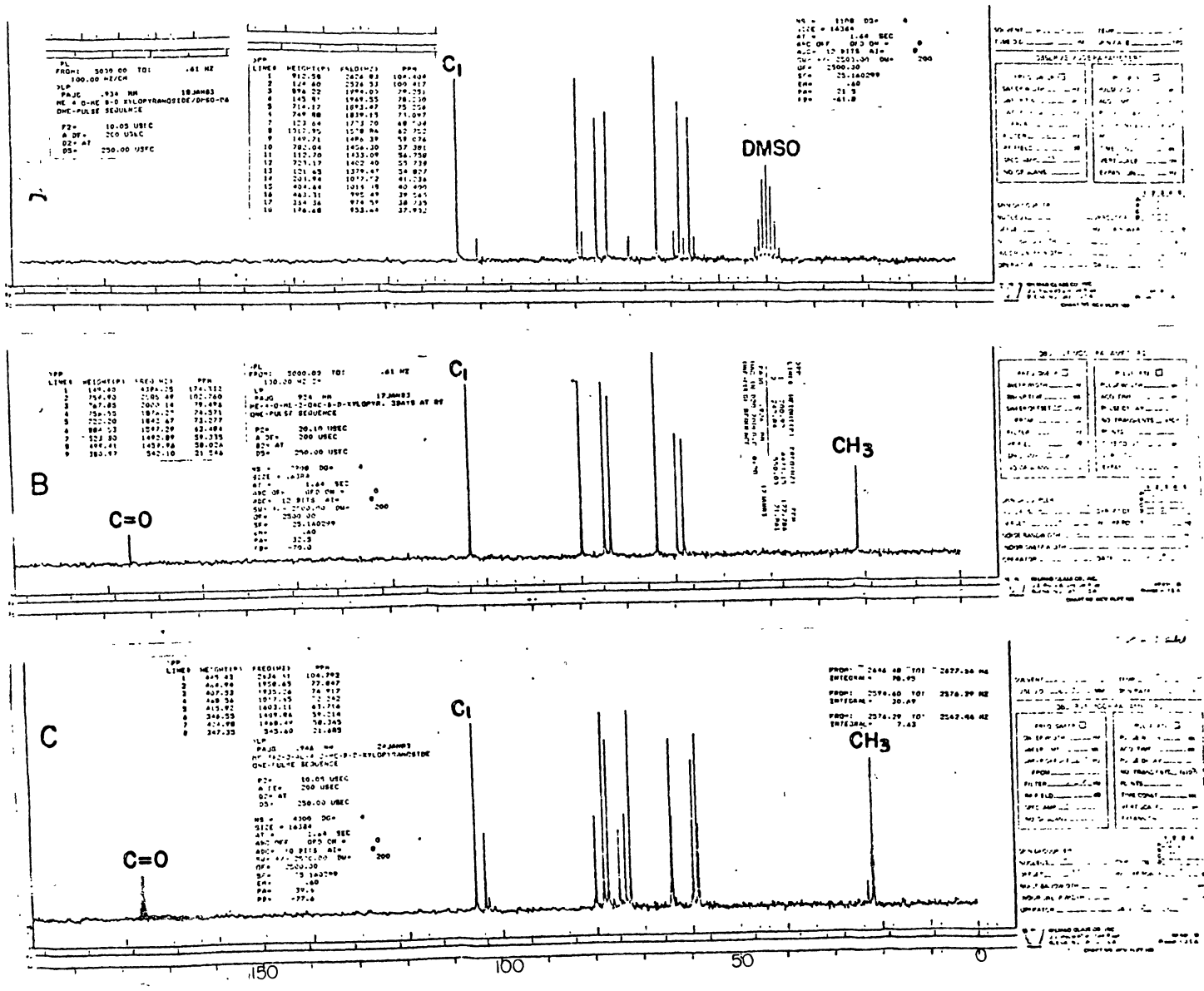


Fig. 12- Espectros de ¹³C-n.m.r. dos padrões monossacarídicos (100 MHz₂):

- A: metil 4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (10, Fig. 11) em DMSO-d₆.
- B: metil 2-O-acetil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (9, Fig. 11), em D₂O.
- C: metil 3-O-acetil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (14, Fig. 11), em D₂O, contaminado com o 2-O-derivado.

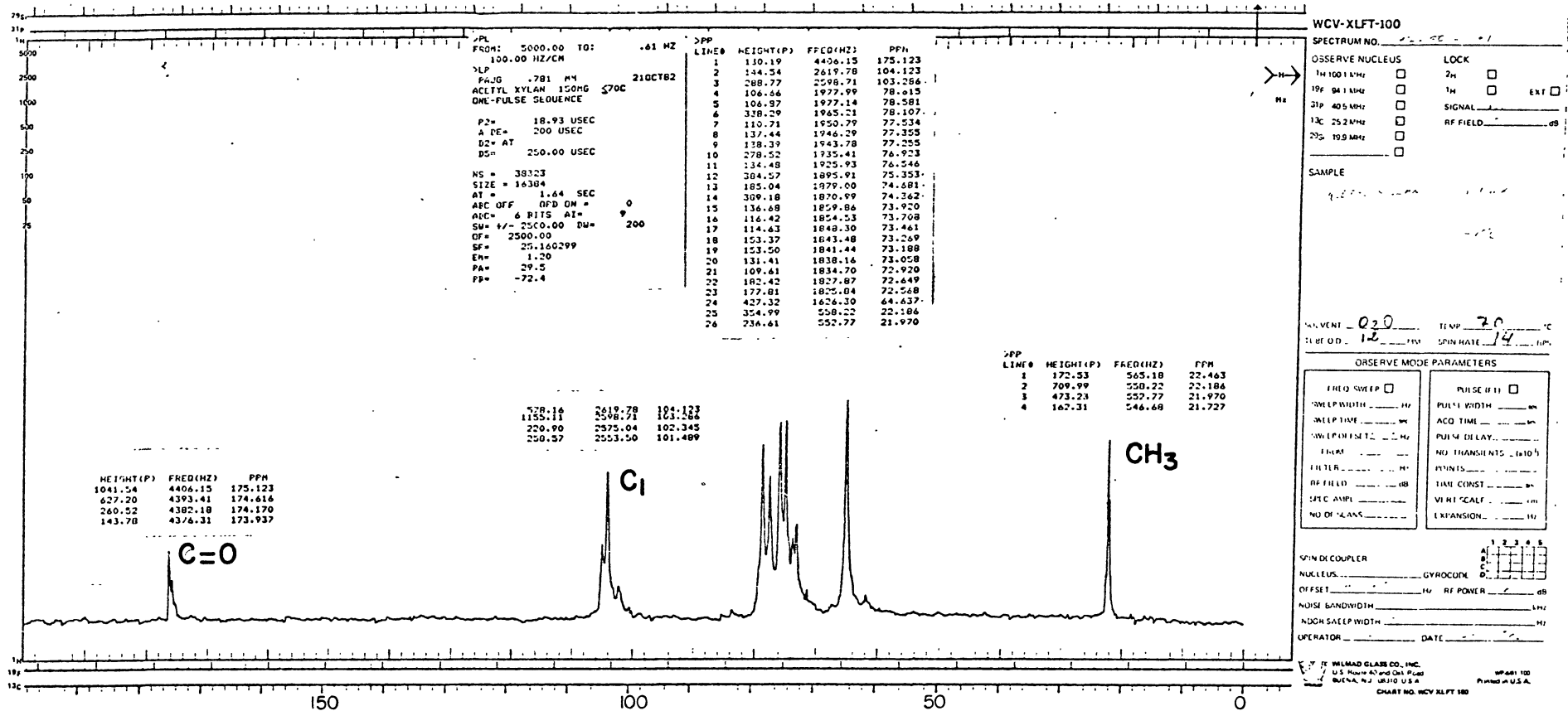


Fig. 13- Espectro de ¹³C-n.m.r. da O-acetil-xilana (Fração II), em D₂O (100 MHz).

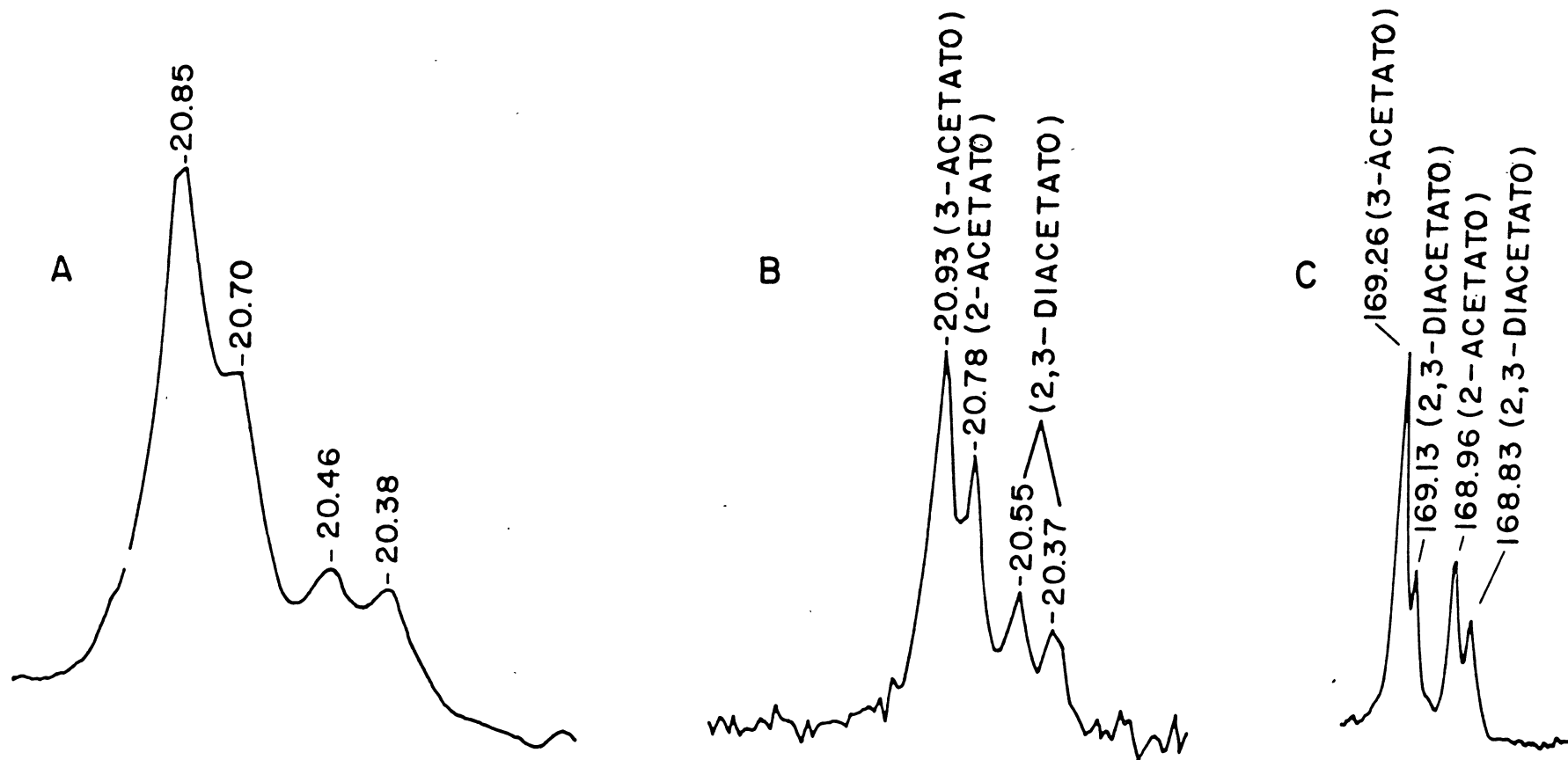


Fig. 14- Espectro de ^{13}C -n.m.r. dos sinais de CH_3 da O -acetil-xilana nativa (Fração II) em DMSO-d_6 : A-(espectrômetro 100 MHz), B-(espectrômetro 360 MHz), C - representa a região $\text{C}=\text{O}$ (espectrômetro 360 MHz).

visto na figura 14 B. A figura 14 C indica os sinais da carbonila, em campo baixo. Para a obtenção deste espectro utilizou-se um espectrômetro de ^{13}C -n.m.r. de 360 MHz, onde a resolução dos sinais foi melhor do que aquela obtida com um aparelho de 100 MHz (fig. 14 A). Somados aos picos de C=O do acetil poderiam estar presentes contribuições provenientes das unidades de ácido 4-O-metil glucurônico, as quais não foram detectadas durante o processo da metilação.

Os sinais de CH_3 da xilana nativa foram identificados como segue: (fig. 14 B) δ 20,37 e 20,55 correspondem às unidades di-O-acetiladas, uma vez que estavam presentes no espectro da xilana completamente acetilada; o sinal a δ 20,93 corresponde ao 3-acetato, que ocorre de acordo com os dados de metilação (tabela IV) em proporção pouco maior do que o 2-acetato e, sendo assim, é proeminente ao sinal correspondente ao isômero que aparece em δ 20,78, ou seja, o 2-acetato. No caso das xilanas sintéticas, (frações V e VI), o pico a δ 20,67 (fig. 15) é maior, correspondendo a maiores proporções de 2-acetato em relação ao 3-acetato que ocorre em δ 20,83.

A espectroscopia por ^{13}C -n.m.r. demonstrou ser um método mais rápido do que a metilação nos estudos de migração realizados com as O-acetil xilanas nativas e sintéticas. Entretanto em termos de quantificação absoluta, a metilação e ^{13}C -n.m.r. deram diferentes resultados. Em nossa opinião os resultados da metilação são mais significativos.

Com a finalidade de se estudar as migrações de grupos O-acetílicos em modelos, foram preparados monômeros sintéticos (fig. 11), análogos às unidades O-acetiladas de D-xilopiranoses β (1 \rightarrow 4) ligadas: o metil 2-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (9) e o metil 3-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (14), bem como o intermediário não acetilado, o metil 4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo (10), cujos espectros estão na figura 12. Conforme pode ser visto na tabela V, cada um dos derivados acetilados do metil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos originou sinais de CH_3 e C=O equivalentes aos deslocamentos químicos encontrados nas O-acetil-xilanas analisadas.

Para se verificar a existência de migração de grupos O-acetílicos nas O-acetil-xilanas naturais e sintéticas, elas foram submetidas aos seguintes tratamentos: refluxo por 18 horas em etanol, na forma de suspensão; solução aquosa contendo cloro, a 40°C, por 1h;

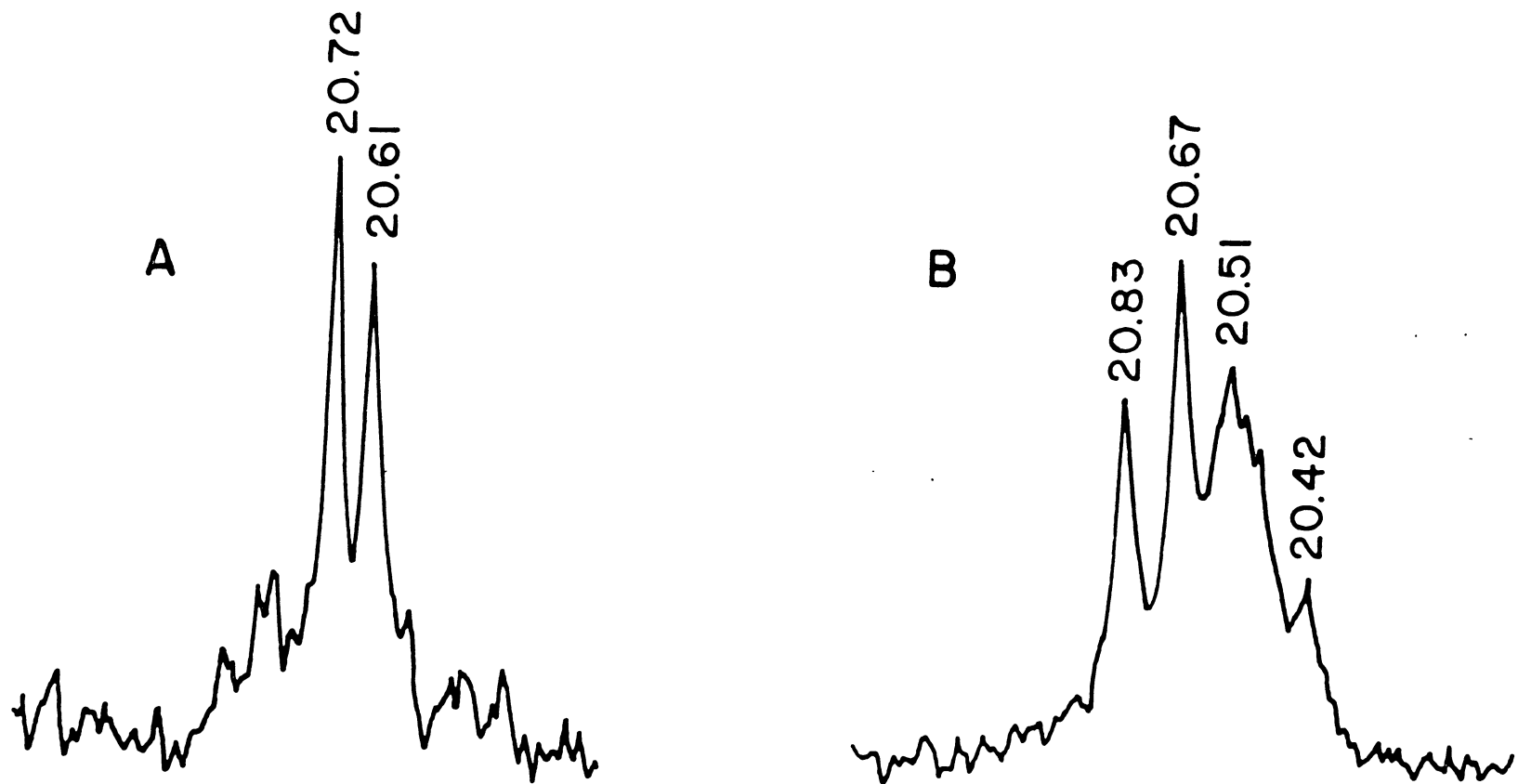


Fig. 15- Espectro de ^{13}C -n.m.r. em DMSO-d_6 da região CH_3 da xilana acetilada sinteticamente com 0,5 equivalentes (A) e 1,0 equivalente (B) de anidrido acético por mol de xilose.

Tabela V- SINAIS DE C-1, C=O e CH₃ EM ESPECTROSCOPIA DE ¹³C-n.m.r. DOS DERIVADOS ACETILADOS DA XILANA E DOS COMPOSTOS MODELOS METIL 4-O-METIL-β-D-XILOPIRANOSÍDEOS (SOLVENTE DMSO-d₆ a 50^o, 100 Mz).

Composto	Sinal ¹³ C, ppm		
	C ₁	C=O	CH ₃
1. Xilana acetilada nativa (Fração II)	101,67*	169,25*	20,85*
	103,06	168,94	20,70
	99,37		20,46
			20,38
2. Xilana diacetato	99,64	169,10	20,35
		168,81	20,22
3. Xilana	101,69		
4. Metil 4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (10)	104,40		
5. 2-acetato de (10)	101,50	169,04	20,70
6. 3-acetato de (10)	104,10	169,36	20,79
7. 2,3-diacetato de (10)	100,96	169,34	20,40
		168,95	20,28

* Listados em ordem de intensidade decrescente de cima para baixo (ver figura 14 A).

aquecimento a 70^o em solução de D₂O durante 64 horas e aquecimento a 70^o em DMSO - d₆ durante 64 horas. Não ocorreram modificações nos espectros de ¹³C-n.m.r. dos polissacarídeos após os tratamentos acima. Isto indica que eles são resistentes a migração, nestas condições.

Em contraste com estes resultados observados no caso das O-acetil-xilanas, verificou-se que no modelo monossacarídico sintetizado, metil 2-O-acetil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (9), houve migração, facilmente detectável por ¹³C-n.m.r. (fig. 16). Em D₂O, o sinal de C-1 do espectro de ¹³C-n.m.r. (δ = 101,50) possui deslocamento químico diferente daquele encontrado para o 3-O-derivado (δ = 104,10). Devido a este fato foi possível determinar rapidamente a proporção de cada componente durante os estudos de equilíbrio, pela comparação das áreas dos sinais de C-1. Esta aproximação é válida, desde que sejam obedecidas as condições sob as quais a quantificação é garantida (188). Assim sendo, verificou-se que à temperatura ambiente, em D₂O durante 72 horas não ocorreu nenhuma migração. Entretanto iniciando-se com 100% de 2-O-acetato, a 50^o, após 3 e 21 horas detectou-se, respectivamente, 8 e 29 % do 3-acetato. Após 64 horas a 70^o a reação tendeu a um equilíbrio, contendo 45% do 2-acetato e 55% do 3-acetato (fig. 17).

A figura 16 mostra o espectro de ¹³C-n.m.r. do padrão metil 2-O-acetil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo após 64 horas a 70^o em D₂O. Pode-se observar claramente o sinal de C-1 do 3-acetato em campo mais baixo do que o sinal de C-1 do 2-acetato (comparar com figura 12).

É interessante observar que, neste estudo de equilíbrio, partiu-se do 2-O-derivado, tendo-se obtido ao final predominância do 3-O-, o que está de acordo com Brown (34) e explica a predominância de 3-O-acetil encontrada por Bouveng (30) e por nós na fração IV. Os resultados entretanto, praticamente se repetiram quando o ponto de partida foi uma mistura contendo principalmente o 3-acetato (70%). Após 58 horas a 70^o a mistura em equilíbrio continha 40% do 2-acetato e 60% do 3-acetato, conforme pode ser visualizado na fig. 17. Pode-se afirmar que nestas condições (70^o) não houve hidrólise, o que seria facilmente constatado pela presença de ácido acético que originaria por ¹³C-n.m.r. um sinal a δ 177,8, isto é, aproximadamente 3 p.p.m. em campo mais baixo que o grupo C=O dos acetatos. Os resultados parecem indicar que a relação entre o 2- e o 3-acetato na mistura equilibrada dos padrões monossacarídeos é similar à obser-

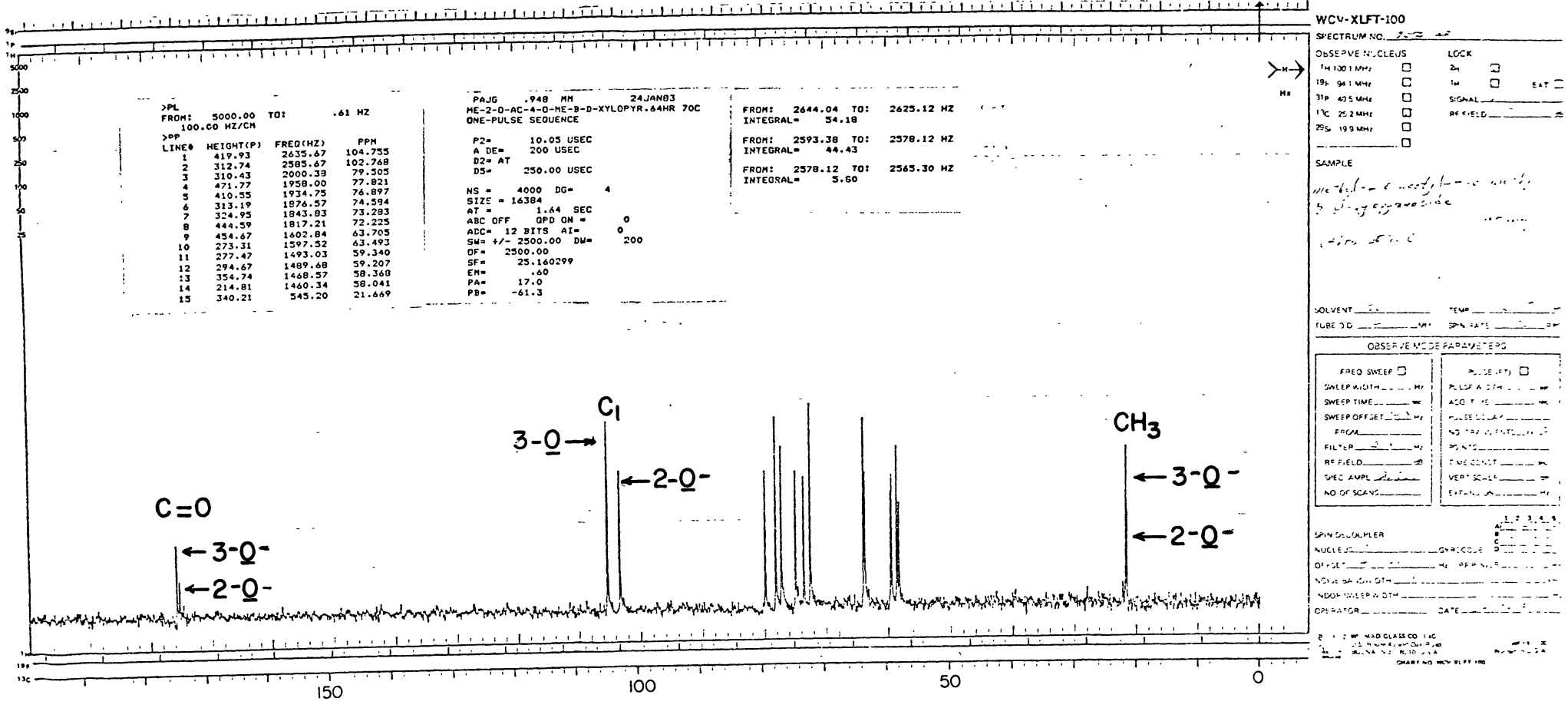


Fig. 16- ¹³C-n.m.r. do padrão metil 2-O-acetil-4-O-metil-β-D-xilopiranosídeo (9, fig. 14) após 64 horas a 70°, em D₂O.

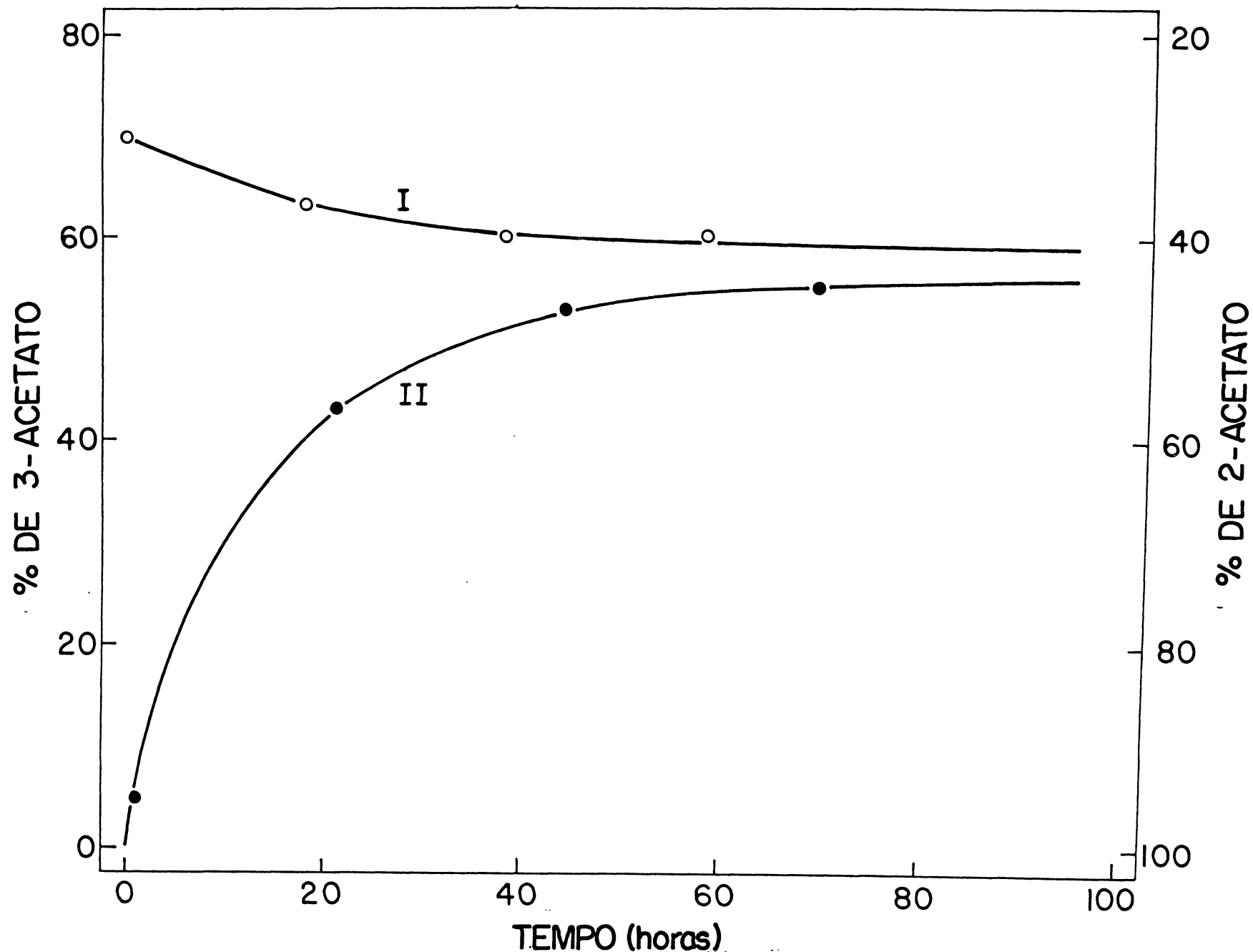


Fig. 17- Progresso no equilíbrio de 2-O-acetil (II) e uma mistura contendo principalmente o 3-O-acetil (I) derivados de metil 4-O-metil β -D-xilopiranosídeos em D₂O a 70°.

vada nas O-acetil xilanas nativas, as quais apresentaram leve predominação de substituição em O-3.

Foi utilizado também o DMSO - d_6 como solvente, ao invés de D_2O , para os ensaios de migração com o metil 2-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeo. Nestas condições a migração não ocorreu tão rapidamente como no caso de D_2O . Após 21 horas a 50° , não houve migração. Entretanto, a 70° verificou-se que 6% e 20% do 3-acetato foram formados após 3 e 19 horas, respectivamente.

Em um experimento onde cloro foi borbulhado a uma solução de metil 4-O-metil-2-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo (9) a temperatura de $\approx 4^\circ$, não houve migração de acetil. Neste caso específico em que não se detectou migração por ^{13}C -n.m.r. no polissacarídeo e tão pouco no modelo monossacarídico podemos afirmar com segurança que o cloro, nas condições utilizadas na delignificação não promoveu migração. O mesmo podemos afirmar, com relação ao DMSO utilizado como solvente na extração das xilanas, a 28° .

3.5 CONFORMAÇÃO.

Conforme já foi discutido, os resultados da localização dos grupos O-acetílicos na O-acetil-xilana nativa (isto é, obtida em condições tais que comprovadamente não proporcionaram migração dos substituintes acetílicos), indicaram que estes grupos estão distribuídos em O-2, O-3 e O-2,3, respectivamente 14, 16 e 5 %, das unidades de D-xilopiranoses, ao longo de cadeia (tabela IV). Podemos observar que as proporções encontradas em O-2 e O-3 são aproximadamente iguais. A partir da comprovação deste fato, passamos a nos preocupar com sua importância na conformação das O-acetil-xilanas.

Esta distribuição equilibrada dos grupos O-acetílicos entre O-2 e O-3 permite imaginar um eixo de simetria na molécula, o que não seria lógico, por exemplo se os grupos O-acetílicos estivessem concentrados em O-3, conforme determinado por Bouveng (30). Uma vez que a conformação das xilanas foi estudada em hemiceluloses desacetiladas (conformação tipo "three fold screw axis"), achamos importante focar este aspecto considerando a macromolécula no seu estado nativo.

Determinou-se que no pó de bracinga previamente extraído com EDTA e oxalato de amônia (portanto livre de pectinas), há aproximadamente 3% de grupos O-acetílicos. Na xilana nativa, encontramos em torno de 10%. Sabendo-se que as xilanas constituem cerca de 25 % do total da madeira, pode-se, portanto, admitir que toda a hemicelulose presente no caule, no seu estado nativo, esteja parcialmente acetilada.

Considerando o trabalho de Oliveira (143) que aborda o problema da complexação das xilanas com iodo, observou-se que a O-acetil-xilana nativa não forma complexo. Entretanto, após a desacetilação ela forma o complexo, tal como a hemicelulose A. Este comportamento, ou seja a não complexação da O-acetil-xilana com iodo, foi atribuído aos grupos O-acetílicos. Oliveira (143) sugeriu que os grupos O-acetílicos na hemicelulose nativa atuariam como grupos volumosos que dificultariam, por impedimento estérico, a conformação helicoidal, ou que a simples substituição das OH por estes grupos impediria a formação do complexo. Poderíamos acrescentar, ainda, que se os grupos O-acetílicos impedirem a variação dos ângulos ψ e ϕ na ligação glicosídica, seria impossível a formação da hélice. Outro fator a considerar é que são necessárias 6 unidades monossacarídicas para a formação de um passo de hélice (150). Como a O-acetil-xilana contém aproximadamente 10% de grupos O-acetílicos distribuídos ao longo da cadeia, este fato considerado isoladamente não deveria ser impedimento à complexação com iodo, pois haveria teoricamente espaço livre suficiente para a formação do complexo.

Em resumo:

- 1- os grupos O-acetílicos estão equilibradamente distribuídos entre O-2 e O-3 ao longo da cadeia da xilana;
- 2- a totalidade da xilana presente no caule, no seu estado nativo, encontra-se parcialmente acetilada;
- 3- a quantidade de grupos O-acetílicos aumenta com a maturação (103);
- 4- a O-acetil xilana não forma complexo com o Iodo, o que ocorre após a desacetilação (143);
- 5- deve haver um único eixo de simetria para a celulose e xilana, segundo a hipótese de Rees (153);
- 6- a xilana peracetilada tem uma conformação tipo "two fold screw axis" (117, 119).

Considerando estes fatos, a conformação da O-acetil-xilana do caule de bracinga provavelmente não seja do tipo convencionalmente atribuído às xilanas, ou seja, "three fold screw axis", mas similar à confor

mação da celulose que é do tipo "two fold screw axis". Isto sugere maior estabilidade à hemicelulose caracterizando-a como um polissacárido estrutural, ao lado da celulose. Neste caso, os grupamentos O-acetílicos igualmente distribuídos entre O-2 e O-3 das unidades de xilose, ao longo da cadeia, teriam a finalidade de criar tensões (forças de Van der Waals, pontes de hidrôgenio e interações eletrostáticas), que impediriam a rotação dos ângulos Ψ e Φ na ligação glicosídica, a semelhança dos grupos $-CH_2OH$ existentes na celulose.

Segundo Marchessault (118), se os substituintes nas unidades de açúcar ocorrem com periodicidade regular (como é o nosso caso), a cristalinidade pode ser alcançada. Assim, a análise conformacional da O-acetil-xilana nativa, com técnicas adequadas como difração em raios X, medidas de ângulos e distâncias, tratamentos matemáticos computarizados complexos poderiam esclarecer definitivamente sua conformação.

3.6 A PRESENÇA DA LIGNINA NAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICAS.

Existe uma perfeita interação entre os polímeros que constituem a madeira, o que sugere a ocorrência de associações entre os mesmos. A presença de ligações entre a lignina e carboidratos tem sido amplamente estudada. Porém, sua natureza não é bem compreendida, o que é em parte justificado pela pequena proporção em que ocorrem, isto é, de 1 a 2 % das ligações totais entre os monômeros (142).

O material mais frequentemente utilizado para o estudo destas ligações é "milled wood" lignina, ou seja lignina obtida pelo processo de Bjorkman (112). Esta preferência é justificada, pois o método permite obter uma lignina pouco modificada que contém uma pequena porcentagem de carboidrato.

Nossos estudos focalizam especificamente a fração de lignina ligada às hemiceluloses. Isto é decorrência dos primeiros trabalhos com as hemiceluloses A e B (46,52,143,197), que vem sendo realizados pelo grupo de Corrêa, neste Departamento. As análises iniciais por g.l.c. dos hidrolisados das hemiceluloses A e B de bratinga na forma de acetatos de alditois indicavam a presença de um componente não carboidrato entre os açúcares, com um tempo de retenção próximo ao da glucose em coluna de O.V.-225 e próximo ao da xi-

lose em coluna de ECNSS, tendo sido no início confundido com estes açúcares. Como as hemiceluloses A e B são obtidas através de extrações com hidróxido de sódio ou potássio pensou-se que o referido composto poderia ser um produto de degradação alcalina. Entretanto, o mesmo se fazia presente também na hemicelulose obtida com DMSO, após delignificação parcial do pó da madeira com cloro. Este fato foi o ponto de partida para a hipótese de que teríamos lignina presente nas frações hemicelulósicas.

Quando as hemiceluloses A, B e O-acetil-xilana (fração I) foram hidrolisadas verificou-se a formação de um precipitado, o qual foi comparado à Klason lignina e a um padrão de álcool coniferílico, através da análise por g.l.c. Os cromatogramas, mostrados nas figuras 1 a 5 indicam a ocorrência de um componente com tempo de retenção de 10,4 (col. b) em relação ao 1,5-di-O-acetil- 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, o mesmo encontrado nos trabalhos iniciais. Assim, este foi um passo importante para se evidenciar a presença de lignina nas hemiceluloses de Mimosa scabrella. Outro fator foi o resultado das análises por U.V. Conforme já descrito, o espectro da O-acetil-xilana (fração I) na região do U.V. mostra uma banda que é característica de lignina (76). A fig. 21.C (pg. 95) mostra o espectro de Klason lignina e a 21.B o espectro de clorolignina (a clorolignina foi obtida no processo de delignificação, pelo qual o cloro entra como substituinte nos núcleos aromáticos ou nas cadeias laterais das unidades de fenil propano da lignina (49)). Os espectros das figuras 21.C e B são também característicos de lignina. Da mesma forma as análises por infra vermelho contribuíram para caracterizar a lignina. O espectro de I.R. da Klason lignina em disco de KBr está indicado na figura 22.B. As ligninas isoladas apresentam coloração marrom escura, o que não permitiu a transparência necessária nas pastilhas. Assim, as análises da Klason lignina, do resíduo da hidrólise ácida da hemicelulose A bem como do álcool coniferílico foram feitas, após acetilação dos mesmos, em filmes obtidos pela evaporação de soluções clorofórmicas sobre células de cloreto de sódio.

Observando-se as figuras 23.A, B e C, (pg. 97) que representam os espectros de infra vermelho das amostras acetiladas, pode-se observar grande similaridade entre eles. Sendo o álcool coniferílico um dos monômeros típicos das ligninas de angiospermas (162), sua presença na Klason lignina é normal. O álcool coniferílico polimeriza-se em meio ácido. Assim, à semelhança do

espectro do resíduo da hidrólise da hemicelulose A com o da Klason lignina e com o do álcool coniferílico foi outro critério que contribuiu para confirmar a presença de lignina na hemicelulose.

A análise do resíduo da hidrólise da hemicelulose A com ácido trifluoracético (lignina TFA), após sua acetilação mostra o sinal característico de proton aromático a δ 7,2, conforme indicado na fig. 30 (pag. 106).

Conforme será discutido mais adiante, a espectrometria de massa confirmou os resultados obtidos pelos outros métodos, quando se estudou o complexo lignina-xilana isolado.

Uma vez esclarecida a presença de lignina nas frações hemicelulósicas, tratou-se de quantificá-la através de métodos convencionais. O mais empregado é o tratamento de madeira com ácidos fortes que promovem a hidrólise e solubilização dos carboidratos. Por definição o resíduo insolúvel é denominado Klason lignina (3) e pode ser determinado gravimetricamente. Este método de análise requer de uma a duas gramas de amostra de madeira ou polpa (3) e esta quantidade nem sempre é disponível. Uma modificação desta técnica foi proposta por Effland (52), baseado na hidrólise de Saeman (168). O procedimento é praticamente o mesmo do anterior, podendo-se utilizar quantidade de amostras menores (de 25 a 300 mg). O pó deve ser tratado com ácido sulfúrico 72 % durante 1 hora e a hidrólise secundária deve ser completada em autoclave, durante 1 hora a 120°. Após a filtração o resíduo insolúvel é determinado gravimetricamente. A lignina determinada por estes dois métodos (Klason lignina) não computa aquela fração que dissolve no ácido sulfúrico. Em madeiras duras a lignina solúvel, isto é, a que se perde neste processo pode atingir de 3 a 5 %, sendo menor em madeiras moles. No presente trabalho, utilizamos o método de Klason como processo para obtenção de lignina a partir do caule da bracatinga e das próprias hemiceluloses (3).

Devido a faculdade da lignina absorver luz na região do ultra violeta, métodos espectrofotométricos são utilizados (102, 129, 130, 159). Fengel e colaboradores (54) verificaram que não existe correlação entre a quantidade de substância que absorve luz a 280 nm e o conteúdo de lignina determinado como material precipitado. É possível que a causa disto seja a dificuldade de solubilização da Klason lignina na maioria dos solventes.

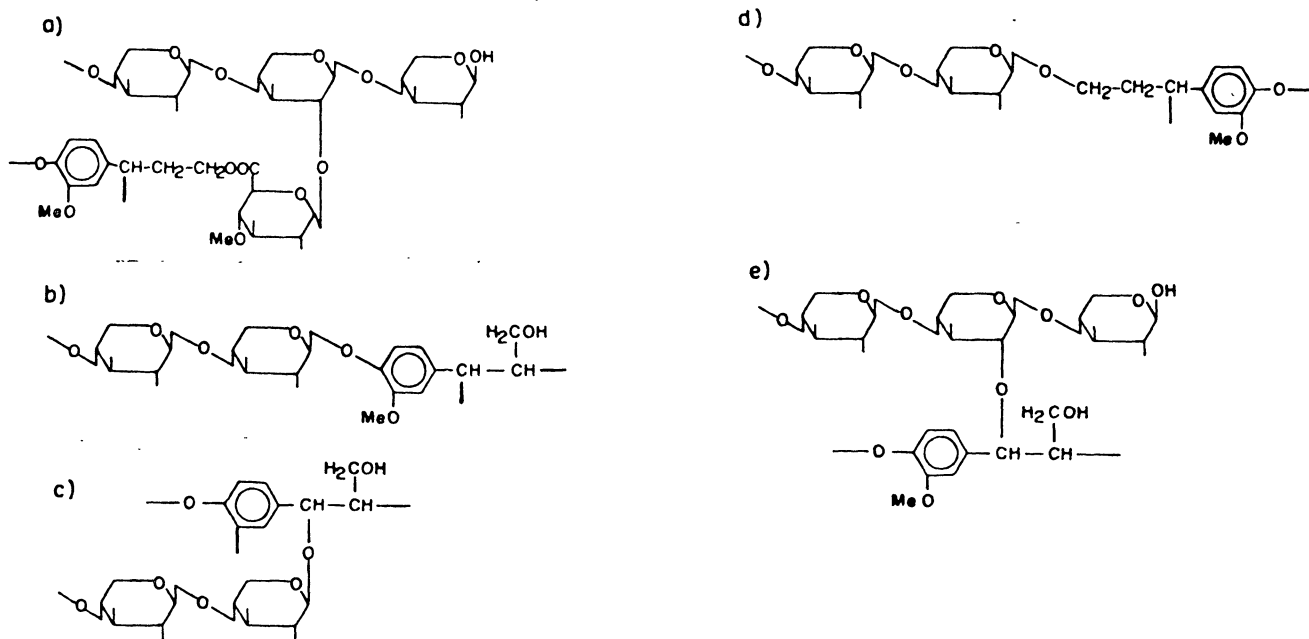
Um método para determinação de lignina foi descrito por Bar-Lev (15), e utilizado por Vered e colaboradores (185) o qual consiste em solubilizar a amostra em NaOH 5M e aquecer durante 2 horas a 103°. Após centrifugação (se necessária) e diluição, faz-se a leitura da absorbância a 280 nm, usando-se como referência uma absorbância de 15,6 (predeterminada) de Klason lignina a 1 mg/ml.

Este método foi escolhido, pelo fato das hemiceluloses serem solúveis em NaOH a quente e possíveis contaminantes (proteínas) precipitarem nestas condições. Ao invés de utilizarmos Klason lignina como padrão optamos pelo álcool coniferílico, (parte da Klason lignina de bracinga permaneceu insolúvel nas condições do ensaio). Por este critério, as frações hemicelulósicas A, B e O-acetil-xilana (fração I) contêm, respectivamente, 1,4; 1,5 e 6,0 % de lignina, com relação ao carboidrato dosado pelo método do fenol sulfúrico (51), tabela II.

3.7 AS LIGAÇÕES ENTRE A XILANA E A LIGNINA.

Existem vários tipos de ligações que podem ocorrer entre o carboidrato e a lignina (35, 58, 64, 93, 109, 127) conforme segue:

(a) ligação ester entre o ácido 4-O-metil-glucurônico e a lignina; (b) ligação fenol glicosídica; (c) ligação benzil glicosídica; (d) ligação acetálica; (e) ligação benzil eter.



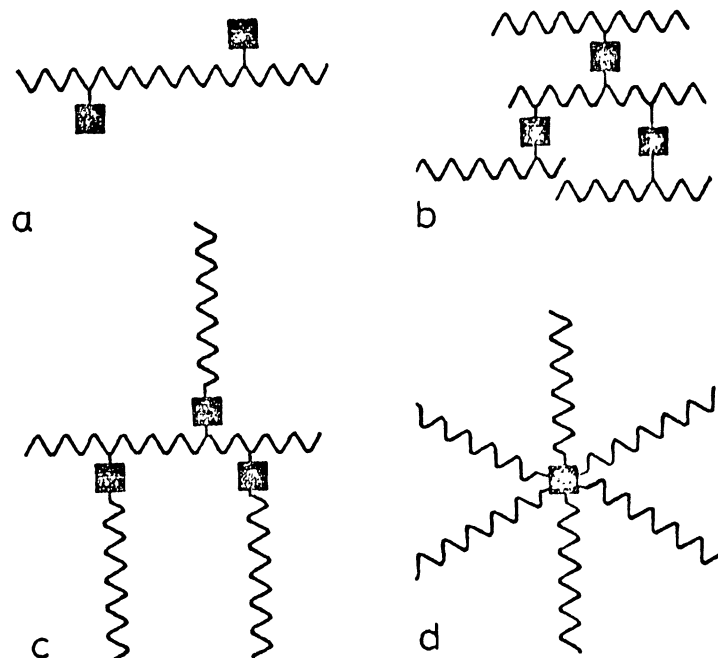
As ligações ester (a) e fenol glicosídica (b) são sensíveis a alcali.

Sabe-se atualmente que a própria lignina encontra-se agregada por interações secundárias. Benko (20) observou mudanças significativas no peso molecular de lignosulfonatos de madeiras moles em diferentes solventes. Quando foi usado metanol, o peso molecular médio obtido foi de 650 enquanto que com o uso de solução aquosa de cloreto de potássio, o valor encontrado foi 8.000. O mesmo autor também verificou que o peso molecular de ligninas solúveis obtidas pelo processo Kraft (122) aumentava marcadamente quando o pH era alterado de 11,5 a 7,0. Observações semelhantes foram também realizadas por Gross e colaboradores (84). Estes dados sugerem que as ligninas solúveis de alto peso molecular não são macromoléculas ligadas covalentemente e sim agregados de moléculas menores unidas por interações secundárias.

A existência de pontes de hidrogênio entre lignina e carboidrato já foi reportada por Bjorkman (26).

Assim, entre os vários tipos de ligações envolvendo as hemiceluloses e a lignina (além das ligações covalentes), podemos considerar também a possibilidade de associações fracas que provavelmente não envolvam ligações químicas, ou seja, interações secundárias.

Além das dificuldades em se estabelecer os pontos e tipos de ligações, as estruturas dos complexos também podem divergir. Os esquemas abaixo, propostos por Lai e Sarkanen (112) sugerem algumas possibilidades.



No esquema apresentado temos:

- (a) lignina como ramificações no polissacarídeo;
- (b) estrutura do tipo "Cross linked";
- (c) lignina servindo como ponte entre cadeias de polissacarídeos;
- (d) estrutura tipo estrela.

3.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE A XILANA E COMPOSTOS FENÓLICOS DA LIGNINA .

A O-acetil-xilana (fração I) foi aplicada em coluna de Bio Gel P300 e eluída com tampão acetato 25 mM, pH7,2. Escolheu-se esta fração devido a sua solubilidade em água e principalmente devido ao processo suave utilizado na sua obtenção. O perfil de eluição encontra-se na figura 18.A. As alíquotas foram analisadas para carboidrato (DO 480 nm) e para lignina (DO 280 nm). Pode-se observar dois picos, um com maior peso molecular (menor proporção **a**) enquanto que o segundo possui peso molecular menor (maior proporção **b**). Parece claro que há lignina associada aos dois picos. Após a eluição do pico **b** as alíquotas foram analisadas até o volume de 50 ml não sendo detectada mais absorvância em 480 ou 280 nm. O pico **a** (figura 18. A) foi hidrolisado e os componentes analisados por g.l.c. (col. b) na forma de acetatos de alditois apresentando principalmente xilose, pequenas quantidades de manose, galactose, glucose e lignina, conforme indicado na fig. 19.A. O pico **b** (fig. 18.A) foi analisado da mesma forma (fig. 19.B) e apresenta, comparativamente ao pico **a**, menores proporções de manose, galactose, glucose e lignina. A diminuição de lignina com relação ao carboidrato no pico **b** (comparando-se ao pico **a**) é também perceptível na fig. 18.A.

Quando a O-acetil-xilana (fração I) foi aplicada a uma coluna de DEAE celulose (forma Cl^-) e eluída sequencialmente com água, soluções de NaCl (0,1; 0,3 e 1N) e ácido acético foram obtidas 5 frações, respectivamente Ia, Ib, Ic, Id e Ie. Cada fração foi analisada por g.l.c. após hidrólise, redução e acetilação. Os resultados indicaram que são todas xilanas acídicas, contendo em adição pequenas quantidades de manose, galactose e glucose, conforme indicado na tabela VI. A fração Ib foi a que se obteve em maior proporção (65,40 %).

Assim, a fração Ib foi permeada em coluna de Bio Gel P300 e as alíquotas analisadas para carboidrato (absorvância a 480 nm) e

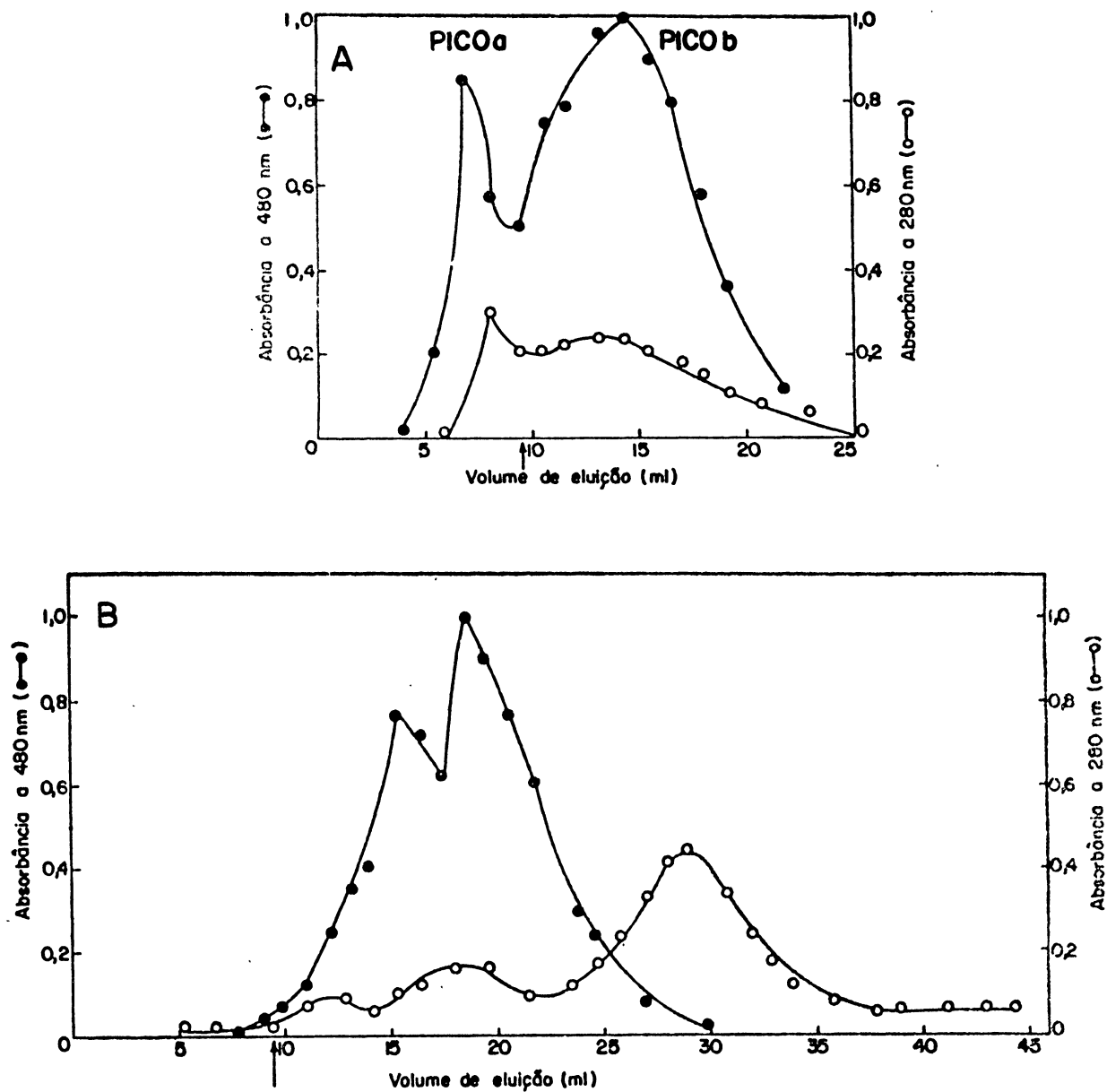


Fig. 18- Filtração em coluna de Bio Gel P300 (coluna 38 x 0,8 cm , eluente tampão fosfato 25 mM, pH 7,2).

A: O-acetil-xilana (fração I).

B: O-acetil-xilana previamente fracionada por coluna de DEAE celulose (forma Cl^-) e eluida com NaCl 0,3N (fração Ib).

Cada fração foi analisada para carboidrato (●-●) e lignina (○-○).

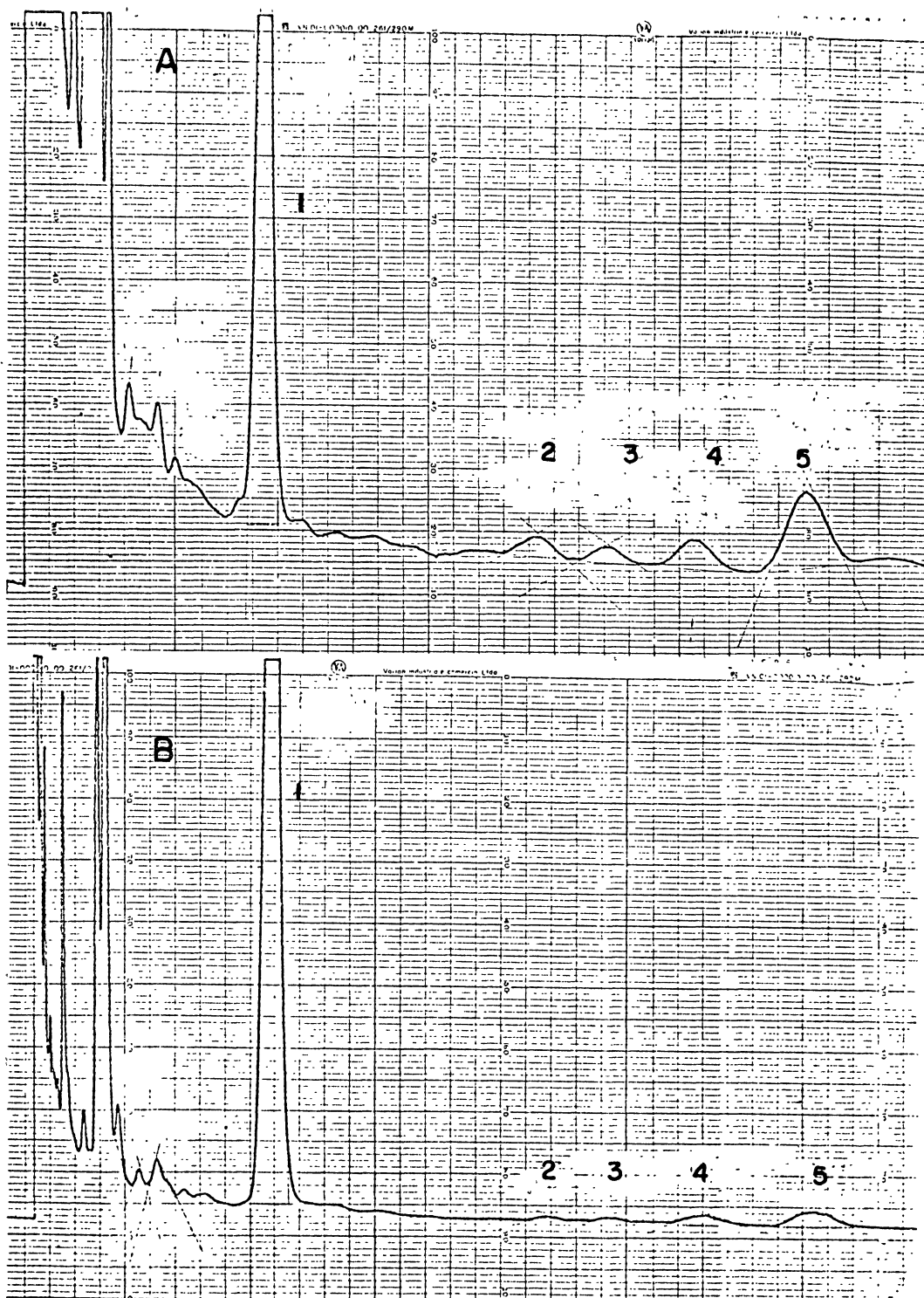


Fig. 19- Cromatograma em g.l.c. (col. b) da O-acetil-xilana (Fração I), fracionada por Bio Gel P300 (fig. 18 A).

A: pico **a**; B: pico **b**, na forma de acetatos de alditois.

- (1) xilose;
- (2) manose;
- (3) galactose;
- (4) glucose;
- (5) derivado de lignina.

Tabela VI - FRACIONAMENTO DA O-ACETIL-XILANA (FRAÇÃO I) EM COLUNA DE DEAE CELULOSE (FORMA Cl^{-}).

Monossacarídeos ^b								
Sub fração (elulente)	Rendimento ^a (%)	Rhamnose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	Ácido Urônico ^c
Ia (H ₂ O)	2,13	4,07	2,38	82,44	2,88	1,90	5,58	nd ^d
Ib (NaCl 0,1M)	65,40	1,40	1,55	81,00	1,80	1,90	2,0	13,0
Ic (NaCl 0,3M)	9,60	1,65	0,35	81,90	1,45	1,70	1,90	15,5
Id (NaCl 1,0M)	8,40	1,4	0,55	78,00	1,92	0,5	3,52	14,0
Ie (AcOH 12,5 %)	14,42	0,9	0,45	75,20	1,10	1,00	3,3	18,0

^a Como carboidrato total pelo método fenol-sulfúrico (51).

^b Determinado por g.l.c. dos monossacarídeos na forma de acetatos de alditois.

^c Dosado pelo método de carbazol (25).

^d Não determinado.

lignina (absorbância a 280 nm). Conforme mostra a figura 18.B, o perfil do carboidrato é semelhante ao obtido para a hemicelulose original (fração I, fig. 18.A), porém uma parte da lignina foi desmembrada do carboidrato, aparecendo livre ao se aumentar o volume de eluição. Isto indicou que uma fração da lignina que estaria fracamente ligada a hemicelulose foi dissociada da mesma durante o fracionamento na coluna de DEAE celulose.

Pela facilidade com que esta fração de lignina foi separada do carboidrato, isto é, durante o fracionamento em DEAE celulose (forma Cl^-), pelo aumento da força iônica (NaCl 0,1M) pode-se supor que se trata de uma associação não covalente. Não podemos afirmar qual a natureza desta ligação, porém pode-se aventar a hipótese de que se trata de associação por pontes de hidrogênio ou outras interações fracas, a semelhança das interações secundárias que ocorrem na própria lignina.

3.9 ESTUDO DA LIGAÇÃO ESTER ENTRE O ÁCIDO 4-O-METIL-GLUCURÔNICO E COMPOSTOS FENOLICOS DA LIGNINA.

Foi sugerido por Sarkar e colaboradores (163,164) e por Bhattacharjee e Callow (21) que algumas unidades de ácido 4-O-metil-glucurônico presentes em hemiceluloses de fibras foliares estariam ligadas à lignina através de ligação ester. A suposição foi baseada no fato que o valor do ácido nestas hemiceluloses aumentava quando elas eram delignificadas por clorito de sódio (182). Esta justificativa, entretanto, é questionável pois é pouco provável que o agente delignificante quebre as ligações ester. De fato, foram isoladas hemiceluloses O-acetiladas a partir de madeira (125) e de fibra de juta, (169) pré-tratadas com clorito de sódio. A delignificação com cloro também não afeta ligações ester, pois o teor de grupos O-acetílicos não é alterado quando O-acetil-xilanas são obtidas por este processo.

Talvez o aumento do teor de ácido encontrado por estes autores (21, 163, 164) esteja relacionado ao fato de que a oxidação da própria lignina durante o processo de delignificação produza grupos carboxílicos (44).

Por outro lado, é também relevante observar que ligações ester podem ocorrer na própria lignina envolvendo ácidos aromáticos (111, 136). Estas ligações ocorrem entre os ácidos e as hidroxilas ali

fáticas preferencialmente às hidróxilas fenólicas da lignina.

Das e colaboradores (48) e Sharma (170) estudaram hemiceluloses obtidas de fibras de juta e de folhas de ananás, respectivamente. As hemiceluloses foram extraídas antes e após o tratamento das fibras com boroidreto de sódio. Os resultados permitiram concluir que existem ligações ester entre o ácido 4-O-metil-glucurônico das xilanas e a lignina, (conforme já citado na introdução) sendo que esta última contribui com o grupo hidroxílico.

Desta forma consideramos importante verificar se este tipo de ligação ester ocorre também em caules lenhosos, especificamente em suas hemiceluloses. A O-acetil-xilana da bracinga (fração I) foi escolhida para este estudo em virtude de ter sido obtida em condições tais que ligações ester não seriam rompidas, como é o caso dos próprios grupos O-acéticos. Obviamente as hemiceluloses A e B, produtos de extração alcalina, são isentas de substituintes desta natureza.

A O-acetil-xilana foi tratada com soluções de boroidreto de sódio e de ácido bórico, alternadamente, a fim de se manter o pH em torno de 7,0 - 7,5. O aumento do pH nesta fase simplesmente causaria a hidrólise da ligação ester, liberando a lignina e os grupamentos carboxílicos do ácido urônico ao invés de promover a carboxi-redução dos mesmos. O polissacarídeo carboxi-reduzido foi precipitado por etanol. O processo foi repetido por mais duas vezes a fim de se assegurar completa carboxi-redução. O sobrenadante etanólico apresentou absorvância positiva a 280 nm, indicando que houve liberação de compostos aromáticos e o espectro na região de 360 a 210 nm foi similar ao que se vê nas figuras 6 e 12. O ácido urônico e a lignina foram determinados no polissacarídeo original bem como após a sua carboxi-redução, conforme mostra a tabela VII. A lignina, determinada pelo método de Bar-Lev (15) passou de 6 a 2,5 %, enquanto que os ácidos urônicos, pela técnica do carbazol (25), de 15,6 a 13,2 %. Podemos observar que a diminuição relativa da lignina e dos ácidos urônicos no processo de carboxi-redução foi respectivamente de 58 e 15 %.

A diminuição do ácido urônico indica que 15 % de suas unidades (que substituem algumas unidades de D-xilopiranoses da xilana), encontram-se ligadas a lignina através de ligação ester.

Tabela VII- ANÁLISE DE LIGNINA E ÁCIDO URÔNICO NA O-ACETIL-XILANA (FRAÇÃO I) ANTES E APÓS A CARBOXI-REDUÇÃO ($\text{NaBH}_4 - \text{H}_3\text{BO}_3$; pH 7,0 - 7,2).

	^a Lignina %	^b Ácido urônico %
<u>O</u> -acetil-xilana (fração I)	6,0	15,6
<u>O</u> -acetil-xilana carboxi reduzida	2,5	13,2
Diminuição relativa	58	15

^a Pelo método de Bar-Lev (15), utilizando-se álcool coniferílico como padrão e em relação ao açúcar total dosado pelo método fenol sulfúrico (51).

^b Pelo método do carbazol (25).

A perda da lignina em 58 %, quase quatro vezes maior do que a dos ácidos urônicos pode ser explicada por duas razões:

(a) a fração de lignina que não está ligada quimicamente à xilana e sim fracamente associada, conforme já foi discutido, deve ter sido dissociada durante o processo da redução e permanecido no sobrenadante alcoólico;

(b) cada unidade de ácido 4-O-metil-glucurônico que foi carboxi-reduzida deveria estar esterificada por uma cadeia de lignina, provavelmente um polifenil-propano.

A O-acetil-xilana original (fração I) e a O-acetil-xilana carboxi-reduzida foram hidrolizadas e os açúcares constituintes analisados por g.l.c. na forma de acetatos de alditois. Os cromatogramas estão indicados na fig. 20. A xilana original (fig. 20.A) conforme já se sabe, contém pequenas proporções de ramnose, arabinose, galactose e glucose. A xilana reduzida (fig. 20.B), além destes constituintes, apresentou um novo açúcar, a 4-O-metil-glucose, resultante da redução do ácido 4-O-metil-glucurônico. Este novo componente representa 2,1% dos açúcares totais. Sabendo-se que 2,1% correspondem a 15% dos ácidos urônicos totais, se extrapolarmos este valor para 100 devemos obter 14% que está muito próximo ao valor do ácido urônico na fração original (13%), determinado pelo método do carbazol (tabela I).

É interessante observar que o valor da lignina determinado após a carboxi-redução (2,5%, tabela VIII) aproxima-se dos valores encontrados para as hemiceluloses A e B (tabela II), conforme o esperado.

O fato de ainda persistir lignina na xilana carboxi-reduzida e sua existência nas hemiceluloses A e B demonstra que, além das ligações discutidas, deve haver ainda uma ligação de caráter covalente e resistente a alcali.

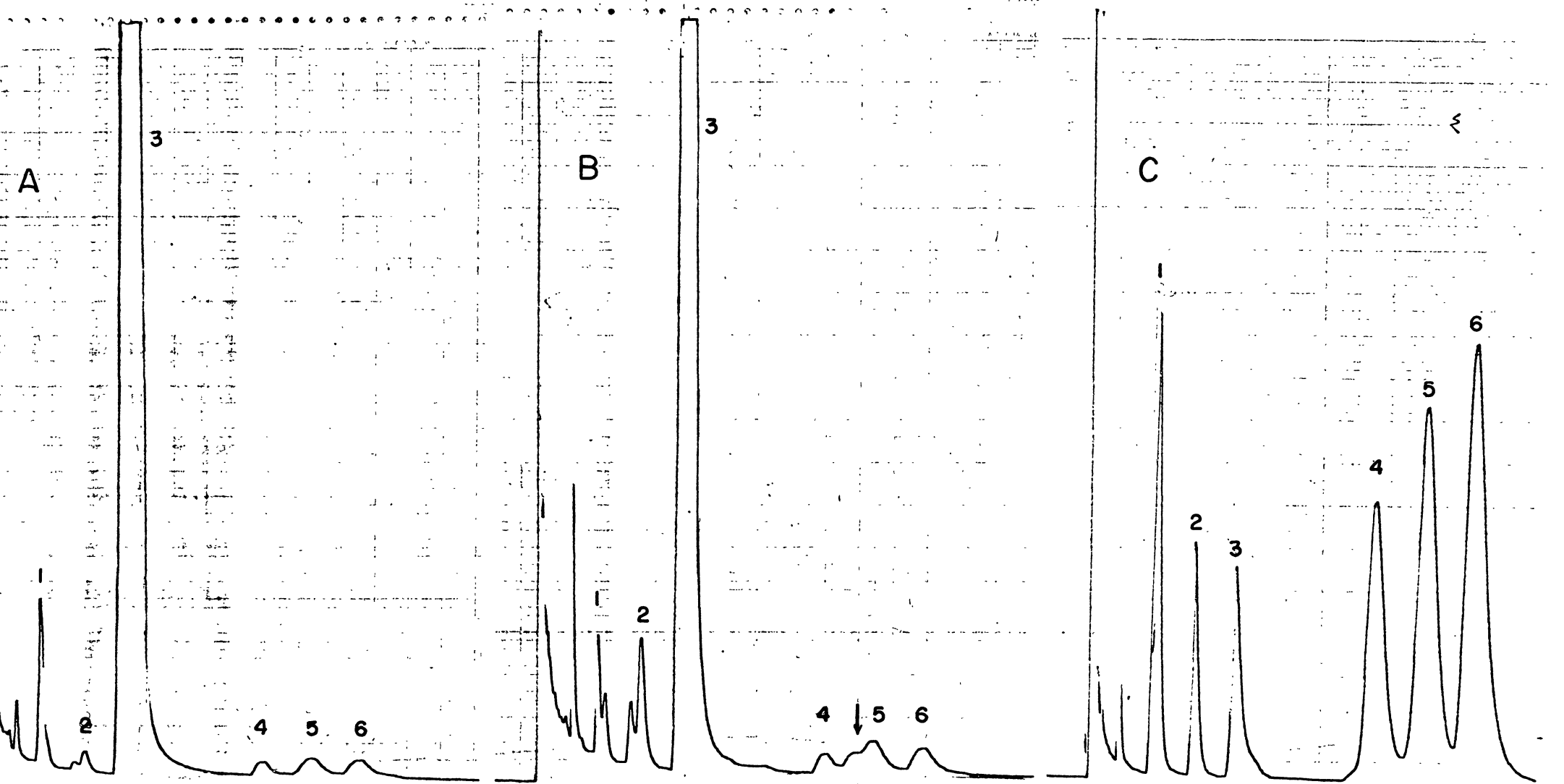


Fig. 20- Cromatogramas em g.l.c. da O-acetil-xilana (col. a) na forma de acetatos de alditois.

A: O-acetil-xilana (Fração I)

B: O-acetil-xilana reduzida ($\text{NaBH}_4 - \text{H}_3\text{BO}_3$; pH 7,0 - 7,2)

C: Padrões de acetatos de alditois: (1) ramosose, (2) arabinose, (3) xilose, (4) manose, (5) galactose, (6) glucose.

A seta indica a 4-O-metil-glucose proveniente da redução do ácido 4-O-metil-glucurônico.

Tabela VIII- COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DA O-ACETIL-XILANA (FRAÇÃO I) ANTES E APÓS A CARBOXI-REDUÇÃO
($\text{NaBH}_4 - \text{H}_3\text{BO}_3$; pH 7,0 - 7,2)

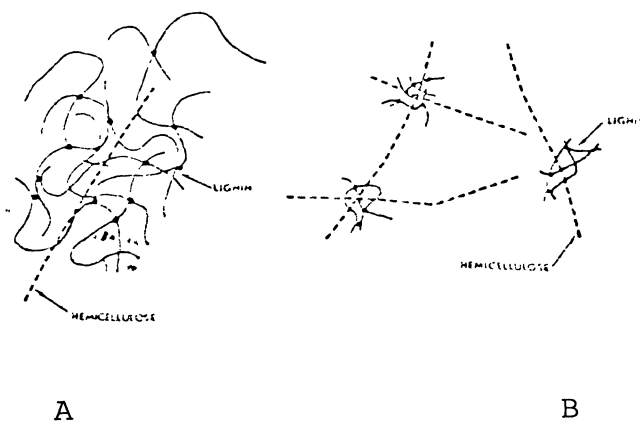
	^a M o n o s s a c a r í d e o s						
	Rhamnose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	4-O-metil-glucose
<u>O</u> -acetil-xilana (fração I)	4,06	0,90	91,20	0,67	1,71	1,35	—
<u>O</u> -acetil-xilana carboxi-reduzida.	2,38	3,60	84,10	1,14	3,60	3,04	2,10

^a Determinado por g.l.c. dos açúcares analisados na forma de acetatos de alditois (col. a).

3.10 ESTUDO DA LIGAÇÃO ÉTER ENTRE A XILANA E COMPOSTOS FENÓLICOS DA LIGNINA.

As ligações covalentes entre lignina e carboidrato são relativamente raras e podem ser vistas como pontos ocasionais de união que contribuem para a estabilidade das três estruturas poliméricas que se entrelaçam na formação da madeira.

Goring (81) adverte que a dificuldade de separação de pequenas porções de lignina de preparações de carboidratos, ou vice versa não se deve necessariamente à presença de ligações covalentes entre a lignina e o carboidrato. No preparo de lignina, moléculas de carboidratos podem ficar presas na matriz de lignina, conforme mostra o esquema abaixo (A). Da mesma forma, uma preparação de hemicelulose pode reter em sua cadeia pequenas moléculas de lignina, difíceis de remover (B, 81)



Conforme já foi discutido, a O-acetil xilana de bracinga possui lignina associada por interações secundárias, lignina ligada por ligação ester via ácido urônico e ainda lignina unida à xilana mais fortemente do que nos dois casos anteriores.

Como a hemicelulose A é estruturalmente igual a O-acetil xilana desacetilada, foi o material escolhido para o estudo do terceiro tipo de ligação entre a xilana e a lignina. A hemicelulose A foi extraída com alcali, portanto é isenta de lignina associada por interações secundárias e por ligação ester, que não resistem a este

tipo de tratamento. Além disto a hemicelulose A é facilmente extraída em quantidades apreciáveis, enquanto que o rendimento máximo que obtivemos para a O-acetil-xilana foi 6 % (fração A). Como já partimos do pressuposto que os pontos de ligação entre a xilana e lignina são poucos, seria necessário uma grande quantidade de hemicelulose A para identifica-los.

Com a finalidade de obter-se uma fração enriquecida com lignina, foi isolado o complexo lignina-xilana (LXC) por degradação da fração carboidrato das hemiceluloses com metaperiodato de sódio.

O método do periodato é utilizado para isolar com bom rendimento lignina de tecidos vegetais (112). Este processo evita as condensações que modificam as ligninas obtidas por ação de ácidos, porém causa algumas modificações por oxidação. É baseado na conversão gradual das unidades monossacarídicas dos polissacarídeos a dialdeídos, os quais são suscetíveis a hidrólise com água a 100°. Requer no mínimo seis tratamentos com periodato (24 h a 20°), cada um seguido de tratamento com água fervente durante 3 horas.

Foi demonstrado (112) que as unidades de lignina que contêm hidroxilas fenólicas livres são convertidas pelo periodato, inicialmente a quinonas e, finalmente, a ácido muconico, liberando metanol. Este princípio é utilizado inclusive para determinação de grupos metoxil.

Apesar do processo oxidativo, aproximadamente 80% ou mais das unidades de lignina permanecem intactas (112).

A oxidação com periodato é um método rotineiro em estudos estruturais de carboidratos, sendo muito empregada a degradação tipo Smith (77). Esta é uma degradação controlada que consiste na oxidação com periodato, seguida de redução e hidrólise.

Quando uma unidade de açúcar de um polissacarídeo é fragmentada pelo periodato e reduzida com NaBH_4 , o derivado alcoólico resultante, sendo um acetal acíclico, é sensível a ácido diluído; por outro lado, quando uma unidade de açúcar resistente ao periodato é ligada a uma unidade que foi fragmentada pelo mesmo processo oxidativo, a unidade resistente aparece como um glicosídeo, que é estável a ácido em condições suaves (H_2SO_4 1N, temp. ambiente).

Sabendo-se que as xilanas de bracinga são lineares (46 143,197) e possuem ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), a quase totalidade das unidades de D-xilopiranoses são oxidadas pelo tratamento com periodato sendo, após a redução, hidrolisadas. Ficam resistentes a este tratamento as unidades de xilose que possuem ramificação no carbono 2 por unidades de ácido 4-O-metil-glucurônico (46) e, eventualmente aquelas ligadas à lignina. Entretanto, as unidades de ácido 4-O-metil-glucurônico são oxidadas pelo periodato nos carbonos 2 e 3 e, conseqüentemente, após a redução, sensíveis à hidrólise suave. Desta forma, como resultado da primeira degradação, novas unidades de D-xilopiranoses tornam-se acessíveis ao periodato.

De uma segunda degradação tipo Smith, nas condições utilizadas no experimental, deveriam sobrar somente as unidades de D-xilopiranoses ligadas à lignina, não suscetível ao tratamento alcalino.

Considerando estes fatos, a degradação tipo Smith foi escolhida para isolar segmentos de lignina ligados à xilana, ou seja, complexos lignina-xilose (LXC).

Inicialmente, a O-acetil-xilana (fração I desacetilada), a hemicelulose A e a hemicelulose B (100 mg de cada) foram submetidas isoladamente a duas degradações tipo Smith. Os produtos obtidos das três amostras foram hidrolisados com ácido sulfúrico 72 % (168) e analisados por g.l.c., após acetilação (col. b). O resultado destas análises indicou, nos 3 casos, que os complexos obtidos são constituídos por xilose e derivado de lignina, por comparação com os tempos de retenção dos derivados de xilose e da Klason lignina, obtidos nas mesmas condições.

Com a finalidade de se obter quantidade suficiente de LXC para as demais análises, a hemicelulose A (5 g) foi submetida a duas degradações tipo Smith em escala preparativa. Durante a hidrólise suave com ácido sulfúrico 1N à temperatura ambiente, observou-se que parte do material era insolúvel em meio ácido, o qual foi centrifugado e lavado com água, originando o complexo lignina-xilose insolúvel (LXC₁). O sobrenadante foi dialisado contra água corrente durante 48 horas e concentrado a pressão reduzida, originando o complexo lignina-xilose solúvel (LXC₂). A análise por g.l.c. indicou que LXC₁ e LXC₂ são qualitativamente idênticos. A quantidade de

lignina em relação ao carboidrato é maior em LXC₁, o que justifica sua insolubilidade em água.

Outro complexo lignina-xilose foi preparado submetendo-se a hemicelulose A somente a uma degradação tipo Smith (LXC₃). Os complexos foram analisados por U.V., I.V. e g.l.c.

A fig. 21 mostra os espectros de U.V. de LXC₂ (fig.21.A), clorolignina (21.B), Klason Lignina (21.C) e LXC₃ (21.D). Pode-se observar que há grande similaridade entre os espectros dos complexos obtidos (fig.21.A e D) com os espectros da clorolignina e da Klason lignina, respectivamente, fig. 21.B e 21.C. Os quatro espectros mostrados na fig. 21 são ainda semelhantes ao apresentado na fig.6, que corresponde à O-acetil-xilana. Todos apresentam o ombro característico da lignina, na região de 270 - 290 nm.

A fig. 22 mostra os espectros de I.V. de LXC₂ (fig. 22.A) e da Klason lignina (fig. 22.B), realizados em discos de KBr. Conforme já discutido, as pastilhas, devido a coloração das amostras, não apresentaram a transparência necessária. Apesar disto, os seguintes picos principais foram identificados nos dois espectros (fig.22.A e 22.B), que são: 3400 cm⁻¹ - grupamento OH; 1630 cm⁻¹ grupamento carbonila de aril cetona; 1435 cm⁻¹ vibrações do esqueleto aromático e 1130 cm⁻¹ CH aromático (Siringil).

Uma amostra de LXC₂ foi hidrolisada, reduzida, acetilada e analisada por I.V. em filme sobre célula de cloreto de sódio. O espectro é mostrado na fig.23.D, juntamente com os espectros da Klason lignina, do resíduo da hidrólise ácida da hemicelulose A e do álcool coniferílico, todos previamente acetilados. Pode-se observar a grande similaridade entre os espectros (fig. 23.A, B, C e D), indicando a presença de lignina em LXC₂. Os principais picos comuns nos quatro espectros são: 2930 e 2850 cm⁻¹, 1740 cm⁻¹, 1465 cm⁻¹, 1380 cm⁻¹, e 1240 cm⁻¹, que foram identificados, respectivamente, como: CH de metil e metileno, acetato, CH assimétrico, CH simétrico e anel aromático (95).

As análises por g.l.c. de LXC₂ e LXC₃ após hidrólise, redução e acetilação são indicadas, respectivamente, nas figuras 24 e 25. Comparando-se com os padrões, foram identificados nos dois complexos a xilose (pico 1) e o derivado de lignina (pico 4). Analisando-se

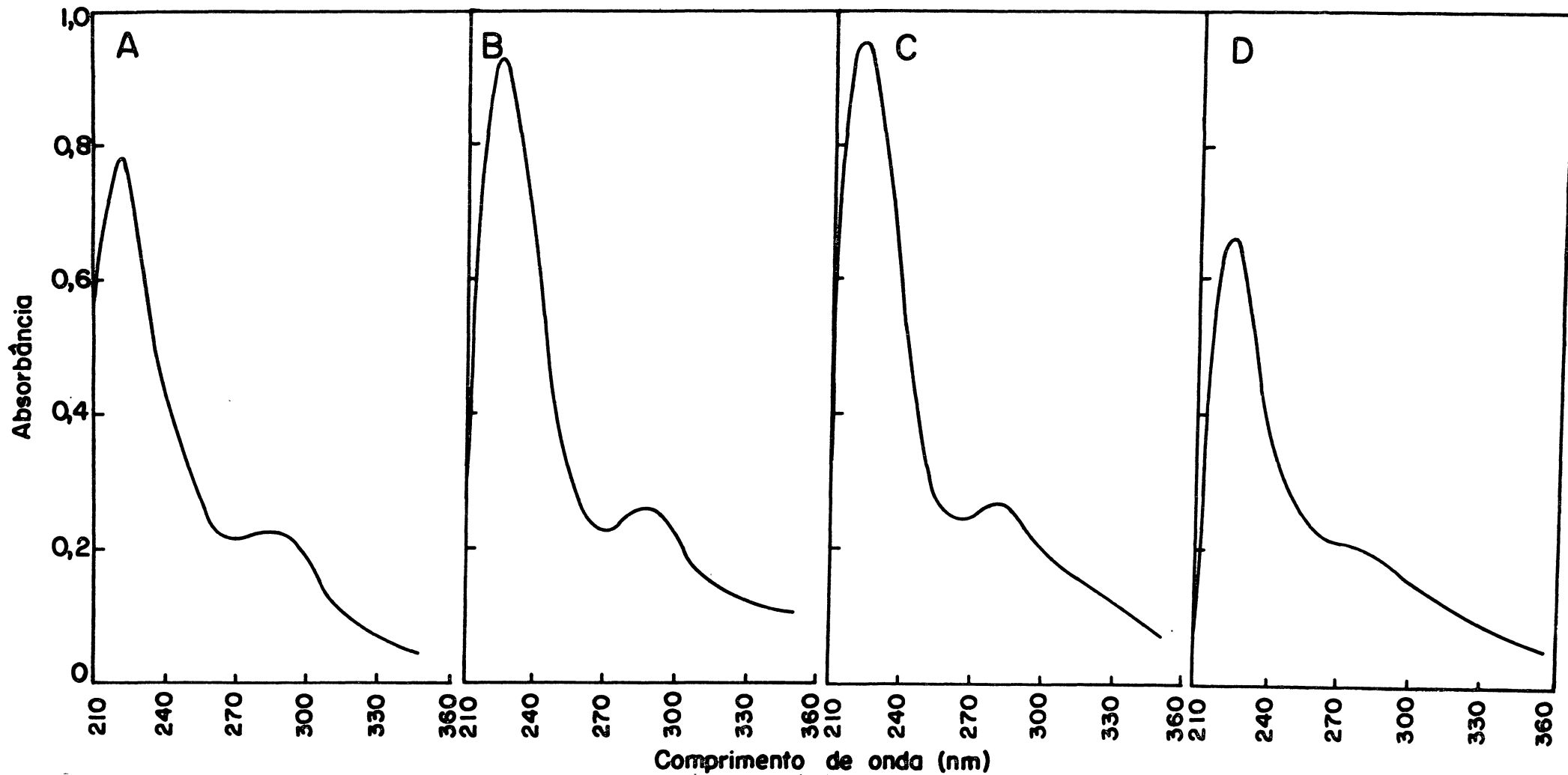


Fig. 21- Espectros de U.V.

A: LXC₂ em H₂O

B: Clorolignina em Etanol

C: Klason Lignina em Etanol

D: LXC₃ em Etanol

Obs.: comparar com a Fig. 6.

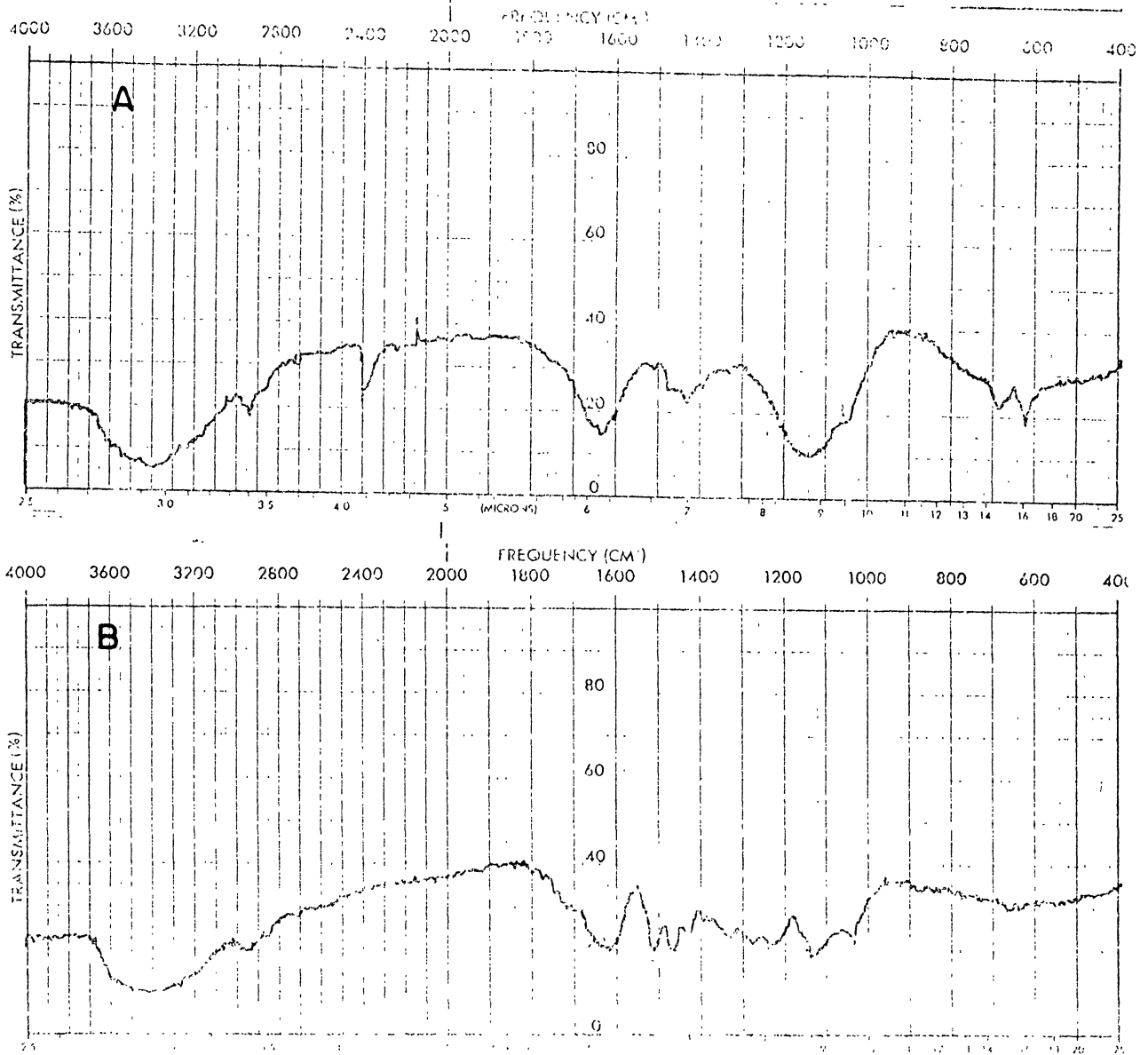


Fig. 22- A- Espectro de I.V. de LXC_2 em disco de KBr.

B- Espectro de I.V. de Klason Lignina em disco de KBr.

As pastilhas foram preparadas com 2 mg de amostra e 300 mg de KBr.

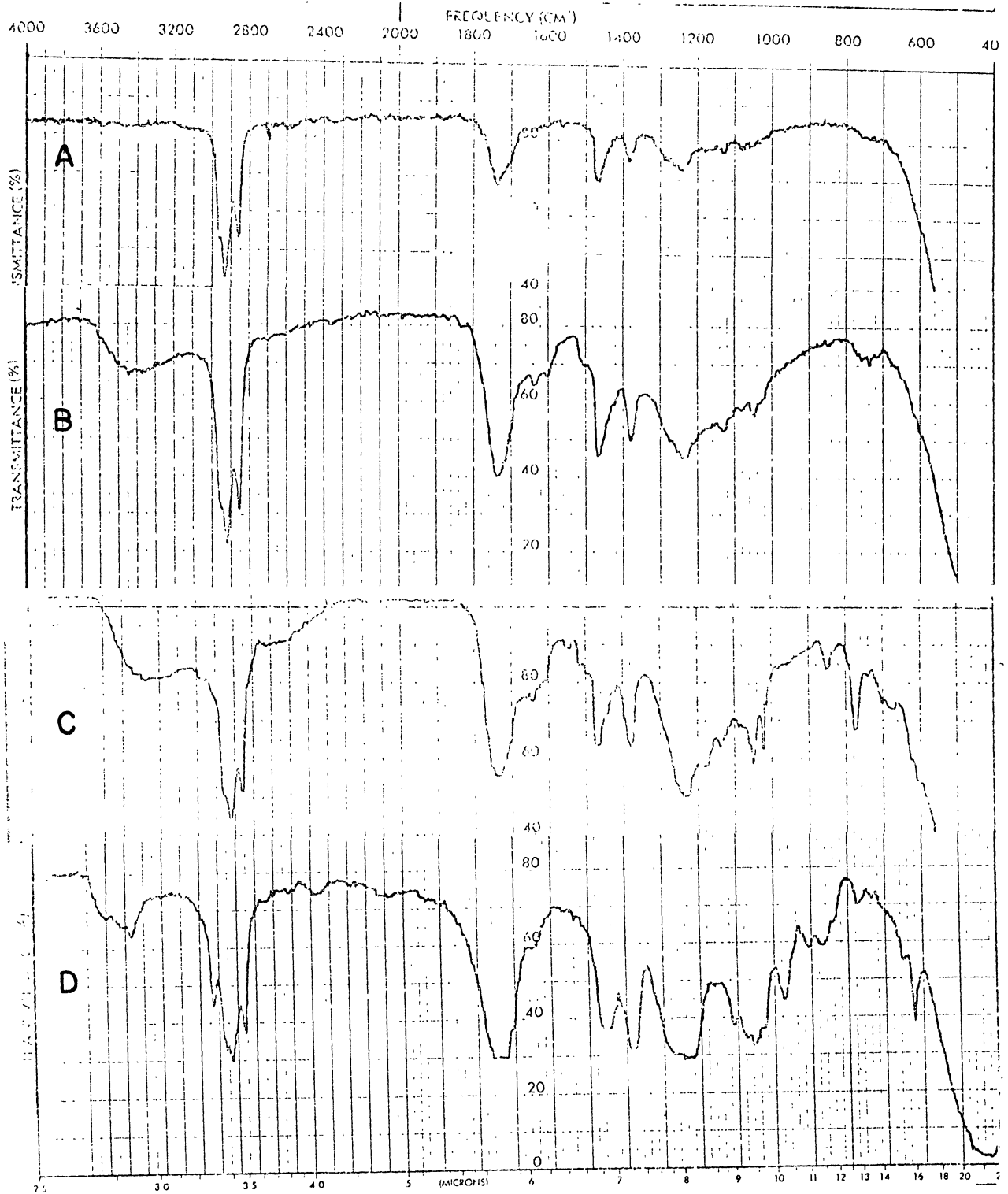


Fig. 23- Espectros de I.V. (filme sôbre célula de NaCl; solvente CHCl_3) de:

- A: Klason Lignina acetilada.
- B: Resíduo da hidrólise ácida (Saeman) de Hemicelulose A, após acetilação.
- C: Álcool coniferílico, tratado com H_2SO_4 e acetilado.
- D: LXC_2 hidrolisado e acetilado.

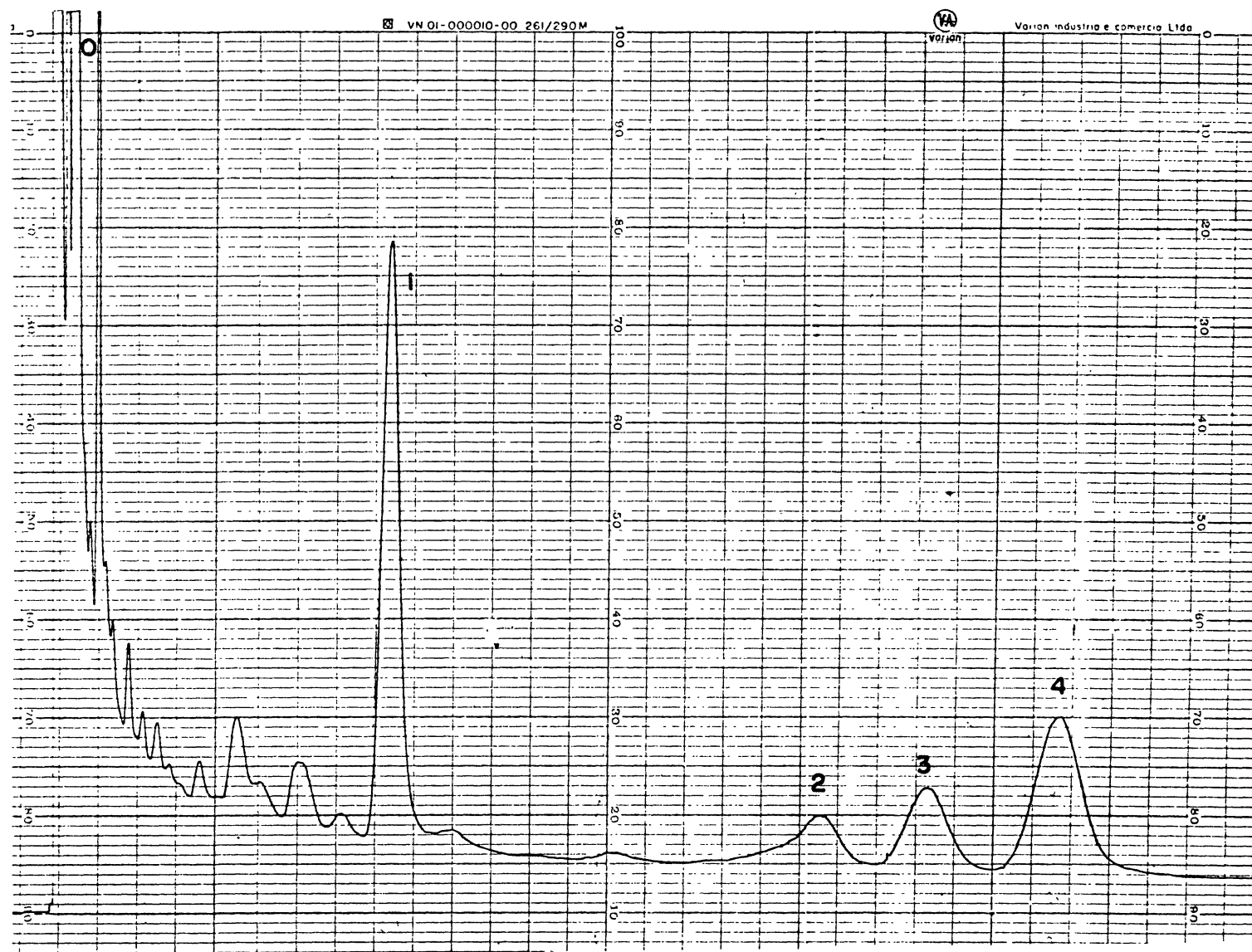


Fig. 24- Cromatograma em g.l.c. (col. b) de LXC₂ após hidrólise, redução e acetilação (0) glicerol, (1) xilose, (2, 3) ?, (4) derivado de ligninã.

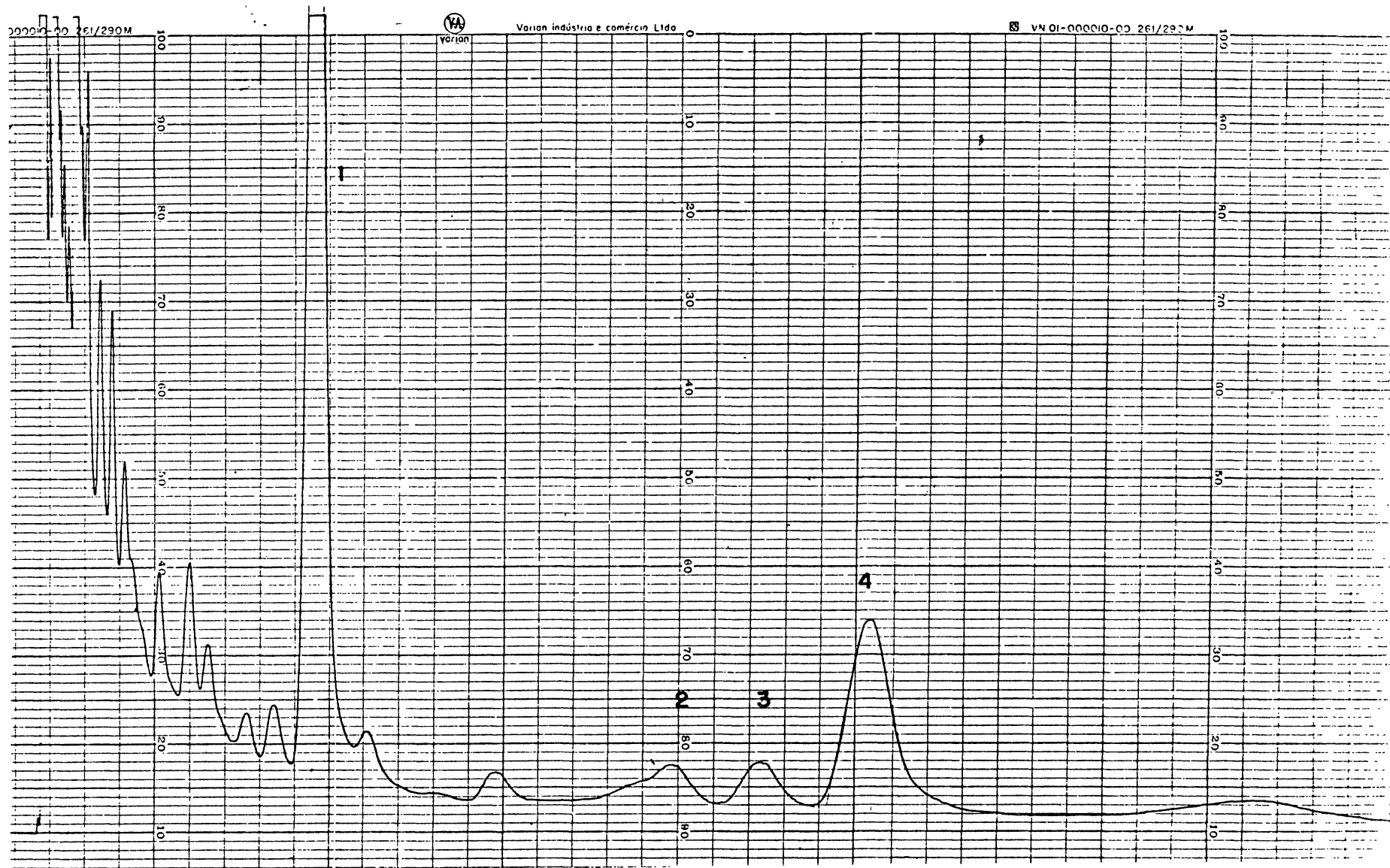


Fig. 25- Cromatograma em g.l.c. (col. b) de LXC₃ após hidrólise, redução e acetilação
 (1) xilose, (2, 3) ?, (4) derivado de lignina.

a figura 24 com a 25, observa-se que a quantidade de xilose em relação a lignina é muito maior em LXC₃ (fig. 25) do que em LXC₂ (fig. 24). Isto é óbvio, pois em LXC₃ a degradação tipo Smith foi realizada somente uma vez e em LXC₂ duas vezes.

O aparecimento do glicerol nos produtos analisados (fig.24) é justificável pois as unidades de xilose resistentes ficaram ligadas glicosidicamente a estes fragmentos.

A estabilidade dos complexos na presença de alcali é evidente pela própria forma de obtenção da hemicelulose A. Isto ficou mais uma vez comprovado quando LXC₁ (insolúvel em H₂O) foi tratado com metil sulfinil carbanion. Após diálise exaustiva, o material precipitado (LXC₁) foi coletado por centrifugação e sua análise por g.l.c. após hidrólise, redução e acetilação indicou a presença de xilose e do derivado de lignina. Se a ligação entre ambos fosse rompida, a xilose passaria fatalmente ao sobrenadante, pois, conforme foi calculado pelo resultado de metilação o seu grau de polimerização (GP) em LXC₁ é igual a 14.

Os complexos LXC₁ e LXC₂ foram metilados 2 vezes pelo método de Hakomori (87). A figura 26 mostra cromatografia em g.l.c. (col. b) dos produtos de LXC₂ metilado, na forma de acetatos de alditois. Foram identificados os seguintes produtos tanto em LXC₁ como em LXC₂: pico 1 (T=0,59) 2,3,4-tri-O-metil-xilose; o pico 2 (T=1,19) 2,3 - di - O - metil-xilose; o pico 3 (T=2,4) como mono-metil-xilose e o pico 4 (T=9,35) derivado de lignina. O cromatograma de LXC₁ nas mesmas condições foi similar ao de LXC₂, apresentando o 1º maior concentração de lignina com relação ao carboidrato.

Ainda pela análise da metilação encontrou-se para LXC₁ um grau de polimerização (GP) em relação a xilose igual a 14 e em LXC₂ igual a 29, o que está coerente com os resultados obtidos pois o GP menor, LXC₁, insolúvel em água possui menos grupamentos hidrofílicos, (menos carboidrato e mais lignina) enquanto que o GP maior, LXC₂, solúvel em água é mais rico nestes grupamentos (mais açúcar e menos lignina).

Numa tentativa de se isolar o derivado de lignina que estaria ligado à xilose, os produtos das metilações de LXC₁ e de LXC₂, na forma de acetatos de alditois, foram separados por cromatografia

em camada delgada preparativa (solvente b) e a faixa que apresentou fluorescência foi analisada por g.c. - m.s., paralelamente a um padrão de álcool coniferílico e de uma amostra de lignina obtida pela hidrólise de hemicelulose A com ácido tri-fluoracético (lignina TFA).

A purificação por t.l.c. preparativa isolou, junto com o derivado de lignina, um composto cuja fragmentação de massa indicou ser o 2,3 ou 3,4 - di-O-metil-xilose (fig. 27.A). Como sabemos que o carbono 4 da xilose está envolvido na ligação glicosídica, esta última possibilidade pode ser descartada.

A figura 27.B mostra a fragmentação de massa do derivado de lignina presente em LXC metilado, acetilado e separado por cromatografia preparativa. Esta fragmentação é idêntica às apresentadas pelo padrão de álcool coniferílico e pela lignina TFA, os quais receberam o mesmo tratamento (fig. 28.A e B). Os espectros indicados nas figuras 27 e 28 foram realizados por impacto eletrônico. A figura 29 mostra a fragmentação obtida por ionização química do álcool coniferílico (A) e de lignina TFA (B), ambos metilados. Pode-se observar que os espectros são absolutamente iguais.

A figura 30 mostra o espectro de ^1H -n.m.r. da lignina TFA acetilada. Podemos observar o sinal do proton aromático a δ 7,2.

A presença de ligação química covalente forte nos complexos isolados (LXC) foi evidenciada por sua resistência aos processos utilizados no seu preparo, bem como aos tratamentos alcalinos. Isto foi confirmado definitivamente através da filtração de LXC em Bio Gel (P30, P100 e P300) e Sephadex (G50).

Para os experimentos de filtração em gel foram utilizados LXC_2 e LXC_3 por serem os mesmos solúveis em água. A figura 31 mostra os perfis de eluição de LXC_2 filtrado em colunas de Bio Gel P30 (figura 31.A), Bio Gel P100 (figura 31.B) e Bio Gel P300 (figura 31.C). Em cada experimento a eluição da coluna foi acompanhada por determinação de carboidrato (absorbância a 480nm) e de lignina (absorbância a 280 nm). Os resultados mostram que a lignina e o carboidrato foram eluídos concomitantemente.

Experimento semelhante foi realizado com LXC_3 (figura 32). Comparando-se as figuras 31 com 32, pode-se observar que a relação

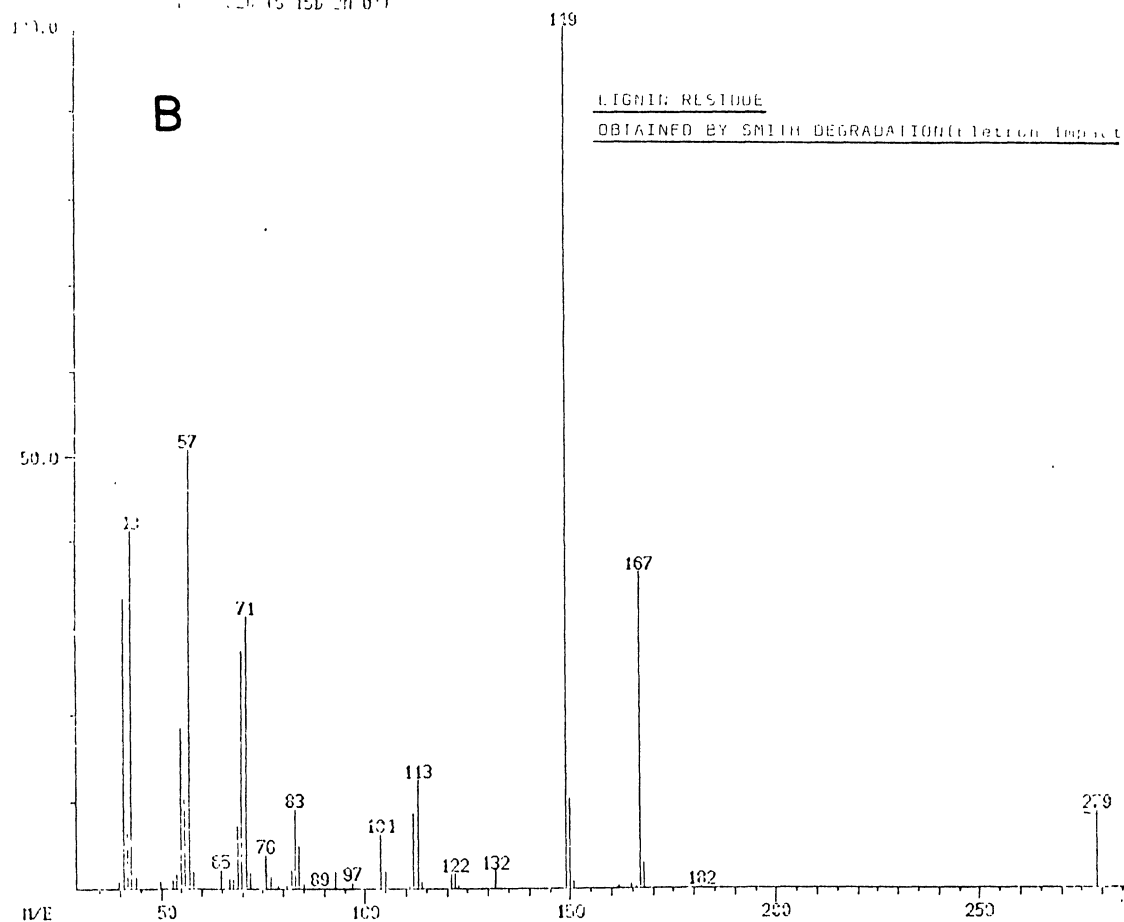
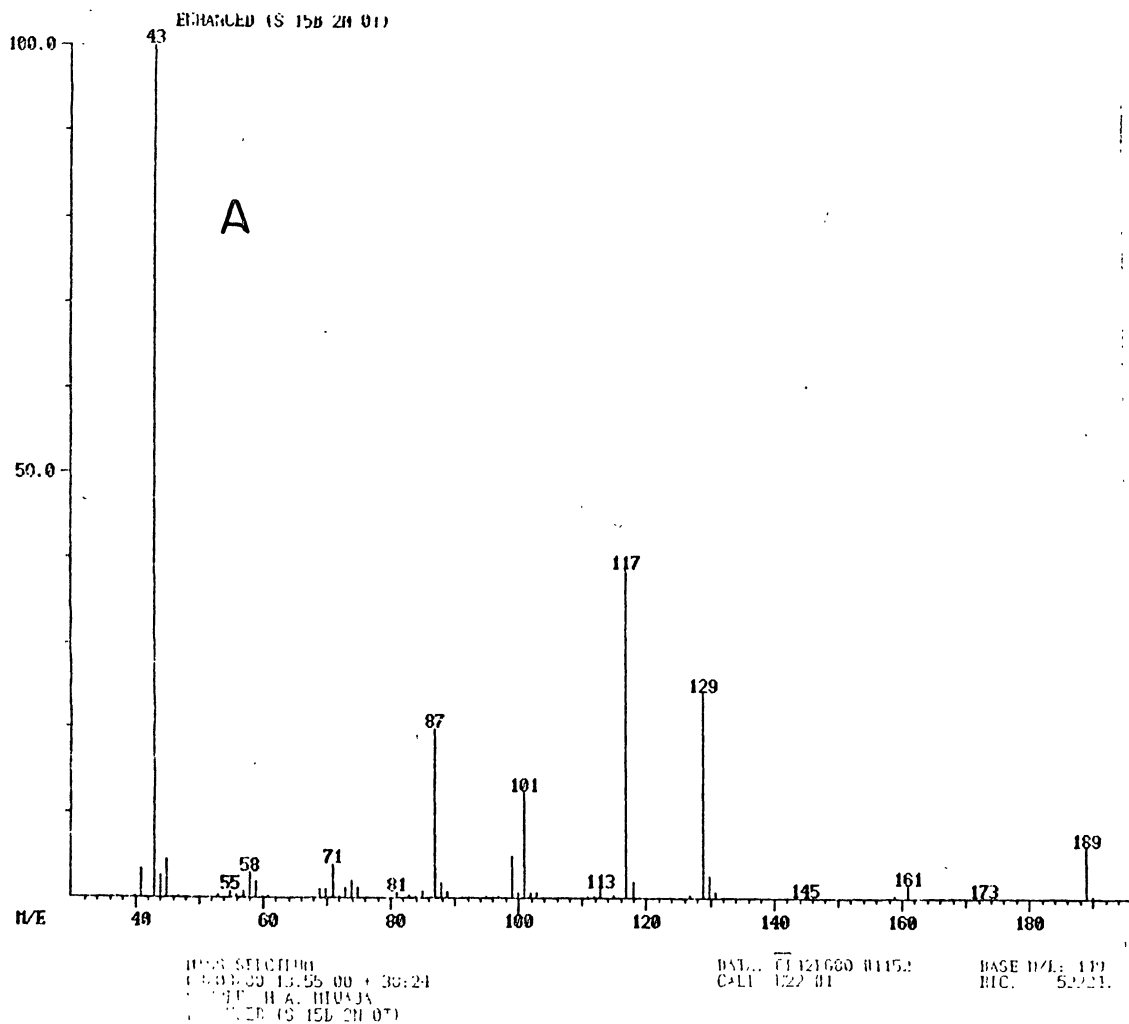
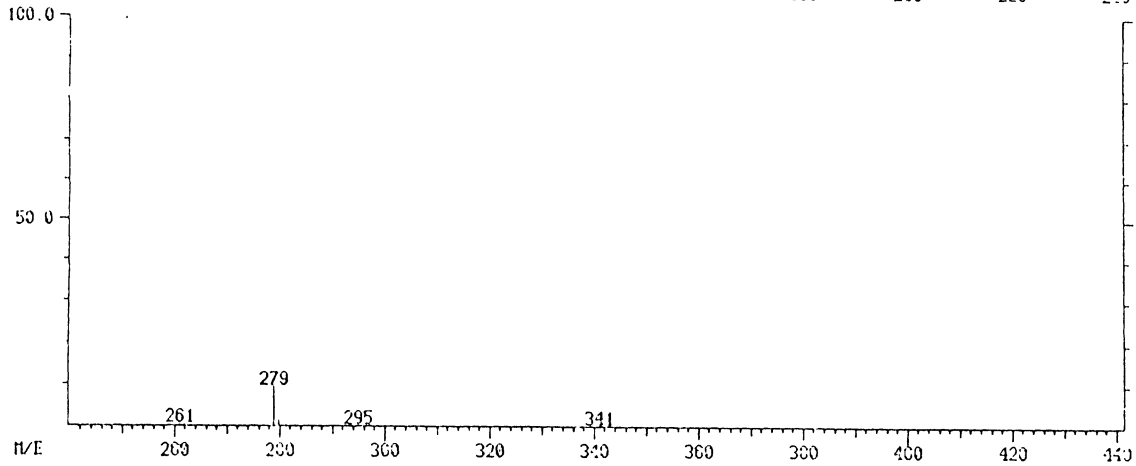
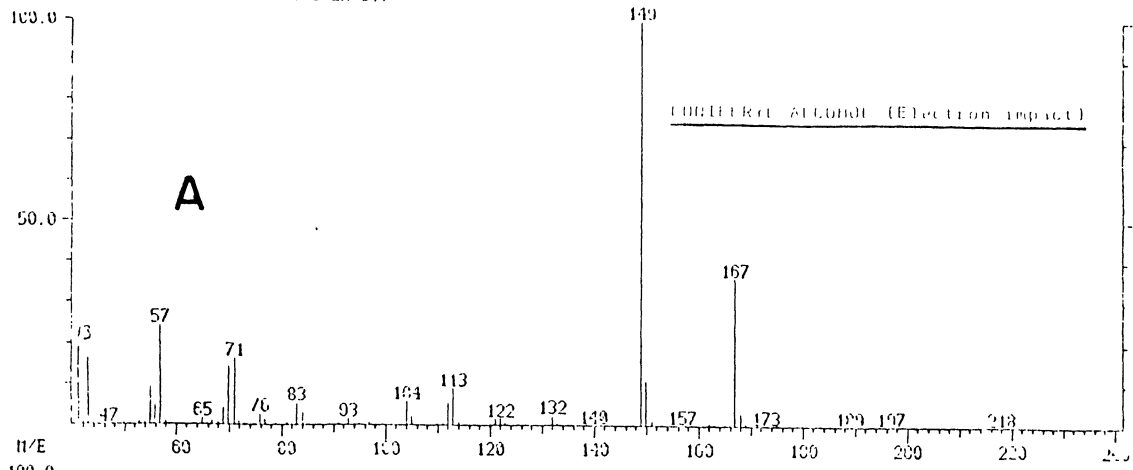


Fig. 27- Espectros de massa (impacto eletrônico) de:

A: 2,3 ou 3,4 di-O-metil xilose.

B: Derivado de lignina de LXC₂ metilado.



DATA: 12/03/81 18:00 + 55.32
SAMPLE: LIGNINA TFA
INSTRUM: C. P. B. 21. 01)

DATA: 12/03/81 18:00
CALL: C151 #1
BASE P.E.: 149
BIC: 38430

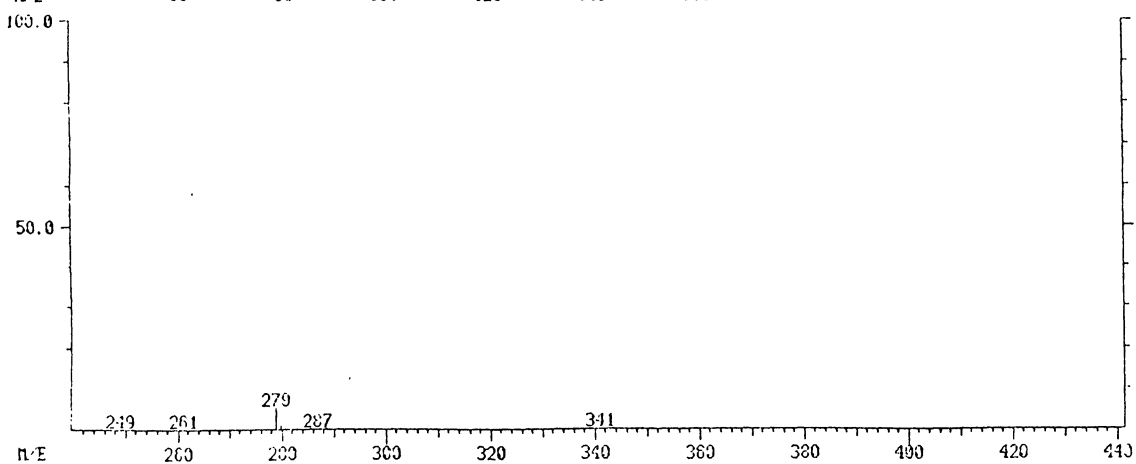
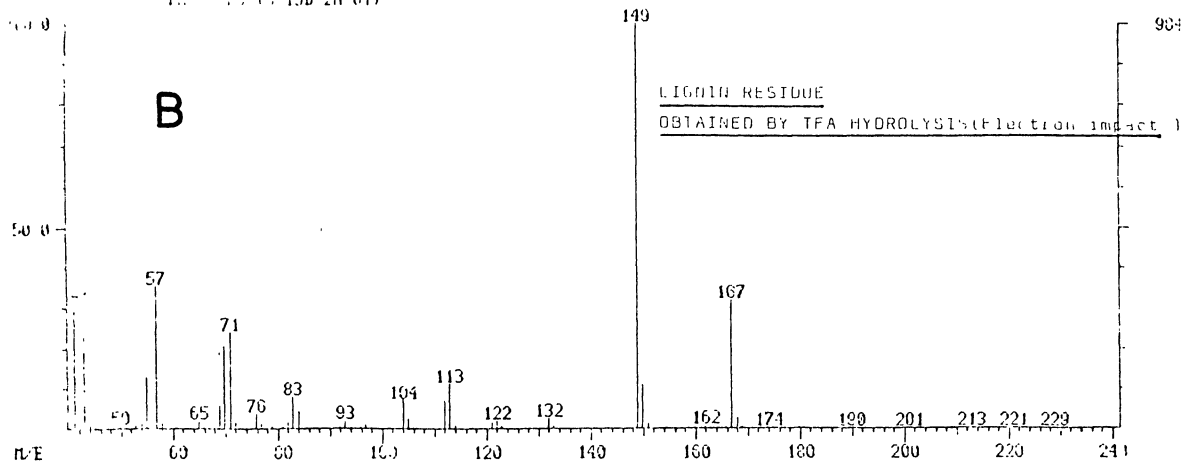
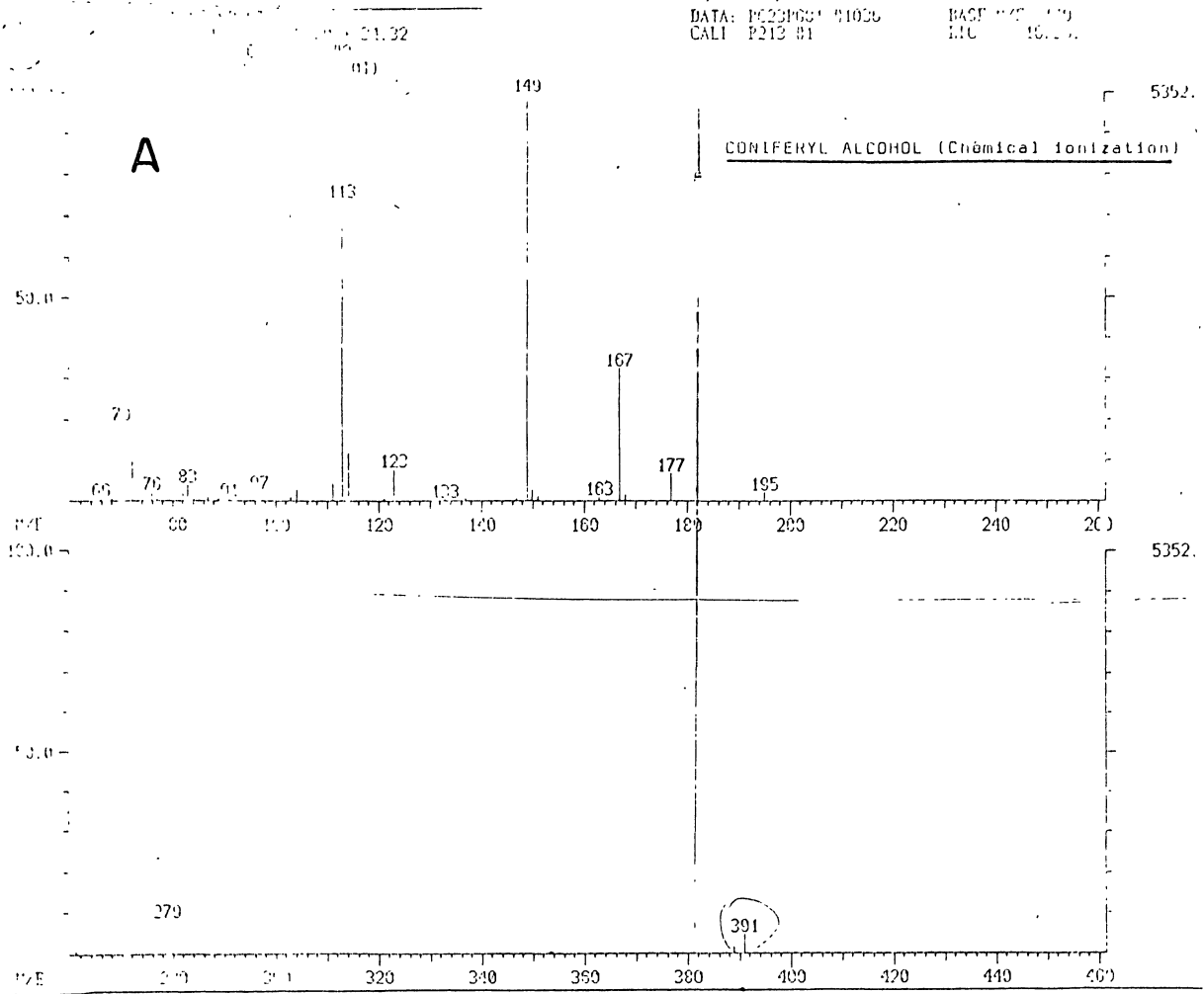


Fig. 28 Espectros de massa (impacto eletrônico) de:

A: Álcool coniferílico metilado.

B: Lignina TFA metilada.



BASE SPECTRUM
01/22/01 11:48:09 + 31:18
SAMPLE: LIGNINA TFA #2
PREPARED (S 15B 2H 01)

DATA: PC27PG81 31029
CALI: P226 #1

BASE M/E: 149
RIC: 262141

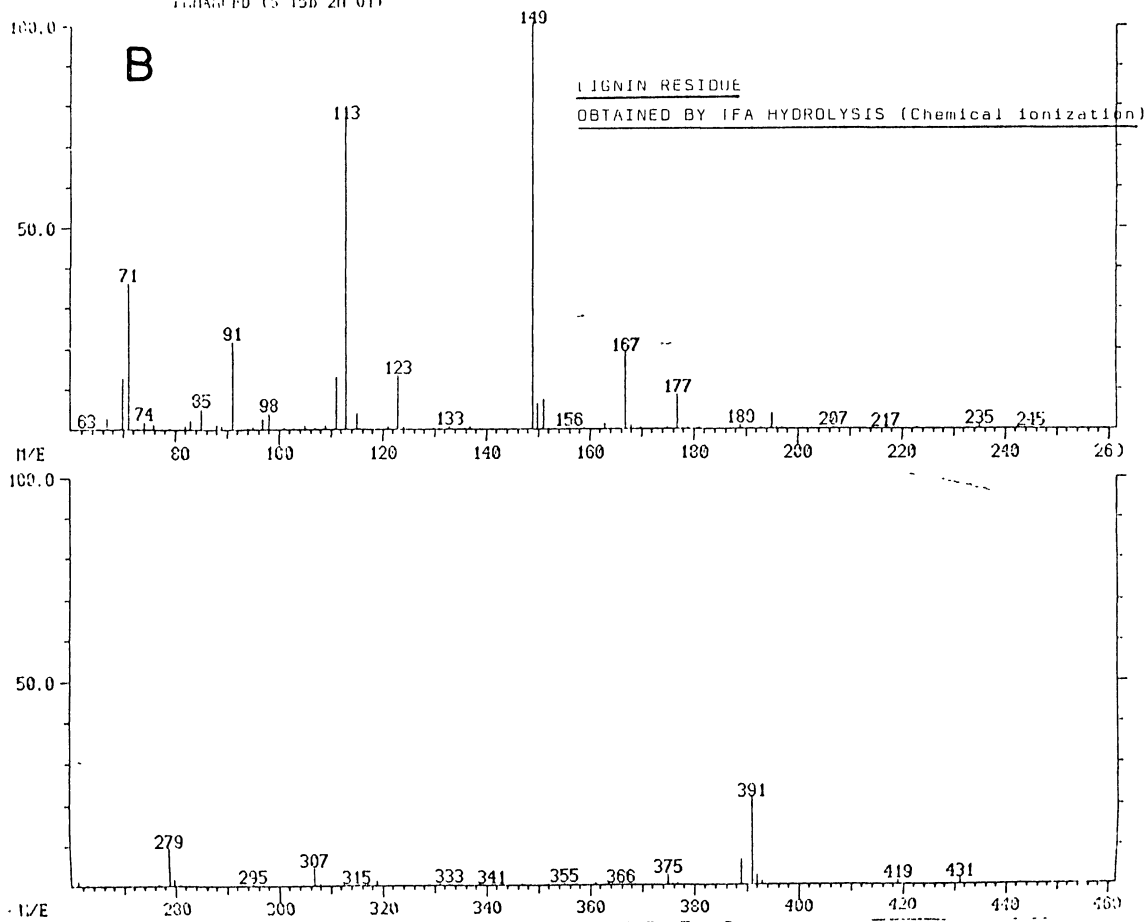


Fig. 29- Espectros de massa (ionização química) de:

A: Álcool coniferílico metilado.

B: Lignina TFA metilada.

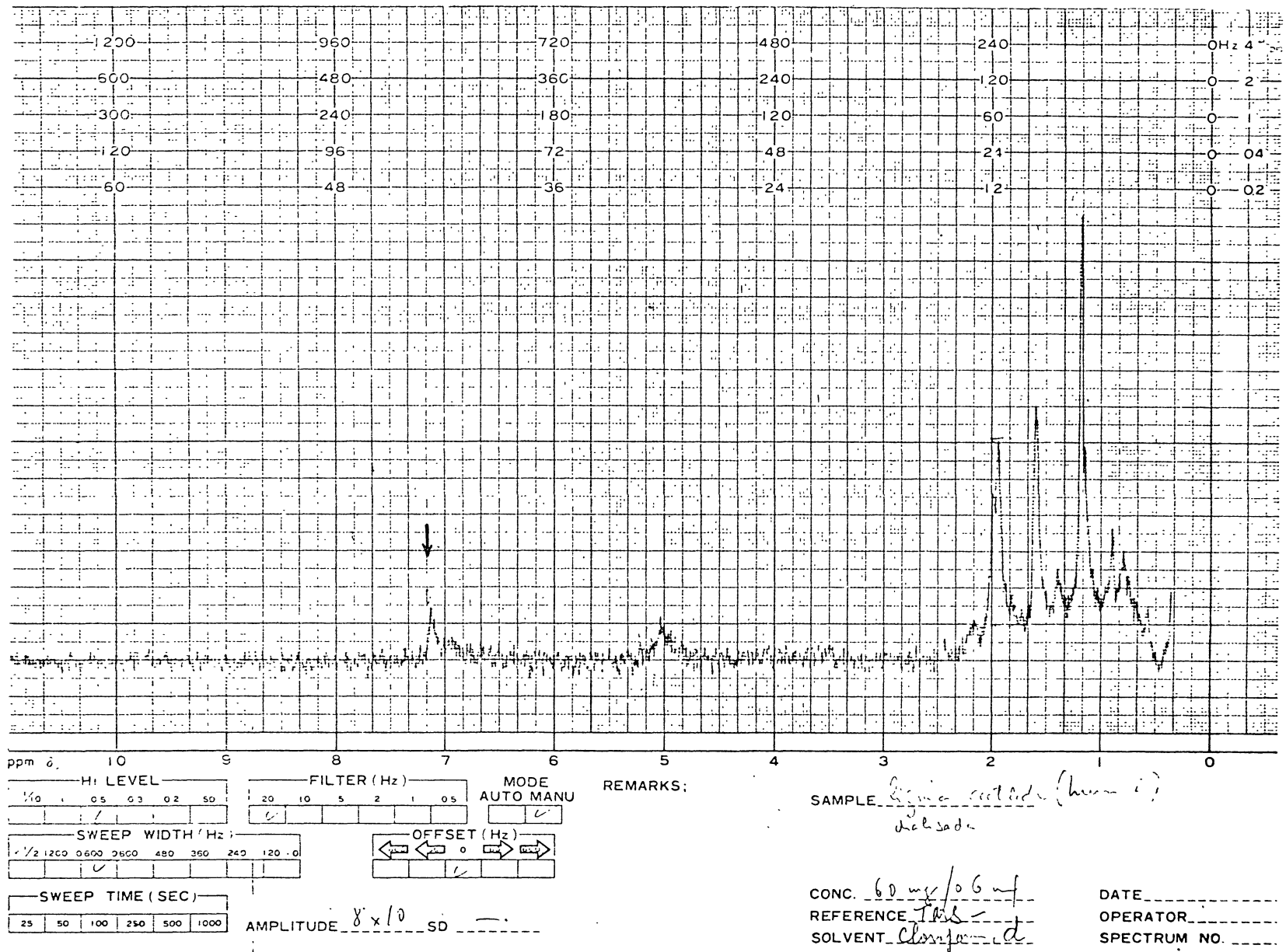


Fig. 30- Espectro de 1H -n.m.r. de Lignina TFA acetilada, em $CDCl_3$.

A seta indica o sinal de proton aromático.

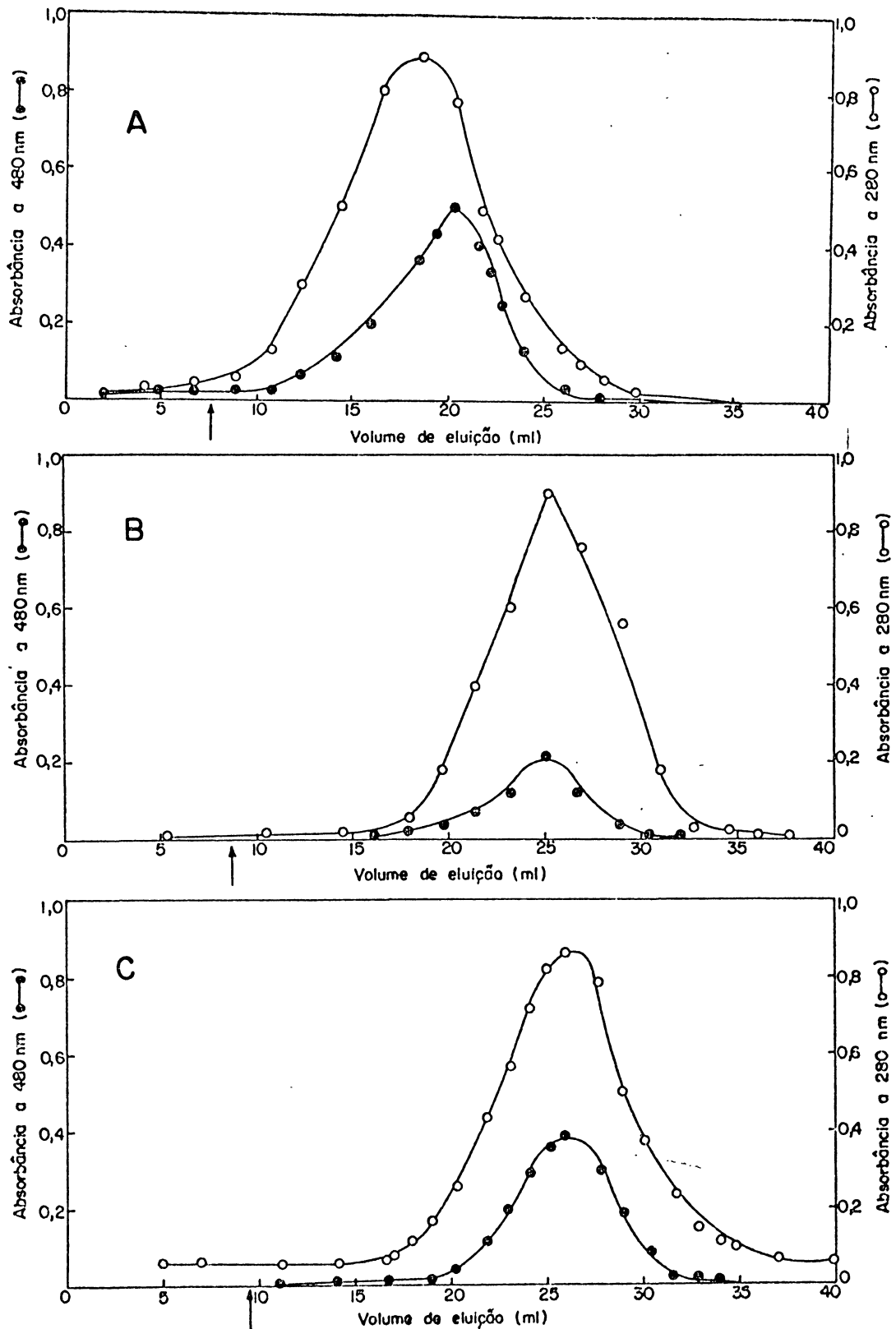


Fig. 31- Filtração em gel de LXC_2 (colunas 38 x 0,8 cm, eluente tampão fosfato 25mM, pH 7,2).

A: em Bio Gel P30 ;

B: em Bio Gel P100;

C: em Bio Gel P300.

A seta representa o volume morto determinado com blue dextran. Cada fração foi analisada para carboidrato (●-●) e lignina (○-○).

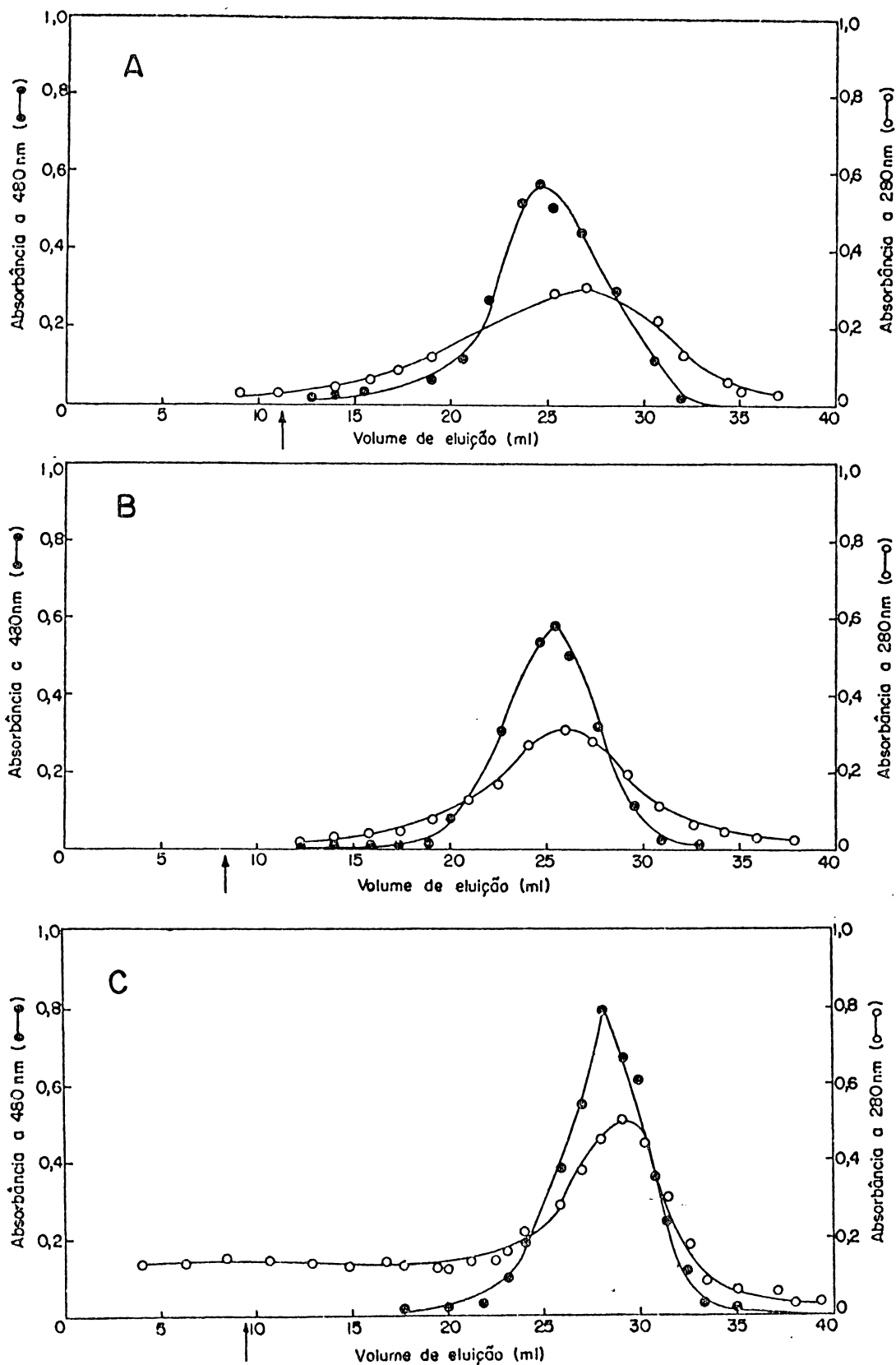


Fig. 32- Filtração em gel de LXC₃. (colunas 38 x 0,8 cm, eluente tampão fosfato 25mM, pH 7,2).

A: em Sephadex G50;

B: em Bio Gel P100;

C: em Bio Gel P300.

A seta representa o volume morto determinado com blue dextran. Cada fração foi analisada para carboidrato (●-●) e lignina (○-○).

carboidrato-lignina nos complexos (LXC₂ e LXC₃) foi invertida, havendo mais carboidrato em LXC₃, que foi oxidado com meta periodato de sódio somente uma vez. A figura 32 mostra os perfis de eluição de LXC₃ através de Sephadex G50 (figura 32.A), Bio Gel P100 (fig.32.B) e Bio Gel P300 (fig. 32.C). Na fig. 32.A observa-se um achatamento nos picos, provavelmente causado pela interação do Sephadex com LXC₃. Apesar disto, as três figuras (32.A, B e C) indicam que realmente a lignina está ligada ao carboidrato.

As hemiceluloses da bracatinga foram depolimerizadas pela ação de fungos por Fontana e colaboradores (56, 57).

Devido a disponibilidade de celulase comercial (Bioferm), a qual demonstrou grande atividade hemicelulásica, esta foi utilizada para a degradação da hemicelulase A.

A enzima, obtida por fermentação de Trichoderma reesei (QM 9414), é um complexo que contém como componentes principais exoglicanase, endoglicanase e β -glicosidase. É muito estável, e na forma sólida mantém sua atividade por anos quando estocada nas condições recomendadas, como baixas temperaturas local seco e recipiente fechado. Em solução apresentou-se estável por um período de 7 meses, a temperatura de 4 e 25° a um pH de 4,5 - 5,0 (121).

A hemicelulose A (900 mg por dosagem) foi suspensa em tampão acetato (50 mM, pH 5,0) e tratada com uma solução de celulase Bioferm a 36°. Paralelamente ao experimento foi feito um branco sem o substrato. A hidrólise foi acompanhada pelo aparecimento de poder redutor, determinado pelo método de Somogy Nelson (138).

Após 26 horas o poder redutor tornou-se constante, sendo a incubação da amostra e do controle precipitadas com etanol gelado (4°). Após centrifugação, foi lida a absorbância a 280 nm nos sobrenadantes etanólicos, sendo positiva no caso da amostra. Este sobrenadante foi denominado HAE_{s1}, e o fato de apresentar absorbância a 280 nm sugere a presença de lignina na fração. Conforme observado no controle, a enzima foi precipitada pelo etanol, o que ficou comprovado pela análise de U.V. do sobrenadante (negativo). Determinou-se o açúcar total em HAE_{s1} pelo método do fenol sulfúrico (51), cujo resultado foi 332mg. Assim, 37% da hemicelulose foi hidrolisada neste tratamento. Após a remoção do etanol de HAE_{s1} por evaporação a vácuo, observou-se que

parte do material precipitou, o qual foi removido por centrifugação. A porção solúvel em água foi aplicada em coluna de DEAE celulose (forma Cl^-) e eluída sequencialmente com H_2O , NaCl 0,25N e NaOH 0,5N. As frações eluídas com NaCl e NaOH foram filtradas por colunas de Bio Gel P100 e eluídas com tampão fosfato 25mM, pH7,2. Os perfis de eluição encontram-se, respectivamente, nas figuras 33.I e II.

A fig. 33.I (HAE_{s1} eluída com NaCl da coluna de DEAE celulose) mostra um componente principal de pequeno peso molecular (frações 25 a 35), composto predominantemente por carboidrato, provavelmente oligossacarídeos, que foram eluídos concomitantemente à lignina, sugerindo ligação entre ambos.

A fig. 33 II (HAE_{s1} eluído com NaOH da coluna de DEAE celulose), indica um único pico, no qual o principal componente é a lignina, também ligada a carboidrato.

A fração da hemicelulose não hidrolisada pelo primeiro tratamento com a enzima (HAE_{p1}) foi ressuspensa em 45 ml de H_2O e 4,5 ml de solução de tampão acetato 0,5M e reincubado, sem a adição de mais enzima. Após 23 horas não houve formação de poder redutor. Entretanto, quando a uma aliquota deste sistema (1 ml) adicionou-se o substrato original (200 μg de hemicelulose A), este foi hidrolisado. Por outro lado, quando se adicionou nova porção de enzima (0,2ml) ao sistema total (isto é HAE_{p1}), houve formação de poder redutor que se estabilizou após 20 horas. A fração não hidrolisada foi precipitada com etanol e centrifugada (HAE_{p2}), perfazendo 328 g, isto é, 36% da hemicelulose inicial.

O precipitado (HAE_{p2}) foi submetido à nova hidrólise nas mesmas condições e a fração não hidrolisada foi precipitada com etanol, como das duas vezes anteriores. O resíduo HAE_{p3} (284 mg, portanto 31% da hemicelulose inicial) foi suspenso em água, uma aliquota (2ml) foi dissolvida em NaOH , centrifugada e determinado o espectro de absorção do sobrenadante limpo, na região de U.V., o qual foi semelhante aos apresentados nas figuras 6 e 21, indicando a presença de lignina neste resíduo.

A fração HAE_{p3} foi tratada com boroidreto de sódio a quente, dializada e novamente centrifugada. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi desproteínizado 3 vezes pelo método de

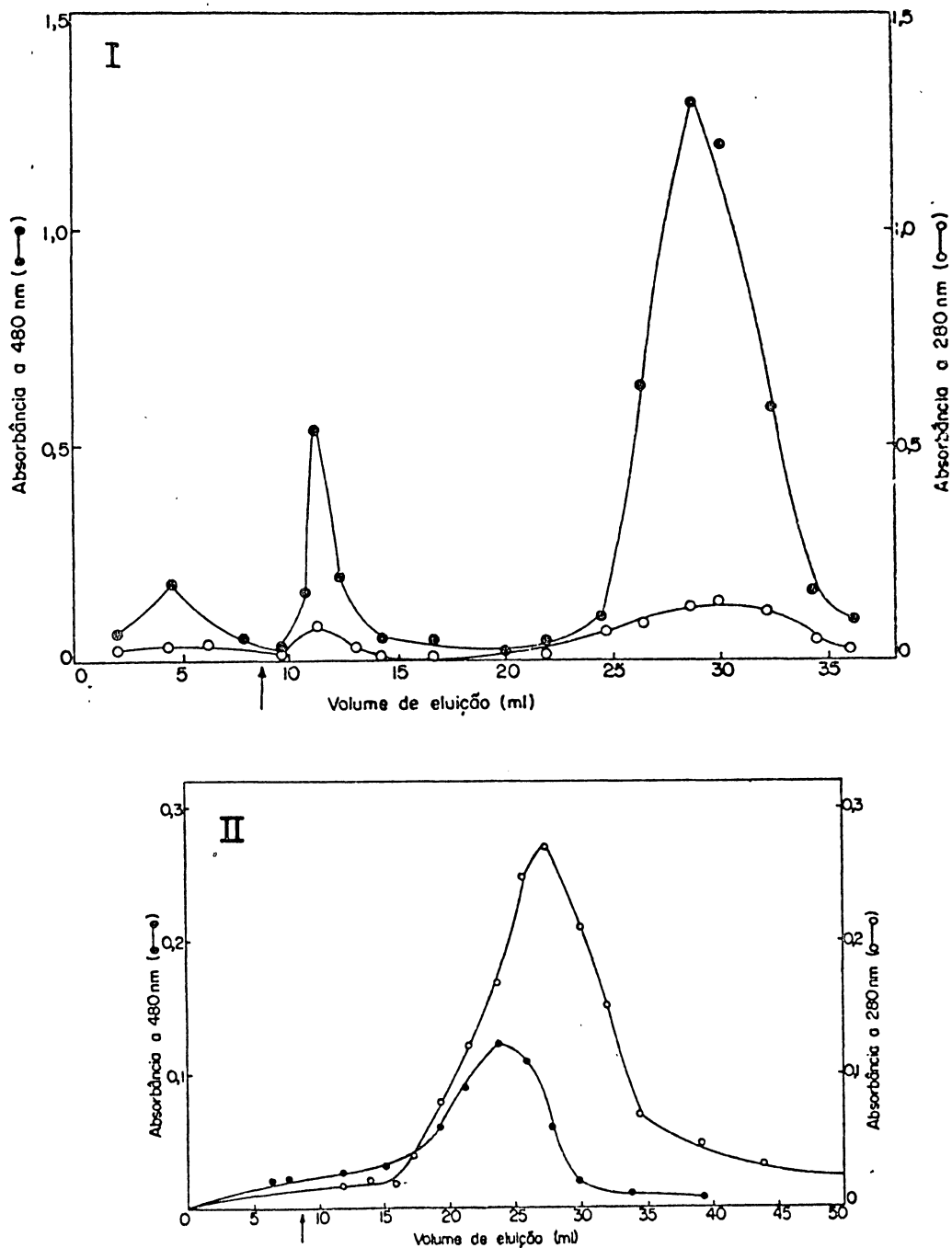


Fig. 33- Filtração em Bio Gel P100 (côluna 38 x 0,8 cm; eluente tampão fosfato 25 mM, pH7,2) de fragmentos da hemicelulose A após o tratamento com celulase. A seta indica o volume morto determinado com Blue Dextran. Cada tubo foi analisado para carboidrato (-●-) e lignina (-○-) I e II - Sobrenadantes etanólicos da 1.^a degradação enzimática da hemicelulose A (HAE_{S1}) previamente purificado em coluna de DEAE celulose (forma Cl⁻) e eluido com NaCl 0,25N (I) e NaOH 0,3N (II).

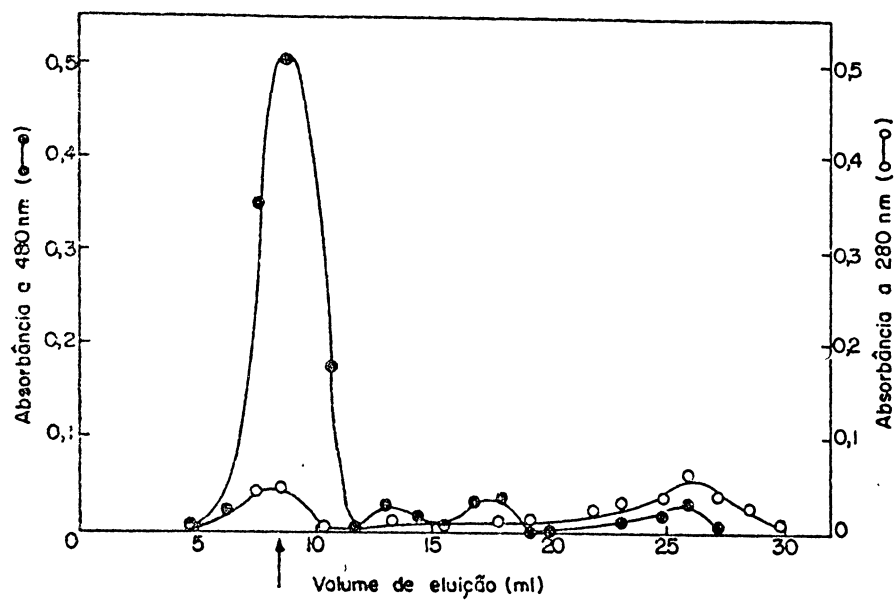


Fig. 34- Filtração em Bio Gel P100 (coluna 38 x 0,8 cm; eluente tampão fosfato 25 mM; pH 7,2), do resíduo da 3^a degradação enzimática da hemicelulose A ($\text{HAE}_{\text{p}3}$) tratado com NaBH_4 e desproteinizado.

Cada tubo foi analisado para carboidrato (-●-) e lignina (-○-).

Sevag (175) com a finalidade de se eliminar a celulase. Após a desproteinização o material foi aplicado a uma coluna de Bio Gel P 100 (fig. 34) e eluído com tampão fosfato 25 mM, pH 7,2. A figura indica um componente principal que contém carboidrato (em maior proporção) ligado a lignina.

Estes experimentos iniciais de hidrólises enzimáticas sugerem que os pontos de ligação da lignina com o carboidrato ocorrem ao longo da cadeia da xilana, pois em todos os fragmentos isolados podemos observar a presença dos dois componentes associados. As ligações existem, tanto nos pequenos fragmentos hidrolisados pela enzima (EAE_{S1}, fig. 33) como no resíduo final (EAE p₃). Este fato parece eliminar a possibilidade de ligação do tipo benzil glicosídica e acetálica (**b** e **c**, respectivamente, no esquema da pag. 79).

Este resultado é coerente com as análises dos complexos lignina-carboidrato (LXC) obtidos pela degradação tipo Smith da hemicelulose A, pois se a ligação entre a xilana e a lignina envolvesse o carbono anomérico não sobraria xilose resistente ao periodato.

A ligação fenol glicosídica (**b** no esquema da pag. 79), por ser sensível a alcali (127) está naturalmente descartada no material em questão, embora possa existir na xilana nativa.

Assim sendo, parece ser mais provável a ocorrência da ligação tipo benzil eter (**d** no esquema apresentado na pag. 79) entre a xilana e a lignina. Este tipo de ligação daria origem a xilose resistente ao periodato. Poderíamos admitir a existência de lignina ligada ao carbono 2 ou 3 das unidades de D-xilopiranoses ao longo da xilana. Esta hipótese é suportada pela análise dos produtos da metilação de LXC₂ (fig. 26) e de LXC₁, cujo cromatograma é semelhante ao apresentado na fig. 26. Foram identificados os seguintes compostos (fig. 26): tri-O-metil-xilose (pico 1), proveniente das pontas não redutoras; 2,3-di-O-metil xilose (pico 2); mono metil xilose (pico 3) e o derivado de lignina (pico 4).

O aparecimento do 2,3-di-O-metil-xilose em LXC indica que unidades de D-xilopiranoses interligadas glicosidicamente por ligações β (1 \rightarrow 4) encontram-se não substituídas. Teoricamente estas unidades deveriam ser oxidadas pelo periodato. Entretanto, a presença de lignina, que foi concentrada no complexo após a segunda degradação de Smith, quando a maior parte do carboidrato foi degradada, por

ser um grupo volumoso, deve ter impedido, por efeito estérico, a oxidação das unidades de D-xilopiranoses próximas a ela. Outro fator já conhecido, que poderia impedir a oxidação completa seria a formação de hemiacetais intra e inter-cadeias.

O pico 3, identificado como mono-metil-xilose, poderia ser o 2-O-, o 3-O- ou ainda uma mistura de ambos, e é proveniente justamente daquelas unidades de xilose substituídas na posição 2-O- ou 3-O- pela lignina.

A diminuição do tempo de retenção do derivado da lignina de 10,4 (fig. 1) para 9,85 indica que este também foi metilado pelo processo de Hakomori (fig. 26).

Assim, sugerimos que a ligação covalente, resistente a alcali, que une a lignina à xilana, seja do tipo benzil eter, envolvendo o carbono 2 ou 3 das unidades de xilose e o carbono 3 da cadeia lateral do monômero de lignina tipo fenil propano (154).

Novos estudos deverão ser feitos a fim de se esclarecer aspectos ainda não definidos, como a estrutura das unidades de fenil propano envolvidas nas ligações com a xilana. Também será importante o estudo da estabilidade das ligações utilizando-se modelos sintéticos.

4 - CONCLUSÕES

1- A O-acetil-xilana estudada (fração II) foi obtida no seu estado nativo, visto que as condições usadas na sua obtenção não causaram migração de grupos O-acetílicos quando testadas em modelos sintetizados.

2- Na O-acetil-xilana nativa, os grupos O-acetílicos estão distribuídos em proporções aproximadamente iguais entre O-2 e O-3 das unidades de D-xilopiranoses (14 e 16% respectivamente) havendo 5% de unidades di-O-acetiladas e 65% não substituídas por grupos O-acetílicos, conforme determinado pelo método de Bouveng modificado (47).

3- Nas xilanas acetiladas sinteticamente ocorreu substituição preferencial em O-2, por ser este mais reativo que O-3, frente ao agente acetilante empregado (anidrido acético-piridina).

4- Os isômeros 2-O- e 3-O-metil-xilitol apresentam resolução satisfatória por análise em g.l.c., em coluna capilar contendo DB 210 como fase estacionária.

5- A O-acetil-xilana nativa é solúvel em água, ao contrário da sintética, mesmo contendo ambas aproximadamente a mesma quantidade de grupos O-acetílicos. Portanto, a solubilidade em água pode estar relacionada com a distribuição destes grupos na cadeia da xilana.

6- No espectro de ^{13}C -n.m.r. das O-acetil-xilanas, os sinais de CH_3 (campo alto) e de $\text{C}=\text{O}$ (campo baixo) do acetil são bem característicos, permitindo evidenciar o posicionamento dos grupos O-acetílicos.

7- Para a quantificação absoluta dos grupos O-acetílicos o processo de metilação mostrou-se mais eficiente que a espectroscopia de ^{13}C -n.m.r.

8- Os espectros de ^{13}C -n.m.r. dos modelos sintetizados para o estudo de migração, metil 2-O-acetil-4-O-metil- e metil 3-O-acetil-4-O-metil- β -D-xilopiranosídeos, apresentaram sinais de CH_3 e $\text{C}=\text{O}$ equivalentes aos deslocamentos químicos encontrados nas O-acetil-xilanas analisadas.

9- As O-acetil-xilanas mostraram resistência à migração de acetil, conforme análise por ^{13}C -n.m.r., nas seguintes condições : refluxo por 18 horas em etanol; solução aquosa contendo cloro, a 4° ; aquecimento a 70° em soluções de DMSO - d_6 ou D_2O por 64 horas.

10- Nos modelos monossacarídicos o tratamento com Cl_2 a $\sim 4^\circ$ não causa migração. Entretanto, o aquecimento em D_2O ou DMSO- d_6 causa migração, sendo este mais rápido em D_2O , conforme quantificação por ^{13}C -n.m.r.

11- No estado de equilíbrio entre os dois modelos monossacarídicos sempre predomina o 3-O-derivado.

12- A distribuição dos grupos O-acetílicos na O-acetil-xilana nativa mantém similaridade com os modelos monossacarídicos 2-O- e 3-O-acetatos, no seu estado de equilíbrio.

13- A distribuição dos grupos O-acetílicos na xilana nativa provavelmente influe na sua conformação. O equilíbrio desta distribuição sugere a existência de um eixo de simetria na molécula.

14- Ficou comprovada a presença de lignina nas frações hemicelulósicas (O-acetil-xilana, hemiceluloses A e B), pelas análises de UV, IV, g.l.c., g.c-m.s. e ^1H -n.m.r.;

15- Na O-acetil-xilana foram identificados os seguintes tipos de ligações entre a xilana e a lignina: interações secundárias, ligação ester e ligação benzil eter.

16- As interações secundárias são, provavelmente, do tipo pontes de hidrogênio.

17- As ligações ester envolvem grupamentos carboxílicos das unidades de ácido 4-O-metil-glucurônico que compoem as hemiceluloses e grupamentos hidroxílicos da lignina. Cerca de 15% do ácido urônico total está comprometido com este tipo de ligação.

18- As hemiceluloses A e B não possuem lignina associada por interações secundárias nem por ligações ester, por terem sido extraídas com alcali.

19- O complexo lignina-carboidrato (LXC) obtido por degradação oxidativa (tipo Smith) é resistente ao tratamento alcalino.

20. Filtrações em gel não dissociaram o complexo LXC.

21- A hidrólise enzimática de hemicelulose A sugere que a ligação eter entre a xilana e a lignina não seja do tipo glicosídica, o que está de acordo com os resultados de metilação de LXC.

22- Os resultados indicam que a ligação covalente resistente a alcali que une a lignina à xilana seja do tipo benzil eter, envolvendo o carbono 2 ou 3 de unidades de xilose e o carbono 3 da cadeia lateral do monômero de lignina.

23- Os estudos de localização de grupamentos O-acetílicos somados aos das ligações com a lignina, permitem visualizar a xilana nativa como um glicoconjugado complexo intimamente associado com os demais componentes da parede celular.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALTIO, E. & ROSCHIER, R.H. The Chemical combination of lignin in aspen wood. Paper and Timber, 4: 157-17, 1954.
2. ADAMS, G.A. Xylans arabinoglycuronoxylan, arabinoxylan, and xylan: purification using a copper complex and purification by fractional precipitation of acetates. Methods Carbohydr. Chem. V : 170-175, 1965.
3. _____. Lignin determination, Methods Carbohydr. Chem., V: 185 - 187, 1965.
4. ALBERSHEIM, P. The substructure and Function of the Cell wall. In: Bonner, J. & Varner J.E. (Ed). Plant Biochemistry, 2nd Ed. N.Y., Acad. Press. 1965. p. 151-185.
5. _____. The Primary Cell Wall. In: Bonner, J. & Varner, J.E.(Ed.) Plant Biochemistry, 3 nd Ed. N.Y., Acad. Press, 1976.p. 226-271.
6. ANGYAL, S.J. & MELROSE G.J.H. Cyclitols. Part XVIII. Acetyl Migration: Equilibrium between axial and equatorial acetates. J. Chem. Soc., 6494 - 6500, 1965.
7. _____. Cyclitols. Part. XIX. Control of acetyl migration during methylation of partially acetylated cyclitols. J. Chem.Soc., 6501 - 6504, 1965.
8. ASPINALL, G.O. Structural Chemistry of the Hemicelluloses . Adv. Carbohydr. Chem. 14: 429-468, 1959.
9. _____. Pectins, Plant Gums and other Plant Polysaccharides. In: Pigman, W. and Horton. D. (Ed.). The Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry - II. N.Y. Acad. Press, 1970. p. 515-536.

10. ATKINS, E.D.T.; PARKER, K.D. & PRESTON, R.D. The helical structure of the β -1,3 linked xylan in some siphonous green algae. Proc. R. Soc. Ser. B, 173: 209-221, 1969.
11. AZUMA, J.-I.; TAKAHASHI, N. & Koshijima, T. Isolation and characterisation of lignin-carbohydrate complex from the milled-wood lignin fraction of Pinus densiflora Sieb et Zucc. Carbohydr. Res., 93: 91-104, 1981.
12. BACON, J.S.D.; GORDON, A.H. & MORRIS, E.J. Acetyl groups in Cell-Wall Preparations from Higher Plants. Biochem. J., 149: 485-487, 1975.
13. BAILEY, R.W. Structural carbohydrates. In: Chemistry and Biochemistry of Herbage. Butler, G.W. and Bailey R.W. (Eds.) Academic Press, N.Y. 1973 - Vol. I 157-211.
14. BAKER, B.R. & SCHAUB, E. Puromycin. Synthetic studies. III. Synthesis of 3 - amino -D-ribose, an hydrolytic fragment. J. Org. Chem., 19: 646-660, 1954.
15. BAR-LEV, S. Biodegradation of insoluble plant cell wall material by fungi. Ph.D.Thesis, The Weizmann Institute of Science, 126 pp, 1979.
16. BARRICHELLO, L.E.G. Celulose sulfato de bracinga. In: Congresso florestal brasileiro, 19 Curitiba 1968. V. 3,49 comissão, trabalho 5.
17. BAUER, W.D.; TALMAGE, K.W.; KEEGSTRA, K. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II:- The Hemmicellulose of the walls of suspension - cultured sycamore cells. Plant Physiol., 51: 174-187, 1973.
18. de BELDER, A.N. & NORMAN, B. The distribution of substituents in partially acetylated Dextran. Carbohydr. Res., 8: 1-6, 1968.
19. BeMILLER, J. N. Carbanilates. Preparation and removal. Methods Carbohydr. Chem., V: 400-401, 1960.

20. BENKO J. The measurement of molecular weight of lignosulfonic acids and related materials by diffusion. IV. Holzforschung, 30: 187-191, 1976.
21. BHATTACHARJEE, H.P. & CALLOW, H.J. Action of dilute caustic soda solution on jute fiber. I. Hydrolysis of ester linkages. J. Text. Inst., 43: 53-59, 1952.
22. BHATTACHARJEE, A.K.; KWON-CHUNG, K.J. & GALUDEMANS, P.J. The structure of the capsular polysaccharide from Cryptococcus neoformans Serotype D. Carbohydr. Res., 73: 183-192, 1979.
23. BISHOP, C.T. Carbohydrates of sunflower heads. Can. J. Chem., 33: 1521-1529, 1955.
24. _____. Crystalline xylans from straws. Can. J. Chem., 31: 793-800, 1953.
25. BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem., 4: 330-334, 1962.
26. BJORKMAN, A. Finely divided wood. I. Extraction of lignin with neutral solvents. Svensk Papperstidn. 59: 477-485, 1956.
27. BOLKER, H.I. & WANG, P.I. Acid and alkali bounds in lignin - carbohydrate complex. Tappi, 52: 920-923, 1969.
28. BOUVENG, H.O.; GAREGG, P.J. & LINDBERG, B. Position of the O-Acetyl groups in Birch Xylan. Acta. Chem. Scand., 14: 742-748, 1960.
29. BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate derivatives of Carbohydrates. Acta. Chem. Scand., 15: 87-95, 1961.
30. _____. Phenylisocyanate derivatives of Carbohydrates II. Location of the O-Acetyl groups in Birch Xylan. Acta Chem. Scand., 15: 96-100, 1961.
31. BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. Native acetylated wood polysaccharides. Methods carbohydr. Chem., V. 147-149, 1965.

32. BRICE, R.E. & MORRISON, J.M. The degradation of isolated hemicelluloses and lignin-hemicellulose complexes by cell-free, rumen hemicellulases. Carbohydr. Res., 101: 93-100, 1982.
33. BRODA, P. & PATERSON, A. Lignin biodegradation becomes biochemistry. Nature, 306: 737-738, 1983.
34. BROWN, F.; HOUGH, L. & JONES, J.K.N. The synthesis of 2 : 3 - dimethyl L-Rhamnose; The action of sodium metaperiodate on 2 : 3 and 3 : 4 - dimethyl L-Rhamnoses. J. Chem. Soc., 1125 - 1127, 1950.
35. BROWNELL, H.H. Isolation of milled wood lignin and lignin carbohydrate complex. Part II of a study on the lignin - carbohydrate bond. Tappi, 48: 513-519, 1965.
36. BROWNING, B.L. Isolation and separation of the hemicelluloses. Methods of wood Chemistry, vol. II. In Wiley, J. (Ed.) Interscience Publishers, N.Y. 1967. p. 561-587.
37. _____. Cellulose. Methods of Wood Chemistry II. In Willey (Ed.) Interscience Publishers, N.Y. 1967. p. 387-557.
38. BUHRER, N.E. Estudos para a obtenção de carvão ativo vegetal. Arq. Biol. Tecnol., 7: 103-121, 1952.
39. BUNDLE, D.R.; JENNINGS, H.J. & SMITH, I.C.P. The carbon - 13 nuclear magnetic resonance spectra of 2 - acetamido - 2 - deoxy - D - hexoses and some specifically deuteriated, O-acetylated and phosphorylated derivatives. Can. J. Chem., 51: 3812-3819, 1973.
40. BURKE, D.; KAUFMAN, P.; MacNEIL, M. & ALBERSHEIM, P. The structure of Plant Cell Walls. VI. A Survey of the Walls of Suspension - cultured Monocots. Plant Physiol., 54: 109-115, 1974.

41. CREIGHTON, R.H.J.; GIBBS, R.D. & HIBBERT, H. Studies on lignin and related compounds. LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant materials and application to taxonomic classification. J. Am. Chem. Soc., 66: 32-37, 1944.
42. CHAMBAT, G.; BARNOUD, F. & JOSELAU, J.-P. Structure of the primary Cell Walls of Suspension - Cultured Rosa glauca Cells. Plant Physiol., 74: 687-693, 1984.
43. CHANDA, S.K.; HIRST, E.L.; JONES, J.N.K. & PERCIVAL, E. G. U. The constitution of Xylam from Esparto grass (Stipa tenacissima, L.). J. Chem. Soc., 1289-1297, 1950.
44. CHANG, H.M. & ALLAN, G.O. Oxidation. In: Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions. Sarkanen, K.U. and Ludwig, C.H. (Eds.) Wiley-Interscience, New York, 1973, p. 433-485.
45. CHITTENDEN, G.J.-F. & BUCHMAN, J.G. The Conversion of benzyl-3-O-benzoyl-4,6-O-benzilidene- β -D-Galactopiranoside into the 2-benzoate by acyl migration. Carbohydr. Res., 11: 379-385, 1969.
46. CORRÊA, J.B.C.; GOMES, S.L. & GEBARA, M. Structural features of the hemicellulose A from the stem of Mimosa bracinga. Carbohydr. Res., 60: 337-343, 1978.
47. CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; ODEBRECHT, S. & OLIVEIRA, M.L. The distribution of O-acetyl-groups in partially acetylated xylan. An. Acad. brasil. Ciênc., 51(3): 429-433, 1979.
48. DAS, N.N.; DAS, S.C.; DUTT, A.S. & ROY, A. Lignin-xilan ester linkage in jute fiber (Corchorus capsularis). Carbohydr. Res., 94: 73-82, 1981.
49. DENCE, C.W. Halogenation and nitration. In: Lignins - Occurrence, formation, structure and reactions. Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. (Ed.) Wiley - Interscience, New York, 1971, p. 373-432.

50. DOROSO, N.; ODEBRECHET, S. & CORRÊA, J.B.C. Some aspects of the chemical structure of the hemicellulose B from the stem of Mimosa bracinga. Arq. Biol. Tecnol., 23: 257-263, 1980.
51. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356, 1956.
52. EFFLAND, M.J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. Tappi, 60(10): 143-144, 1977.
53. ERIKSSON, O. & LINDGREN, B.O. About the linkage between lignin and hemicelluloses in wood. Svensk Papperstidn., 80: 59-63, 1977.
54. FENGEL, D. & PRZYKLENK, M. Studies on the supermolecular structure of cell wall components. Svensk Papperstidn., 78: 617-620, 1975.
55. FINAN, P.A. & Warren, C.D. Glycosides. Part II. The preparation of methyl 3,4,6 tri-O-acetyl-2-O-methyl-D-glucopiranoside. J. Chem. Soc., 4214-4216, 1962.
56. FONTANA, J.D.; Corrêa, J.B.C. & Gebara, M. Xilanase de Polyporus circinatus induzida pela hemicelulose do caule de Mimosa bracinga. Ciênc. Cult. (São Paulo), Suplem. 28ª Reunião Anual da SBPC: 492, 1976.
57. FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C.; GALLOTTI, B.J.; BLUMEL, M. & BARBOSA, A.M. Depolimerização e fermentação de hemiceluloses de bracinga e bagaço de cana. Arq. Biol. Tecnol., 26(2): 325, 1983.
58. FORSS, K.; FREMER, K. & STENLUND, S. Spruce lignin and its reaction in sulfite cooking I. The structure of lignins, II. The reactions in sulfite cooking. Paperi ja Puu, 48: 565 - 574 and 665-676, 1966.
59. FOWLE, L.G., JURITZ, J.F.W.; KLUG, A. & STEPHEN, A. M. Crystallinity of the gummy polysaccharide from Watsonia pyramidata corm-sacs. S.A. Med. J., 44: 152, 1970.
60. FREEMAN, R. & HILL, H.D.W. Fourier transform study of NMR spin-lattice relaxation by "Progressive Saturation". J. Chem. Phys., 54: 3367-3377, 1977.

61. FREI, E. & PRESTON, R.D. Non cellulosic structural polysaccharides in algae cell walls. I. Xylan in siphonous green algae. Proc. R. Soc. Ser. B., 160: 293-327, 1964.
62. _____. Non cellulosic structural polysaccharides in algae cell walls. III. Manan in siphonous green algae. Proc. R. Soc. Ser. B, 169: 127-145, 1968.
63. FREUDENBERG, K. Lignin: Its constitution and formation from p-hydroxycinnamil alcohols. Science 148: 595-600, 1955.
64. _____. A schematic constitutional formulation for spruce lignin. Holzforschung, 18: 3-9, 1964.
65. FREUDENBERG, K. & HARKIN, J.M. Modelle für die binding des lignins and die Kohlenhydrate. Chem. Ber., 93: 2814-2819, 1960.
66. _____. Supplement to the constitutional scheme for spruce lignin. Holzforschung, 18: 166 - 168, 1964.
67. GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. Nature, 191: 1295-1296, 1961.
68. _____. Separation of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. Phytochemistry, 4: 631-634, 1965.
69. GAILLARD, B.D.E. & 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.
70. _____. Reaction with iodine of polysaccharides dissolved in strong calcium chloride. Nature, 212: 202-203, 1966.
71. GAILLARD, B.D.E. & RICHARDS, G.N. Presence of soluble lignin-carbohydrate complexes in the bovine rumen. Carbohydr. Res., 42: 135-145, 1975.

72. GAREGG, P.J. Partial acetylation studies on benzyl 4-O-metil- β -D-xylopyranoside. Acta Chem. Scand., 16: 1849-1857, 1962.
73. GEBARA, M. Degradação enzimática da hemicelulose A de Mimosa bracinga. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 1977.
74. GLASSER, W.G.; BARNETT, C.A.; MULLER, P. & SARKANEN, K.V. The chemistry of several novel bioconversion of lignins. J. Agric. Food Chem., 31: 910-930, 1983.
75. GLASSER, W.G.; BARNETT, C.A. & SANO, Y. Classification of lignins with different genetic and industrial origins. Applied Polymer Symposia, 37. Proceedings of the Ninth Cellulose conference. I. 441-460, 1983.
76. GOLDSCHMID, O. Ultraviolet spectra. In: Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. (Ed.) Wiley-Interscience, New York, 241-263, 1971.
77. GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, A. & SMITH, F. Methods Carbohydr. Chem., V: 361-367, 1965.
78. GODWIN, T.W. & MERCER, E.I. The plant cell wall. In: Introduction to Plant Biochemistry, 2nd Ed. Pergamon Press, 1983, p. 54-91.
79. GORIN, P.A.J. Assignment of signals of the carbon-13 magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide: Comments on methodology. Carbohydr. Res., 39: 3-10, 1975.
80. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem., 38: 68-72, 1981.
81. GORING, D.A. I. Polymer properties of lignin and lignin derivatives. In: Lignins- Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. (Ed.) Wiley - Interscience, New York, 1971, p. 749.
82. GOULD, M.J. Characterization of lignin in situ by photoacoustic spectroscopy. Plant Physiol., 70: 1521-1525, 1982.
83. GREEN, J.W. Wood Cellulose. Methods Carbohydr. Chem., III: 9-21, 1963.

84. GROSS, S.K.; SARKANEN, K. & SCHUERCH, C. Determination of molecular weight of lignin degradation products by three methods. Anal. Chem. 30: 518-521, 1958.
85. HAGGLUND, E.; LINDBERG, B. & Mc Pherson, J. Dimethylsulphoxide, a Solvent for Hemicelluloses. Acta. Chem. Scand., 10: 1160, 1956.
86. HAINES, A.H. relative Reactivities of hidroxyl groups in carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 33: 11-109, 1976.
87. HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulphoxide. J. Biochem., 55: 205-207, 1964.
88. HARA, C.; KIHU, T. & UKAI, S. The location of the O-acetyl groups in the (1 → 3) α -D-Mannan from Dictyophora indusiata Fisch. Carbohydr. Res., 111: 143-150, 1982.
89. HARKIN, J.M. In: Oxidative coupling of phenols. Taylor, W.I. and Batterly, (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, 1967 , p. 274.
90. HARTLEY, R.D. & JONES, C. Carbohydrates and carbohydrate esters of ferrulic acid released from cell walls of Lolium multiflorum by treatment with cellulolytic enzymes. Phytochemistry, 15: 305-307, 1976.
91. _____. Phenolic components and degradability of cell walls of grass and legume species. Phytochemistry, 16: 1531-1534, 1977.
92. HAVLICEK, J. & SAMUELSON, O. Chromatography of oligosaccharides from xilan by various techniques. Carbohydr. Res. 22: 307-316, 1972.
93. HAYASHI, A. Study on the chemical combination between lignin and carbohydrate IX. On the action of bonded substance on chromatograms. J. Agri. Chem. Soc. Japan. 35: 80-83, 1961.

94. HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S.; HOLME, T. & LINDBERG, A.A. Structural studies on the O-specific side chains of the cell-wall lipopolysaccharide from Salmonella typhimurium Carbohydr. Res., 8: 43-55, 1968.
95. HERGERT, H.C. Infrared spectra. In: Lignins - Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. (Ed.) Wiley - Interscience, New York, 1971. p.267-281.
96. HESTRIN, S. The reaction of acetylcholin and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. J. Biol. Chem., 180: 249-261, 1949.
97. HOHNE, F. A bracaatinga ou abaracaatinga. S. Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo 43p., 1930.
98. HOEHNE, F. Mimosa bracaatinga. Bracaatinga. In: O Jardim Botânico de São Paulo. Kuhlman, M. e Handro. O. (Ed.). São Paulo. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio, p. 426-427, 1941.
99. HORTON, D. & LANTERBACK, H. Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrate derivatives. Specific nuclear magnetic resonance spectral assignments of acetyl groups in methyl α -D-glucopyranoside tetraacetate and related derivatives. J. Org. Chem., 34: 86-92, 1969.
100. HOUGH, L.A. & JONES, J.K.N. Synthesis of 3:4-dimethyl D-xylose and 4-methyl D-xylose. J. Chem. Soc., 4349-4351, 1952.
101. JANSSON, P.-E.; KENNE, L.; LIEDGREN, L. & LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analyses of carbohydrates. Chem. Commun., Univ. Stockholm, 8: 1-72, 1976.
102. JOHNSON, D.B.; MOORE, W.E. & ZANK, L.C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. Tappi, 44(11): 780-793, 1961.
103. JOSELAU, J.P. & BARNOUD. Proceedings in the 8th Cellulose Conference, Applied Polymer Symposia. Timell, T.E. (Ed.). Vol. 28, 983, 1976.

104. KABAT, E.A. & MAYER, M.M. Kjeldahl nitrogen determination. In: Experimental Immunochemistry. Thomas, C.C. (Ed.) . Bannerstone house, Springfield, Illinois, 476-483, 1964.
105. KEEGSTRA K.; TALMADGE, W.; BAUER, W.D. & ALBERSHEIN, P. A model of the walls of suspension cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. Plant. Physiol., 51: 188-196, 1973.
106. KIRK, T.K.; HIGUCHI, T. & CHANG, H. (Ed.) In: Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry, and potential applications. V. I e II, CRC Press, Inc. Florida, 1981.
107. KOMURA, H.; MATSUNO, A. & ISHIDO, Y. Carbon - 13 n.m.r. studies on D-glucopyranose acetates. Studies on D-glucopyranose tetraacetates and 2,3; 5,6-di-O-isopropylidene- α -D-mannofuranosyl-D-Glucopyranose tetraacetates. Carbohydr. Res., 65: 271-277, 1978.
108. KOSHIHJIMA, T.; YAKU, F. & TANAKA, R. Fractionation of Bjorkman LCC from Pinus densiflora. Appl. Polym. Symp., 28: 1025, 1976.
109. KOSIKOVA, B.; POLEIN, J. & DANDÁROVA-VASÁTKOVA, M. Eine neue methode zur isolierung des lignin-saccharide-komplexes; Untersuchung des bindungs characters des lignin-saccharid-komplexes, isolierst aus methyliertem. Holzforschung, 23: 37-47, 1969.
110. KRINGSTAD, K.P. & CHENG, C.W. Studies on lignin-hemicellulose complexes. Tappi, 52: 2382-2385, 1969.
111. KUC, J. & NELSON, O.E. The abnormal lignins produced by the Brown-Midrib mutants of maize. Arch. Biochem. Biophys., 105: 103-113, 1964.
112. LAI, Y.Z. & SARKANEN, K.V. Isolation and Structural Studies. In: Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reactions . Sarkanen, K.W. and Ludwig, C.H. (Ed.) Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 165-240.

113. LAMPORT, D.T.A. Cell Wall Metabolism. Annual Review Plant Physiol, 21: 235-270, 1970.
114. LARSSON, S. & MIKSCHE, G.E. Gaschromatographische analyse von ligninoxydations produktem. Acta. Chem. Scand., 25: 647- 662, 1971.
115. LINDBERG, B.; ROSSELE, K.-G. & SVENSSON, S. Positions of the O-acetyl groups in Birch Xylan. Svensk Papperstidning, 76: 30-32, 1973.
116. LINNELL, W.S.; THOMPSON, N.S. & SWENSON H.A. Structure of the black spruce glucomannan. II. Lignin-glucomannan relationships. Tappi, 49: 491-493, 1966.
117. MARCHESSAULT, R.H. Chimie et Biochimie de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses. Les imprimeries Reunies de chambéry, 287, 1965.
118. MARCHESSAULT, R.H. & SARKO, A. X Ray structure of polysaccharide. Adv. Carbohydr. Chem., 22: 421-482, 1967.
119. MARCHESSAULT, R.H. & SUNDARAJAN, P.S. Bibliography of crystal polysaccharides, 1967-1974, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 33: 397, 1976.
120. MANLEY, R.S.J. Fine Structure of Native Cellulose Microfibrils, Nature, 1155-57, 1964.
121. MARES-GUIA, M.L. & THIEMANN, J.E. Produção de celulose e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. Bioferm, Montes Claros 204-209, 1983. (manual de curso).
122. MARTON, J. Reactions in alkaline pulping. In: Lignins - Occurrence, formation, structure and reactions. Sarkanen, K. V. and Ludwig, C.H. (Ed.). Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 369-653.
123. McEWAN, T.; McINNES, A.G. & SMITH. ¹H- and ¹³C-N.M.R. Spectra of the methyl mono-di-, and tri-O-acetyl- α and - β -D-xylopiranosides. Carbohydr. Res., 104: 161-168, 1982.

124. MEIER, H. Studies on hemicelluloses from pine (Pinus silvestris L.). Acta Chem. Scand., 12: 1911-1918, 1958.
125. _____. Isolation and Characterisation of an acetylated glucomannan from Pine (Pinus silvestris L.). Acta Chem. Scand., 15: 1381-1385, 1961.
126. MELLO, Fº, L.E. Pilostyles stawiarskii Vatt, parasita da bracaatinga. Anu. Bras. Econ. Flor., 6: 277-282, 1953.
127. MEREWETHER, J.W.T. & Samsuzzaman, L.A.M. Studies of a lignin-carbohydrate complex. Holzforschung, 26: 11-18, 1972.
128. MORRAL, P. & BRIGGS, D.E. Changes in Cell Wall polysaccharides of germinating Barley Grains. Phytochemistry, 17: 1495-1502, 1978.
129. MORRISSON, I.M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. J. Sci. Fd. Agric., 23: 1463-1469, 1972.
130. _____. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. J. Sci. Fd. Agric., 23: 455-463, 1972.
131. _____. Isolation and analysis of lignin-carbohydrate complexes from Lolium multiflorum. Phytochemistry, 12: 2979-2984, 1973.
132. _____. Changes in the hemicellulosic polysaccharides of Rye - Grass with increasing maturity. Carbohydr. Res. 36: 45-51, 1974.
133. _____. Lignin carbohydrate complexes from Lolium perene. Phytochemistry, 13: 1161-1165, 1974.
134. MUKHERJEE, S. & TODD, A.R. 3-Deoxy-1-xylose. J. Chem. Soc. 969-973, 1947.
135. MULLER, P.C. & GLASSER, W.G. Lignin's potential contribution to the feasibility of biomass conversion to ethanol. Biotechnology and Bioengineering Symp., 13; 481-494, 1983.

136. NAKAMURA, Y. & HIGUCHI, T. Ester linkage of p-coumaric acid in Bamboo lignin. Holzforschung, 30: 187-191, 1976.
137. NEILSON, M.J. & RICHARDS, G.N. Chemical structures in a lignin-carbohydrate complex isolated from the bovine rumen. Carbohydr. Res., 104: 121-138, 1982.
138. NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153: 375-380, 1944.
139. NIEDUSZNSKI, I.A. & MARCHESSAULT, R.H. Structure of β , D(1 \rightarrow 4)-Xylan hydrate. Biopolymers, 1335-1344, 1972.
140. NORTHCOLE, D.H. Chemistry of the Plant Cell Wall. Ann. Rev. Plant Physiol., 23: 113-32, 1972.
141. NOWACKI, M.J. A bracaatinga e os fungos apodrecedores de sua madeira. Au. bras. Econ. Flor., 6: 277-282, 1983.
142. OGAWA, T. & SASAJIMA, K. ^1H - and ^{13}C -N.M.R.- Spectral study of synthetic methyl D-monno-oligosaccharides, Carbohydr. Res., 97: 205-227, 1981.
143. OLIVEIRA, M.L. Alguns Aspectos Estruturais de O-Acetil- (4-O-Metil glucurono) Xilano da Mimosa Bracatinga. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 1977.
144. PERLIN, A.S.. Methanolysis of carbohydrate orthoacetates. Can. J. Chem., 41: 555-561, 1963.
145. POLCIN, J. & BEZUCH, B. The structural study of milled wood and enzymatically isolated lignin fractions from spruce wood. Cellulose Chem. Technol, 12:473-482, 1978.
146. POZSGAY, V. Carbon-13 n.m.r.- Spectral study of L-Rhamnose Acetates. Carbohydr. Res. 80: 196-202, 1980.
147. PRESTON, R.D. Polysaccharide conformation and cell wall function. Ann. Rev. Plant. Physiol. 30: 55-78, 1979.

148. RAMACHANDRAN, G.N. In: Structural chemistry and Molecular Biology. Richard A. and Davidson N., (Ed.). San Francisco, 1968.
149. REDDY, B.S.; MAEURA, Y. & WAYMAN, M. Effect of dietary corn bran and autohydrolyzed lignin on 3,2' - dimethyl-4-aminobiphenyl-Induced Intestinal Carcinogenesis in Male F. 344 Rats. J. National Cancer Inst., 71(2) 1983.
150. REES, D.A. Polymer Shape. In: The Shapes of Molecules. Oliver and Boyd (Ed.). Edinburgh, 1967, p. 90-112.
151. _____. Structure, conformation, and mechanism in the formation of Polysaccharide Gels and Networks. Adv. Carbohydr. Chem. Bioch. 24: 267-331, 1969.
152. REES, D.A.; MORRIS, E.R.; THOM, D. & MADDEN, J.K. Shapes and Interactions of Carbohydrate Chains. In: The Polysaccharides, Vol.1. Aspinall, G.O. (Ed.). Academic Press, 205, 1982.
153. REES, D.A. & SKERRETT, R.J. Conformational analysis of cellobiose, cellulose and xylan. Carbohydr. Res., 7: 334-348, 1968.
154. REICHER, F. & CORRÊA, J.B.C. Lignin-hemicellulose complexes from the stem of Mimosa bracinga, Hoehne. An. Acad. brasil. Ciênc., 54(3): 579-584, 1982.
155. REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C. & GORIN, P.A.J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of Mimosa Scabrela (bracinga). A study of O-acetyl groups migration. Carbohydr. Res., 134, 1984.
156. ROSELL, K.-G. & SVENSSON, S. Studies of the distribution of the 4-O-methyl -D-glucuronic acid residues in Birch Xylan. Carbohydr. Res. 42: 297-304, 1975.
157. ROSENCWAIG, A. & GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. J. Appl. Phys. 47: 64-69, 1976.
158. RUBINO, M.; PETHICA, B.; ZUMAN, P. & FALKEHAG, S.I. The interactions of carcinogens with lignin and other components of dietary fiber. In: Dietary fibers: Chemistry and nutrition. Inglett, G.E. and Falkhag, S.I. (Ed.). New York, Academic Press, 1979, p. 251-271.
159. SAKA, S.; THOMAS, R.J. & GRATZL, J.S. Lignin distribution-determination by energy-dispersive analysis of X rays. Tappi, 61(1): 73-76, 1978.

160. SANDFORD, P.A. & CONRAD, H.E. The structure of the Aerobacter aerogenes A₃(S1) polysaccharide. I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochemistry, 5: 1508-17, 1966.
161. SARKANEN, K.V. & HERGERT, H.L. Classification and distribution. In: Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reaction. Sarkanen, K.V. and Ludwig, L.H. (Ed.). Wiley-Interscience, N.Y. 1967, p.43-94.
162. SARKANEN, K.V. & LUDWIG, C.H. Definition and Nomenclature. In: Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Sarkanen, K.V. and Ludwig, L.H. (Ed.). Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 1-18.
163. SARKAR, P.B.; CHATTERJEE, H. & Majumdar, A.K. The acid nature of jute fiber. J.Text. Inst., 38: 318-332, 1947.
164. _____. Combination between lignin and polyuronic acid in jute fibers. J. Text. Inst., 39: 1-7, 1948.
165. SAWARDEKER, J.S.; SLONECKER, J.H. & JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. Anal. Chem., 37: 1602-4, 1965.
166. SCHUBERT, W.J. The chemistry of Lignin. In: Lignin Biochemistry. Schubert, W.J. (Ed.), Academic Press, New York, 1965.
167. SCHULZE, E. Ber. Chem. Ges. Bd. XXIV pg. 2277, 1891, Apud: Czapek, F. Biochemie der pflanzen, I, Jena, Verlag von Gustav Fisher, 1905, p. 536.
168. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F. & RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid. content of vegetal fiber. Anal. Biochem., 96: 282-292, 1979.
169. SENGUPTA, A.B.; ROY, A. & McMILLAN, W.G. The association of the acetyl group with components of jute. J. Sci. Ind. Res., 19 B: 249-252, 1960.

170. SHARMA, V. Investigations on the fibers of pineapple [Ananas comosus (L). Merr.] leaves. Carbohydr. Res., 97: 323-329, 1981.
171. SIMONSON, R. Hemicellulose in the sulfate pulping process. Crystallized xylan-lignin compounds. Svenk. Papperstidn., 74: 268-270, 1971.
172. SMITH, H. Recognition and Diffusion in Plants. Nature, 273: 266-268, 1978.
173. SMITH, M.M. & HARTLEY, R.D. Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. Carbohydr. Res., 118: 65-80, 1983.
174. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of Sugars. J. Biol. Chem., 160: 61-68, 1945.
175. STAUB, A.M. Removal of proteins. Sevag method. Methods carbohydr. Chem., V: 5-6, 1965.
176. STEWART, C.M. & Mc PHERSON, J.A. The nonresistant components of the wood of Eucaëyptus regnans. IV. Methanol and aqueous extractions of chemically modified wood substances. Holzforsch. 140-149, 1955.
177. TAKAHASHI, N.; AZUMA, N. & KOSHIJIMA, T. Fractionation of lignin-carbohydrate complexes by hydrophobic-interaction chromatography. Carbohydr. Res. 107: 161-168, 1982.
178. TANNER, G.R. & MORRISON, I.M. Phenolic-carbohydrate complexes in the cell walls of Lolium perene. Phytochemistry, 22: 1433-1439, 1983.
179. TIMELL, T.E. Isolation and properties of an O-acetyl-4-O-methyl-glucurono-xyloglycan from the wood of white Birch (Betula papyrifera) J. Am. Chem. Soc., 82: 5211-5215, 1960.
180. _____. Wood Hemicelluloses Part I. Adv. Carbohydr. Chem., 19: 247-302, 1964.

181. TIMELL, T.E. Wood Hemicelluloses: Part II. Adv. Carbohydr. Chem. 20: 409-483, 1965.
182. _____. Galactoglucomanans from the wood of gymnosperms. Methods Carbohydr. Chem., V: 134-135, 1965.
183. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. Nature, 166: 444-455, 1950.
184. UTILLE, J.P. et VOTTERO, J.A. Effets de substituants sur les déplacements chimiques en r.m.n.-¹³C pour la série du D-xylose. Carbohydr. Res. 85: 289-297, 1980.
185. VERED, Y.; MILSTEIN, O.; FLOWERS, H.M. & GRESSEL, J. Bio-degradation of wheat straw lignocarbohydrate complexes (LCC). European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12: 183-188, 1981.
186. VIANA, E.F. 'Breves instruções sobre a cultura de bracatinga. Rio de Janeiro. Serviço de informação agrícola. 3 p. 1942.
187. WAITE, R. & GORROD, A.R.N. Structural carbohydrates of grasses; Comprehensive analysis of grasses. J.Sci. Food. Agric., 10: 308-317; 317-326, 1959.
188. WEHRLI, F.W. & WIRTHLIN, T. Interpretation of Carbon-13 N.M.R. Spectra. Heyden, London, 1976.
189. WENZEL, G.E. & CORRÊA, J.B.C. Hemicelluloses from the leaves of coffee tree. I. Fractionation of the hemicellulose A and structural analysis of 4-O-methylglucuronoxylan. An. Acad. Bras. Ciênc., 49(4): 605-13, 1977.
190. WENZEL, G.E. Fracionamento e purificação das hemiceluloses de folha de cafeeiro (Coffea arabica L. var. Mundo Novo). Análise Estrutural de um O-metil-glucurono xilano. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 1975.

191. WHISTLER, R.L. & FEATHER, M.S. Hemicellulose. Extraction from annual plants with alkaline solutions. Methods Carbohydr. Chem., V: 144-145, 1965.
192. WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L. Hemicelluloses. In: The Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry Pigman, W. and Norton, D. (Ed.), N.Y. Academic Press, 1970, p. 447-469.
193. WILKIE, C.B. The Hemicelluloses of grasses and cereals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 36: 215-265, 1979.
194. WOLFROM, M.L. & PLETCHER, D.E. Crystalline phenylurethans (Carbanilates) of sugar glycosids. J. Am. Chem. Soc., 62: 1151-1153, 1940.
195. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. Methods Carbohydr. Chem., II: 211-215, 1963.
196. WU, L.C.-F. & GLASSER, W.G. Engeneering plastics from lignin. I. Synthesis of hydroxypropyl lignin. J. Appl. Polym. Sci., 29: 1111-1123, 1984.
197. ZERMINIANI, A. Novos aspectos sôbre a estrutura da hemicelulose A do caule de Mimosa bracinga, Hoehne. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 1980.