

NELSON DOROSO

**ALGUNS ASPECTOS ESTRUTURAIS DA HEMICELULOSE B  
DO CAULE DA *Mimosa bracaatinga* HOEHNE**

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

CURITIBA

1981

**Tese orientada pelo**

**Prof. Dr. João Batista C. Corrêa**

## **AGRADECIMENTOS**

- \_ Ao Prof. João Batista Chaves Corrêa, nosso Orientador, pela sugestão do assunto e apoio constante em todas as fases deste trabalho.
- \_ Aos Professores José Hasencleve Duarte e Sieg Odebrecht pela revisão e correção de nossa tese .
- \_ Ao Prof. Marco Aurélio Lacombe Feijó pela confecção dos espectros de ressonância nuclear magnética .
- \_ À Coordenação e aos Professores do Curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.
- \_ Aos colegas da Pós-graduação , pela amizade e apoio .
- \_ À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) , CNPq e FINEP pelo suporte financeiro .
- \_ À Fundação Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade concedida à realização de nosso Mestrado .
- \_ A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho .

## ABSTRACT

The hemicellulose B from the stem of Mimosa bracaatinga Hoehne is composed of D-xylose and 4-O-methyl-D-glucuronic acid residues. Methylation, periodate oxidation, Smith degradation and analysis of the aldobouronic acid data indicated that the polysaccharide backbone consists of  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-linked D-xylopyranosyl residues, and some  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-linked D-xylopyranosyl units (minor component). The latter is substituted in the 2-positions by 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid and by D-xylopyranosyl residues .

## RESUMO

A hemicelulose B do caule de Mimosa bracaatinga Hoehne é composta de D-xilose e ácido 4-O-metil-D-glucurônico. Os dados de metilação, oxidação pelo periodato, degradação de Smith e análise do ácido aldobiurônico indicaram que a cadeia principal do polissacarídeo consiste de unidades de  $\beta$  -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses e de  $\beta$  -D-(1  $\rightarrow$  3)-xilopiranoses (menor componente). Estas últimas unidades se encontram substituídas nos carbonos C-2 por unidades de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico e de xilopiranosose .

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A8 - fração hemicelulósica insolúvel em água extraída do caule da Mimosa bracaatinga com NaOH a 8%.
- A24 - fração hemicelulósica insolúvel em água extraída do caule da Mimosa bracaatinga com NaOH a 24%.
- B8 - fração hemicelulósica solúvel em água extraída do caule da Mimosa bracaatinga com NaOH a 8%.
- B24 - fração hemicelulósica solúvel em água extraída do caule da Mimosa bracaatinga com NaOH a 24%.
- B8L - fração polissacarídica relativamente linear da hemicelulose B8 que precipitou na complexação / com iodo .
- B8L1 - subfração polissacarídica da fração B8L que não formou complexo com cetavlon .
- B8L2 - subfração polissacarídica da fração B8L que complexou com cetavlon .
- B8R - fração polissacarídica ramificada da hemicelulose B8 que não formou complexo com iodo .
- Cf. - conforme .
- d.i. - diâmetro interno .
- g.l.c. - cromatografia gás-líquido .
- g.l.c.-m.s. - cromatografia gasosa-espectrometria de massa .
- p.c. - cromatografia em papel .
- p/p - peso/peso
- TFA - ácido trifluoracético .
- T - tempo relativo de retenção
- t.l.c. - cromatografia em camada delgada
- v/v - volume/volume

# INDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO . . . . .	01
1.1. Classificação das hemiceluloses. . . . .	03
1.2. Hemiceluloses de madeira dura. . . . .	04
1.3. Hemiceluloses de madeira mole. . . . .	08
1.4. Hemiceluloses de Angiospermas monocotiledôneas . . .	09
1.4.1. Hemiceluloses de Gramíneas . . . . .	09
1.5. Hemiceluloses de frutos, sementes e raízes de Angiospermas dicotiledôneas. . . . .	11
1.6. Hemiceluloses de algas . . . . .	12
1.7. Algumas características da <u>Mimosa bracaatinga</u> Hoehne. 13	
1.8. Hemiceluloses de <u>Mimosa bracaatinga</u> Hoehne . . .	15
1.9. Objetivos. . . . .	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS. . . . .	20
2.1. Métodos Gerais . . . . .	20
2.2. Material . . . . .	24
2.3. Obtenção das hemiceluloses . . . . .	24
2.4. Fracionamento da hemicelulose B8. . . . .	25
2.5. Cromatografia em coluna de <u>Sephadex</u> . . . . .	28
2.6. Oxidação pelo periodato e degradação tipo Smith. . .	28
2.7. Determinação do grau de polimerização das frações B8L1 e B8L2. . . . .	30
2.8. Processos de metilação da fração B8L1 . . . . .	31
2.8.1. Processo de HAWORTH . . . . .	31
2.8.2. Processo de HAKOMORI. . . . .	31
2.9. Metanólise da fração B8L1 metilada . . . . .	32
2.10. Obtenção de alditóis acetatos parcialmente metilados. . . . .	32
2.11. Degradação do polissacarídeo acetilado. . . . .	33
2.12. Isolamento e análise de um ácido aldobiurônico após hidrólise ácida parcial . . . . .	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	35
3.1. Extração das hemiceluloses . . . . .	35
3.2. Fracionamento da hemicelulose B8. . . . .	36
3.3. Grau médio de polimerização . . . . .	38
3.4. Isolamento e análise do ácido aldobiurônico . .	39
3.5. Estudos de metilação da fração B8L1 e B8L1 modificada. 40	
3.6. Oxidação da fração B8L1 com periodato de sódio e degradação tipo Smith. . . . .	41
3.7. Algumas estruturas possíveis para a fração polissacarídica B8L1 . . . . .	42
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	55

## LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Esquema I .	Esquema de obtenção das hemiceluloses e fracionamento da hemicelulose B8 . . . . .	27
Figura 1 .	Variação da absorbância a 610 nm, das concentrações crescentes de hemicelulose A e B (fração/B8L) , na interação com iodo - iodeto de potássio . . . . .	44
Figura 2 .	Cromatografia em Sephadex G-75 das frações polissacarídicas B8L1 e B8L2. . . . .	45
Figura 3 .	Determinação do consumo de periodato da fração B8L1. . . . .	46
Figura 4 .	Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise da fração B8L1 metilada. . . . .	47
Figura 5 .	Mistura de xilosídeos padrões (g.l.c.) . . . . .	48
Figura 6 .	Análise por g.l.c. do produto de hidrólise da hemicelulose A permetilada, eluído com água da coluna de carvão-celite 1:2, reduzido e acetilado . . . . .	49
Figura 7 .	Análise por g.l.c. dos derivados parcialmente metilados da fração B8L1, na forma de alditóis acetilados . . . . .	50
Figura 8 .	Algumas estruturas possíveis para a hemicelulose B (fração B8L1) do caule da <u>Mimosa bracaatinga</u> Hoehne . . . . .	51
Tabela I .	Análise das frações hemicelulósicas do caule de <u>Mimosa bracaatinga</u> . Hoehne . . . . .	52
Tabela II .	Produtos de metanólise da fração B8L1 original e fração B8L1 modificada , metiladas. . . . .	53
Tabela III .	Análise de metilação da fração B8L1 original e modificada , metiladas . . . . .	54

I N T R O D U Ç Ã O

## 1. INTRODUÇÃO

Os principais componentes da parede celular das plantas foram identificados como celulose, hemicelulose, polissacarídeo péctico, proteína estrutural e lignina<sup>1</sup>. As primeiras partes formadas numa célula de madeira em desenvolvimento são a parede primária e a lamela média, sendo a primeira muito rica em material péctico, que é constituído principalmente por ácido D-galacturônico<sup>2</sup>. Durante o espessamento da parede celular, a celulose e as hemiceluloses vão se depositando para formar a parede secundária. Ao final deste período, a lignina, que é um polímero polifenólico tridimensional de unidades de fenil-propano, começa a se formar em sua maior parte na lamela média, atuando como substância cementante junto às fibras na madeira, e também na parede secundária. Quando há lignificação completa a célula morre.<sup>3,4</sup>

A celulose é o componente estrutural mais estudado da parede celular, consistindo de unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosose. Este polímero linear, contendo em média 10.000 unidades de glucose, agrega-se à parede primária da célula formando as fibras de celulose (aproximadamente 40 cadeias por fibra). As cadeias de glucano nas fibras de celulose são mantidas juntas/por pontes de hidrogênio. Essas pontes são formadas pelo átomo de hidrogênio de um grupo hidroxílico de uma unidade de glucose e o átomo de oxigênio do grupo hidroxílico de outra uni

dade. Individualmente essas ligações são relativamente fracas , todavia como entre as cadeias de glucano de uma fibra de celulose há uma grande quantidade delas<sup>3</sup>, a somatória dessas pequenas interações é suficiente para formar agregados moleculares , de relevante importância na resistência da parede celular <sup>3,4</sup> .

As hemiceluloses são polissacarídeos de baixo peso molecular , que se associam com a celulose e a lignina nos tecidos/ das plantas. O termo hemicelulose foi introduzido por Schulze em 1891 <sup>4</sup>; embora muitos cientistas especialmente na Europa , prefiram o termo "polioses de madeira" , a designação "hemicelulose" ainda é a mais usada <sup>4</sup> . O problema semântico quanto ao emprego do termo "hemicelulose" foi amplamente revisto e discutido por WENZEL <sup>5</sup> .

As hemiceluloses podem ser removidas diretamente do tecido original por extração alcalina ou, menos freqüentemente, com água. O rendimento da extração alcalina aumenta consideravelmente quando o tecido é previamente delignificado <sup>6</sup>. As hemiceluloses de plantas terrestres são constituídas principalmente de unidades de D-xilose , D-manose , D-glucose , D-galactose , L-arabinose , ácido 4-O-metil-D-glucurônico , ácido D-galacturônico , ácido D-glucurônico e, menos freqüentemente de L-ramnose, L-fucose e açúcares neutros O-metilados <sup>4,7,8</sup> .

Tanto nas plantas de madeira dura (Angiospermas arborescentes) como nas de madeira mole (Gimnospermas arborescentes) o conteúdo de celulose é, em média , 43 % . O conteúdo de lignina em madeira dura varia de 18 a 25 % , e em madeira mole de 25 a 35 % .

Nas Angiospermas arborescentes tropicais, o grau de lignificação é, freqüentemente, muito maior do que nas de zonas temperadas. O conteúdo de hemiceluloses é também variável. A madeira de Angiospermas arborescentes, como o vidoeiro branco (Betula papyrifera) e o vidoeiro prata (B. verrucosa) contem cerca de 35 % em hemiceluloses, ao passo que o caule do olmo americano (Ulmus americana) contem somente uns 20 %. Nas Gimnospermas arborescentes as hemiceluloses ocorrem em aproximadamente 20 % do peso da madeira <sup>7</sup>. A quantidade de grupos O-acetil é maior nas Angiospermas do que nas Gimnospermas <sup>4, 7, 8</sup>.

### 1.1. Classificação das hemiceluloses

O'DWYER <sup>9</sup>, em 1926, classificou as hemiceluloses em A e B, sendo estas denominações empregadas até nos dias de hoje. A hemicelulose A é a fração que precipita quando se baixa o pH do meio até 5,0 - 5,5, após extração alcalina das paredes celulares delignificadas ou não. A hemicelulose B é obtida por precipitação etanólica do filtrado original da hemicelulose A.

GAILLARD <sup>10</sup>, em 1961, subfracionou a hemicelulose B em linear (B.L) e ramificada (B.R), através dissolução da hemicelulose B em solução de cloreto de cálcio concentrado, precipitando-se a fração linear (B.L) por adição de uma solução de iodo-iodeto de potássio; a fração ramificada (B.R.), permanece em solução, sendo recuperada por precipitação etanólica.

Além da classificação de O'DWYER ampliada por GAILLARD, é digna de destaque entre outras, a classificação proposta por BLAKE et al. <sup>11</sup>, em 1971, onde se obtém as frações hemicelulósicas A, B e C, após neutralização do extrato alcalino com simultânea deionização por resina catiônica e diálise, ao invés da neutralização com ácido acético.

Desse modo, a fração insolúvel seria designada hemicelulose A ; a fração obtida por precipitação etanólica seria a hemicelulose/ B, e a fração solúvel em etanol e recuperada por liofilização seria a hemicelulose C .

## 1.2. Hemiceluloses de madeira dura

### (Angiospermas arborescentes)

A hemicelulose predominante em plantas terrestres de madeira dura é um xilano acídico, parcialmente acetilado, e em menor quantidade, um glucomanano e um arabinogalactano <sup>4,7</sup> .

O xilano presente no álamo (Populus tremuloides) foi a primeira hemicelulose sujeita a investigações estruturais mais detalhadas. JONES & WISE <sup>12</sup> , em 1952, obtiveram por hidrólise total do extrato-bruto do caule dessa planta diversos monossacarídeos (L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-galactose), D-xilobi-ose e D-xilotriose na fração neutra, enquanto que na fração ácida isolada identificaram o ácido D-galacturônico, o ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido aldobiurônico [2-O-(4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-D-xilopirano] e, diversos oligossacarídeos ácidos. Pelos resultados obtidos nas análises de metilação, oxidação pelo periodato e polarimetria, foi sugerido que o xilano era constituído de uma cadeia principal de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-xilopiranoses . Estas unidades apresentavam substituição nos carbonos/ C-2 por unidades de ácido urônico . Três anos mais tarde ,MILKS & PURVES <sup>13</sup> isolaram da madeira dessa árvore quatro frações contendo várias quantidades de ácido 4-O-metil-D-glucurônico e unidades de D-xilopirano . Em 1957, JONES et al. <sup>14</sup> obtiveram por extração alcalina direta da madeira da mesma espécie de álamo , uma fração hemicelulósica  $[\alpha]_D^{25} -75^\circ$  , cujos produtos de hidrólise continham , predominantemente , xilose , além de pe

quenas quantidades de hexoses, arabinose e ramnose. Segundo os referidos autores a cadeia principal desse polímero era formada de unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses, as quais eram substituídas nos carbonos C-2 e C-3 por unidades de ácido urônico e L-arabinose. Esta proposição foi baseada nos seguintes resultados da análise dos produtos de hidrólise do xilano metilado: 2,3,5-tri-O-metil-L-arabinofuranose, 2,3,4-tri-O-metil-D-xilopiranosose, 2,3-di-O-metil-D-xilopiranosose, 2-O-metil-D-xilopiranosose, 3-O-metil-D-xilopiranosose, e mais tres componentes acídicos.

SAARNIO et al.<sup>15</sup> isolaram da holocelulose da madeira do vidoeiro prata (Betula verrucosa) um xilano acídico constituído de unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranosose e ácido 4-O-metil-D-glucurônico numa relação de 22 : 1. Este ácido se ligava ao carbono C-2 de uma xilopiranosose da cadeia principal.

TIMELL<sup>16</sup> estudando os polissacarídeos do vidoeiro amarelo (Betula lutea), isolou e purificou dois xilanos, cujos produtos de metanólise desses polímeros metilados eram: o 2-O-metil-D-xilopiranosídeo, o 3-O-metil-D-xilopiranosídeo, o 2,3-di-O-metil-D-xilopiranosídeo, o 2,3,4-tri-O-metil-D-xilopiranosídeo e um oligossacarídeo ácido [2-O-(2,3,4-tri-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-3-O-metil-D-xilopiranosídeo], em proporções molares de 3 : 109 : 1 : 11 e 3 : 89 : 1 : 9. Segundo o autor, ambos os xilanos apresentam na cadeia principal 190 unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranosose as quais são parcialmente substituídas nos carbonos C-2 (uma entre dez unidades) por ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurônico.

Posteriormente, TIMELL <sup>17</sup> delignificou a madeira do videiro branco (Betula papyrifera) por tratamentos alternados com clo<sub>2</sub> e etanolamina alcoólica, e o polímero extraído com dimetil sulfóxido [O-acetil-(4-O-metilglucurono)-xilano] continha 3,6 grupos O-acetil para cada dez resíduos de xilose, provavelmente ligados aos carbonos C-2 e C-3 das unidades de xilose.

Os oligossacarídeos (2 a 18 unidades de xilose) obtidos por HAVLICEK & SAMUELSON <sup>18</sup>, após hidrólise ácida parcial do xilano do videiro e separados através de coluna de carvão-celite, em conexão com os experimentos de ROSELL & SVENSSON <sup>19</sup>, indicaram que as unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurônico são distribuídas ao acaso ao longo da cadeia principal do xilano .

ASPINALL et al. <sup>20</sup> identificaram na hemicelulose A extraída da madeira de faia (Fagus sylvatica), um xilano constituído de D-xilose e ácido 4-O-metil-D-glucurônico numa relação molar de 70 : 7 , respectivamente . A mesma relação/foi encontrada por ADAMS <sup>21</sup> num xilano solúvel em água, extraído do Fagus grandifolia .

GILLHAM & TIMELL <sup>22</sup> extraíram uma hemicelulose do olmo branco com hidróxido de potássio a 24 % , cujos produtos de hidrólise foram xilose e traços de galactose , glucose , manose e ramnose. O ácido aldobiurônico foi o mesmo encontrado na madeira das Angiospermas acima citadas. Traços de ácido D-galacturônico também foi observado. Os referidos autores <sup>23</sup> verificaram que a madeira dessa planta (Ulmus americana) continha menos xilano do que a maioria das madeiras duras até en

tão estudadas. Na estrutura proposta deste xilano, para cada sete unidades de D-xilopiranosose da cadeia principal (185 unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranososes), une-se uma unidade de ácido 4-O-metil-D-glucurônico através de enlace glicosídico do tipo  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2) .

DUTTON & MURATA <sup>24</sup> e DUTTON & McKELVEY <sup>25</sup> analisaram as hemiceluloses obtidas por extração alcalina direta da madeira da macieira (Malus pumila L. , var. Golden transparent) , e da cerejeira (Prunus avium L. , var. Bing), respectivamente . Ambas as hemiceluloses foram identificadas como 4-O-metilglucuronoxilanos com aproximadamente 120 unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranososes na cadeia principal . A relação de ácido 4-O-metil-D-glucurônico para D-xilose nesses polímeros foi de 1 : 6 e 1 : 7 , ainda respectivamente .

WISE , citado por POLGLASE <sup>26</sup> , sugeriu que as hemiceluloses de madeira dura apresentam um padrão de arquitetura simples, consistindo predominantemente de unidades de D-xilose e pequenas quantidades de ácido O-metil-urônico .

Todas as madeiras duras até nos dias de hoje submetidas/ a investigações estruturais minuciosas, têm mostrado conter entre outros, um polissacarídeo constituído de unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranososes . Algumas dessas unidades apresentam uma cadeia lateral terminal simples de ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ligada diretamente à posição 2 (das unidades de xilose) da cadeia principal através de ligação glicosídica do tipo  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2). Sete em cada dez resíduos de D-xilose da cadeia principal / contêm grupos O-acetil nos carbonos C-2 e C-3 <sup>27</sup> .

Ao contrário dos xilanos de madeira mole, os 4-O-metilglucuronoxilanos de madeira dura são desprovidos de L-arabinose. Pequenas proporções de L-arabinose (menos do que 0,5%) são provavelmente originados de outros polissacarídeos, tais como material péctico ou arabinogalactanos <sup>4</sup>. O xilano do álamo (Populus tremuloides) <sup>12</sup> foi suposto conter como grupos terminais não redutores, unidades de L-arabinofuranose ligadas ao carbono C-3 das unidades da cadeia principal. Contudo, num estudo / posterior, JONES et al. <sup>28</sup> verificaram que o material contendo unidades de L-arabinofuranose, quando submetido a uma purificação, não apresentava mais essas unidades .

Até há poucos anos, acreditava-se que os xilanos de madeira dura fossem constituídos de uma cadeia linear. Todavia , DUTTON & UNRAU <sup>29</sup> usando a técnica de degradação tipo Smith foram os primeiros a demonstrar que os xilanos de madeira dura podem , de fato , ser levemente ramificados. ZINBO & TIMELL<sup>30</sup> demonstraram , posteriormente , que o 4-O-metilglucuronoxilano presente na madeira do álamo (P. tremuloides) contém em média dois pontos de ramificação por macromolécula. Portanto, é extremamente provável que outros xilanos de madeira dura sejam similarmente ramificados. O grau de polimerização das cadeias laterais não é conhecido, mas deve ser bastante baixo , conforme citou TIMELL <sup>7</sup> em sua revisão sobre hemiceluloses .

### 1.3. Hemiceluloses de madeira mole

(Gimnospermas arbóreas)

A hemicelulose predominante em plantas terrestres de madeira mole é um O-acetil-galactoglucomanano e, em menor proporção , um arabino-4-O-metilglucuronoxilano <sup>4</sup> .

As investigações estruturais dos xilanos isolados de hemiceluloses do caule de Gimnospermas arborescentes, tais como Tsuga heterophylla <sup>31</sup>, Picea excelsa <sup>32</sup>, Pinus taeda <sup>33</sup>, Pinus silvestris <sup>34</sup>, Pinus elliottii <sup>35</sup>, Abies balsamea, Picea glauca, Pinus strobus, Tsuga canadensis, Thuja occidentalis <sup>7</sup> e muitos outros xilanos de madeira mole analisados, demonstraram que esses polissacarídeos são constituídos de unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses. Algumas dessas unidades apresentam uma unidade terminal não redutora de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurônico ligada ao carbono C-2, sendo quanto a estes aspectos, similar aos xilanos existentes em madeira dura. No entanto, ao contrário dos xilanos de Angiospermas arborescentes, os xilanos de Gimnospermas arborescentes contêm unidades de L-arabinofuranoses diretamente ligadas aos carbonos C-3 das unidades de xilose da cadeia principal, por intermédio de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ . A distribuição das cadeias laterais acídicas e arabinofuranosídicas não é conhecida. Os xilanos de madeira mole contêm em média uma unidade de ácido urônico para cada cinco ou seis unidades de D-xilose sendo, portanto, mais acídicos do que os xilanos de madeira dura. Há cerca de uma unidade de L-arabinose para cada oito ou nove unidades de D-xilose. Segundo MEIER <sup>36</sup>, os xilanos de madeira mole não possuem grupos O-acetil como se pensava anteriormente. Estes grupos se encontram ligados aos átomos de carbono C-2 e C-3 das unidades de manose dos glucomanos. As evidências quanto à natureza linear ou ramificada dos xilanos de madeira mole são contraditórias e, conseqüentemente, inseguras <sup>7</sup>.

#### 1.4. Hemiceluloses de Angiospermas monocotiledôneas

##### 1.4.1. Hemiceluloses de Gramíneas

CHANDA et al. <sup>37</sup> encontram-se entre os precursores nas análises de hemiceluloses de Gramíneas, isolando do capim esparto (Stipa tenacissima L.) um xilano constituído de unidades de D-xilopiranoses unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4). Este xilano, que não contém unidades de L-arabinose, apresenta uma única cadeia lateral terminal de unidades de xilose ligada ao carbono C-3 de uma unidade de D-xilose da cadeia principal.

ASPINALL & MAHOMED <sup>38</sup> propuseram para o xilano isolado da palha do trigo uma estrutura similar a do capim esparto; todavia, a única ramificação existente no carbono C-3 das unidades de D-xilose da cadeia principal era uma cadeia lateral/terminal simples de ácido D-glucurônico. ADAMS <sup>39</sup> encontrou na folha do trigo um xilano com idêntica estrutura ao da palha, contendo em adição unidades de arabinose ligadas aos carbonos C-3 das unidades de xilose da cadeia linear.

FALCONER & ADAMS <sup>40</sup> identificaram na hemicelulose B isolada da casca de aveia o ácido D-glucurônico e o ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ligados glicosidicamente por enlaces do tipo  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  2) às unidades de xilose da cadeia principal.

BUHALA <sup>41</sup> isolou um arabinogalacto-(4-O-metilglucurono)-xilano das folhas de cevada (Hordeum vulgare). O xilano, além do grupo terminal não redutor de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurônico ligado ao carbono C-2 da xilose, apresentava uma cadeia lateral terminal composta de galactopiranosil-(1  $\rightarrow$  4)-D-xilopiranosose-(1  $\rightarrow$  2)-L-arabinofuranose, ou cadeias terminais simples de L-arabinofuranose ligadas ao carbono C-3 de certas unidades de xilose da cadeia principal.

Da casca do grão do sorgo WOOLARD & RATHBONE <sup>42</sup> isolaram

e descreveram um xilano com ramificações no carbono C-2 das unidades de D-xilose da cadeia principal; as ramificações eram unidades simples de ácido D-glucurônico e seu 4-metil éter. Nos carbonos C-2 e C-3 de algumas unidades de D-xilopiranosose encontraram cadeias laterais simples de L-arabinofuranose .

Grande parte das Gramíneas <sup>43-48</sup> estudadas também apresentam um xilano com cadeia principal formada de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses a qual possui dois tipos de cadeias laterais simples: ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurônico e L-arabinofuranose ligadas , respectivamente, aos carbonos C-2 e C-3 das unidades de D-xilopiranosose da cadeia linear .

#### 1.5. Hemiceluloses de frutos, sementes e raízes de Angiospermas dicotiledôneas

A cadeia principal de seus xilanos é, também, constituída por unidades de D-xilopiranosose interligadas glicosidicamente  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) .

Nas sementes de tamarindo <sup>49</sup> e no endocarpo do fruto da mangueira (Mangifera indica , var. Bullock's heart)<sup>50</sup> os xilanos apresentam ramificações no carbono C-3 das unidades de D-xilopiranosose da cadeia principal, por cadeias laterais simples de D-xilose .

O xilano de semente de girassol <sup>51</sup> apresenta uma cadeia principal composta de unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses , com substituição apenas no carbono C-3 por cadeia lateral simples de ácido D-glucurônico .

Para o xilano da parede celular do fruto da pereira <sup>52</sup> foi proposta uma estrutura ramificada, com substituição no carbono C-3 das unidades de D-xilopiranosose da cadeia principal por uma cadeia lateral composta formada de unidades de D-xilose , e por cadeia lateral simples de ácido D-glucurônico .

O xilano das sementes de colza <sup>53</sup> apresenta ramificação apenas por ácido 4-O-metil-D-glucurônico no carbono C-2 das unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses da cadeia principal.

Da holocelulose clorada de raízes do bordo <sup>54</sup> (Acer saccharum Marsh) foi isolado um glucoxilano, cujas cadeias laterais formadas de xilose ou ácido 4-O-metil-D-glucurônico se ligam aos carbonos C-2 de certas unidades de D-xilopiranoses da cadeia principal. A cadeia principal do glucoxilano é composta de unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-glucopiranoses e de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses .

Os xilanos das fibras sedosas da semente da paineira (Asclepias syriaca <sup>55</sup> e Ceiba pentandra <sup>56</sup>), contêm cadeias laterais simples de ácido 4-O-metil-D-glucurônico e D-xilopiranoses/ligadas, respectivamente, aos carbonos C-2 e C-3 das unidades de D-xilopiranoses da cadeia principal .

#### 1.6. Hemiceluloses de algas

Das paredes celulares das algas foram isolados xilanos / constituídos por unidades de D-xilopiranoses com interligações/ do tipo  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) e  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) <sup>57</sup>. Ambos os xilanos da Rhodymenia palmata , analisados estruturalmente por PERCIVAL & CHANDA <sup>58</sup> , e por BJORN DAL et al. <sup>59</sup> são lineares, com interligações do tipo  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) e  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) na proporção de 1 : 2. O principal polissacarídeo solúvel em água da Chaetangium fastigiatum , estudado por CERREZO et al. <sup>60</sup> , é semelhante ao descrito para a R. palmata, variando apenas na proporção de interligações  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) para  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) (relação 1:3). Contudo, há evidências , segundo os autores, de que o xilano da C. fastigiatum é levemente ramificado .

Os principais aspectos estruturais do grupo de xilanos /

das hemiceluloses estão hodiernamente esclarecidos. Todos os polissacarídeos deste tipo extraídos de plantas terrestres até agora examinados, pertencem ao mesmo tipo geral, isto é, constituem-se de unidades de D-xilopirranose interligadas, predominantemente, por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4), excetuando-se os xilanos de algas .

Os xilanos de ambas as madeiras moles e duras, bem como/ de outras plantas dicotiledôneas, são caracterizados por cadeias laterais de ácido 4-O-metil-D-glucurônico e, em menor extensão de L-arabinofuranose; os xilanos de cereais e gramíneas/ são caracterizados por cadeias laterais de L-arabinofuranose , e em menor proporção de ácido D-glucurônico ou seu 4-metil éter. Do exposto , conclui-se que não há uma característica estrutural que diferencie os grupos de xilanos de acordo com sua procedência .

#### 1.7. Algumas características da M. bracaatinga Hoehne

A Mimosa bracaatinga Hoehne é uma Angiosperma arborecente, que ocorre nas zonas temperadas do Sul do Brasil (Paraná , Santa Catarina, Rio Grande do Sul) e em São Paulo. Pertence à família das Leguminosas, sub-família das Mimosáceas, gênero Mimosa. É de crescimento rápido, alcançando 15 metros de altura em 4 a 6 anos, sendo muito útil para reflorestar, regenerar o solo, auxiliar no combate à erosão e produzir lenha<sup>61</sup>. Instruções sobre sua cultura foram publicadas por VIANNA<sup>62</sup>, em 1942. Seu caule, que excepcionalmente ultrapassa 40cm de diâmetro, é avermelhado ou branco. As folhas são duplo-pinadas, com folíolos pequenos oblongos e obtusos, pubérulos e flores em umbelares nas axilas das últimas folhas dos ramos, amarelas e sustentadas sobre pedúnculos de 1 a 1,2 cm de comprimento. Os frutos da Mimosa bracaatinga se apresentam em vagens curtas, asperamente

hirsutas. As flores são caracterizadas por apresentarem filamentos estaminoidiformes acéfalos entre os estames portadores de anteras, sendo preferidas pelas abelhas silvestres. As flores ocorrem de junho a agosto e, os frutos de novembro a dezembro, tendo cada vagem que é de cor pardacenta, 4 a 6 sementes de coloração castanho-escura, cujas sementes conservam por longo tempo o poder germinativo. Mesmo após queimadas de florestas de bracatinga ocorre o reflorestamento espontâneo<sup>63</sup>.

Hoehne, botânico brasileiro deu o nome de Mimosa bracaatinga a essa árvore, em homenagem aos índios guaranis do sul do país (maracá ou bracá = chocalho, tinga = branco). O nome "bracaatinga" foi preferido por estar já consagrado pelo uso; todavia, presumiu Hoehne, que os guaranis chamavam a essa árvore de "abaracaatinga" (aba = muitas, rá = penas ou plumas, caá = árvore ou mata, tinga = branco), que significa, portanto, "árvore ou mata de muitas plumas brancas", o que vem a ser muito mais lógico. Os colonizadores portugueses \_relatou Hoehne\_ devem ter entendido como "A baracaatinga" e, depois, desprezando o artigo, tornou-se conhecida como "baracaatinga" e, finalmente, com mais uma modificação pelo uso popular, "bracaatinga". "Paracaatinga" é outro sinônimo empregado, que surgiu dos imigrantes alemães, que costumam trocar a letra "b" por "p" quando se expressam em nosso idioma.

Segundo Hoehne, existe uma outra espécie de mimosácea pertencente ao mesmo gênero, que é a Mimosa scabrella de Bentham, freqüentemente confundida com a Mimosa bracaatinga Hoehne, cuja diferenciação só é perceptível aos que se dedicam à Botânica, isso naturalmente quanto aos órgãos florais, pois na M. scabrella, observa-se uma planta de pequeno porte, raramente maior que 5 ou 6 metros<sup>61</sup>.

A análise de uma amostra de folhas secas a 105°C, da Mi-

mosa bracaatinga H. realizada pelo TECPAR (antigo IBPT), em agosto de 1974, revelou 18,23% de protídeos, 2,63% de lipídeos, 55,7% de glicídeos, 18,4% de fibras e 4,06% de cinzas.

As folhas utilizadas como forrageiras foram bem aceitas / pelos bovinos, sem qualquer prejuízo à saúde dos mesmos ou ao leite, o que é de grande importância econômica aos pecuaristas .

Além de produzir lenha com bom teor calorífico e, devido à abundante ocorrência em nossa região, seu caule é empregado como vigas de escoras pelas empresas de construção civil por apresentar elevada rigidez. Apesar de produzir fibras curtas, o caule é de bom aproveitamento na fabricação de papel de embrulho e higiênico, sendo que a celulose obtida do Pinus pode ser incorporado 10% de celulose de bracaatinga para produção de papel de boa qualidade, conforme experimentos feitos pela equipe de técnicos da Klabin. Pode ser ainda de grande utilidade na fabricação de móveis, aglomerados, lambris e carvão para metalurgia .

#### 1.8. Hemiceluloses de Mimosa bracaatinga Hoehne

CORREA et al. <sup>64</sup> e GOMES <sup>65</sup> estudaram a hemicelulose A, um (4-O-metilglucurono)-xilano isolado do caule da Mimosa bracaatinga H. As análises desse polissacarídeo álcali-solúvel indicaram uma estrutura consistindo de uma cadeia principal com aproximadamente 118 unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses, com ramificações nos carbonos C-3 das unidades da cadeia linear por D-xilose (3%) e ácido metil- $\alpha$ -D-glucurônico (11%). A análise do ácido aldobiurônico isolado evidenciou que o mesmo se tratava do O-(4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xilopiranosose.

OLIVEIRA <sup>66</sup> extraiu o material hemicelulósico, da holoce-lulose do caule dessa árvore, com dimetil-sulfóxido, a fim de

preservar os grupos O-acetil. O polissacarídeo apresentou um grau médio de polimerização de 150, dando uma única banda na eletroforese em acetato de celulose, e um pico simétrico na cromatografia em Sephadex G-100. A hidrólise completa do polissacarídeo com ácido produziu D-xilose e ácido 4-O-metil-D-glucurônico na proporção molar de 9 : 1 (g.l.c.). O polímero, solúvel em água, apresentando rotação óptica específica igual a -62, indicou predominância de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  no polissacarídeo. A análise de metilação da hemicelulose nativa indicou para esse polímero uma cadeia principal composta de  $\beta$ -D- (1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses com leve grau de ramificação. O espectro em ressonância nuclear magnética do polissacarídeo nativo registrou absorção (T) em 7,8 acusando a presença de grupos O-acetil. O conteúdo em grupos O-acetil determinado pelo método colorimétrico de McComb & McCready, e pelo método de saponificação, foi de 20-22%. O polissacarídeo acetilado apresentou um consumo de 0,62 mol de periodato por mol de açúcar anidro. A distribuição dos grupos O-acetil no xilano foi determinada pelo método no qual os grupos hidroxílicos livres, são primeiro protegidos pela reação com fenilisocianato, metilando-se a seguir o polímero, com simultânea desacetilação. Em seguida, Oliveira fez clivagem dos grupos fenilcarbamoil com o ânion metilsulfinil, reduziu, hidrolisou completamente e analisou os açúcares derivados parcialmente metilados, na forma de seus acetatos de alditóis através de g.l.c.-m.s. Os produtos foram identificados como 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose (0,95%), 2,3-di-O-metil-D-xilose (17,9%), 3-O-metil-D-xilose (20,15%), 2-O-metil-D-xilose (4,0%) e D-xilose (57,0%). A degradação tipo Smith da hemicelulose nativa mostrou que as unidades de ácido urônico não possuem grupos O-acetil. Assim, os grupos O-acetil existem nos C-2 ou C-3, e também nos C-2 e C-3 de uma mesma unidade de xilo-

se, distribuindo-se ao acaso na cadeia do polímero original. O polissacarídeo na forma acetilada nativa, em solução de cloreto de cálcio aquoso, não reagiu com solução aquosa de iodo-iodeto/potássio, enquanto que após a desacetilação esta interação ocorreu, com desenvolvimento máximo de cor azul-escuro a 610 nm.

GEBARA <sup>67</sup> estudou a hemicelulose A extraída do caule da Mimosa bracaatinga, através da análise dos oligossacarídeos neutros e ácidos obtidos por fragmentação do polissacarídeo com a hemicelulase produzida pelo P. circinatus, crescido em meio e condições adequadas, tendo como única fonte de carbono e energia a própria hemicelulose A de M. bracaatinga. Através da degradação tipo Smith dos oligoálcoois, seguida de metilação, Gebara constatou a presença de D-xilose resistente à oxidação com periodato nos oligossacarídeos neutros, identificando entre outros produtos o 2-O-metil-D-xilopiranosídeo ou 3-O-metil-D-xilopiranosídeo, indicando a possibilidade de ramificações no C-3 ou no C-2 das unidades de D-xilopiranoses da cadeia principal. A ligação glicosídica do ácido 4-O-metil-D-glucurônico à cadeia do xilano, foi identificada como sendo  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3), por polarimetria e pela análise do ácido aldobiurônico, via degradação tipo Smith do derivado metil-éster-metilglicosídeo.

ZERMIANI <sup>68</sup>, recentemente reanalisou a hemicelulose A extraída do caule dessa árvore, utilizando técnicas mais adequadas. Através de degradação tipo Smith, estudos de metilação e espectrometria de massa dos oligossacarídeos neutros e ácidos resultantes da hidrólise enzimática <sup>67</sup>, chegou a resultados que sugerem um xilano constituído principalmente de uma cadeia de unidades de  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4)-xilopiranoses, havendo evidências para unidades de D-xilopiranoses interligadas  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  3) na cadeia linear. As cadeias laterais são formadas de unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurônico e de D-xilose as quais se ligam aos car

bonos C-2 das unidades da cadeia principal .

### 1.9. Objetivos

As estruturas das hemiceluloses de grande variedade de vegetais são conhecidas, ou parcialmente conhecidas. O número de espécies investigadas é tão grande que possibilita fazer-se generalizações quanto à proporção, natureza química e localização das hemiceluloses em nossas mais importantes plantas. Contudo, é evidente que um vasto número de problemas permanecem, por enquanto, sem solução, e que novos e surpreendentes aspectos ainda podem ser esperados neste campo. Alguns detalhes estruturais das principais hemiceluloses dos vegetais não estão completamente elucidados. Assim, o grau de ramificação dos xilanos e glucomanos, a distribuição dessas cadeias laterais e, como se apresentam as unidades de ácido urônico nos xilanos nativos, constituem-se em assunto aberto para investigações. Tais pesquisas são dificultadas pelo fato de não se conseguir extrair quantitativamente as hemiceluloses e, particularmente, os xilanos nas suas formas nativas, pois a extração com álcali pode causar transformações químicas nesses polímeros; embora, a extração dos xilanos com dimetil-sulfóxido seja o método mais conveniente, só se consegue extrair os xilanos acetilados mais ou menos quantitativamente, após uma delignificação prévia da madeira, processo drástico/que pode alterar quimicamente as referidas macromoléculas. Portanto, não existe um método perfeito de extração das hemiceluloses. Desse modo, se fosse conseguido um processo de delignificação da madeira mole sem concomitante degradação de seus xilanos/ e glucomanos, tornar-se-ia possível estudar as propriedades moleculares de tais polímeros nas formas como se encontram na natureza. O isolamento de hemiceluloses rigorosamente puras é uma ou

tra problemática de técnica que se apresenta, prejudicando sobremaneira o estabelecimento da natureza química das hemiceluloses existentes em menores quantidades nas madeiras, e que ainda não são conhecidas. Por outro lado, os recentes avanços no instrumental utilizado nas análises químicas, alguns de altíssima/sofisticação, têm possibilitado esclarecer vários aspectos estruturais dos componentes químicos da madeira e, sem dúvida, num futuro não muito distante, a arquitetura molecular da madeira, incluindo o exato estado físico das hemiceluloses na parede celular e suas relações com outros constituintes, especialmente a celulose e a lignina, estará completamente desvendada.

Ao contrário da celulose, as hemiceluloses não têm sido aproveitadas industrialmente, salvo raríssimas exceções, como é o caso dos xilanos, que são empregados na produção de xilitol (adoçante dietético). As hemiceluloses, junto com a celulose e a lignina, são substâncias químicas muito abundantes em nosso planeta, constituindo-se em fontes para obtenção de recursos energéticos, alimentares e medicinais. Por esse motivo, vêm recebendo merecidamente especial atenção dentro do setor de pesquisa aplicada.

No presente trabalho, fez-se um estudo estrutural da fração hemicelulósica solúvel em água (hemicelulose B), extraída com álcali do caule da Mimosa bracaatinga Hoehne, a fim de compará-la com a hemicelulose A dessa planta.

M A T E R I A I S

E

M É T O D O S

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Métodos Gerais

A cromatografia em papel (p.c.) foi realizada em papel Whatman números 1 e 3 MM pelo método de desenvolvimento ascendente, nos seguintes sistemas de solventes:

- a) benzeno : n-butanol : piridina : água (1:5:3:3, v/v, fase superior);
- b) acetato de etila : ácido acético : ácido fórmico : água (18:3:1:4, v/v, fase superior).

A visualização dos açúcares foi feita com nitrato de prata alcalino<sup>69</sup> e, cloridrato de p-anisidina<sup>70</sup>.

A cromatografia em camada delgada (t.l.c.) foi efetuada em placas de sílica-gel (Merck), também pelo método de desenvolvimento ascendente, usando-se os seguintes sistemas de solventes:

- c) n-butanol : acetona : tampão fosfato pH 5 (4:5:1, v/v);
- d) acetato de etila : éter de petróleo : clorofórmio (3:3:1, v/v).

Os cromatogramas foram revelados com fosfato de anilina ou ácido sulfúrico a 5% em metanol.

Na análise por cromatografia gasosa (g.l.c.) foi empregado o cromatógrafo VARIANT, modelo 2440, com detector de ionização de chama, e nitrogênio como gás de arraste. Na análise dos derivados metilados, conforme STEPHEN et al.<sup>71</sup>, utilizou-se a coluna a: 14% p/p de LAC-4R-886 sobre "Chromosorb W" de 80-100 "mesh" (DM SC), em tubo de cobre de 100 x 0,4 cm (d.i.) a 150°C, com detector

a 225°C e câmara de injeção a 205°C, fluxo do gás de arraste a 25 ml/min. Os tempos relativos de retenção (T) foram calculados em relação ao 0-metil-2,3,4,6-tetra-0-metil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo. Para a análise dos alditóis acetilados, de acordo com SWARDEKER/et al. <sup>72</sup> e dos açúcares parcialmente metilados, na forma de alditóis acetilados, segundo LINDBERG <sup>73</sup>, foram usadas as colunas b e c. Coluna b: 3% de ECNSS-M sobre "Gas Chrom Q" de 100-120 "mesh", em tubo de cobre de 200 x 0,15 cm (d.i.) a 170°C, com detector a 250°C, câmara de injeção a 230°C e, fluxo do gás de arraste de 25ml/min. Para a determinação das proporções molares dos produtos de degradação tipo Smith (após conversão em alditóis acetilados), a coluna b foi usada com temperatura programada (130-180°C, 10°C/min). Coluna c: 3% de OV-225 sobre "Gas Chrom Q" de 100-120 "mesh", em tubo de cobre de 200 x 0,15 cm (d.i.), a 170°C para os derivados parcialmente metilados na forma de seus alditóis acetatos, com detector a 250°C, câmara de injeção a 230°C, e fluxo do gás de arraste de 25 ml/min. Os cálculos das áreas dos derivados, obtidas nos cromatogramas, foram efetuados pelo processo de triangulação. Os valores de T para os derivados de alditóis acetatos foram comparados com padrões de alditóis acetilados e, os valores de T dos açúcares metilados, parcialmente acetilados, foram calculados em relação ao de 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol.

As dosagens em carboidrato total, nas diferentes frações polissacarídicas, foram feitas pelo método de DUBOIS et al. <sup>74</sup>, e o teor de ácido urônico, conforme BITTER & MUIR <sup>75,76</sup>.

Os teores protéicos foram dosados segundo LOWRY et al. <sup>77</sup>

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em aparelho COLEMAN JÚNIOR, modelo 6 A.

As determinações de pH foram efetuadas em aparelho CLAMANN & GRALMERT MV 85 (Dresden) .

As análises em infra-vermelho foram realizadas em aparelho PERKIN-ELMER , modelo IR-700 .

Os espectros em ressonância nuclear magnética foram processados em um espectrômetro VARIAN , modelo XL-100, usando-se como solvente  $D_2O/NaOD$  (30%) , a  $70^{\circ}C$  , com largura de varredura de 1000 Hz e tempo de 250 segundos .

As rotações óticas foram determinadas em polarímetro / PERKIN-ELMER , modelo 141 , a  $25^{\circ}C$  e banda D do sódio .

O grau de pureza das frações polissacarídicas foi verificado por eletroforese em acetato de celulose, após coloração das frações com azul de Procion M-3G (Cia. Imperial de Indústrias Químicas do Brasil), de acordo com o método de DUDMAN & BISHOP <sup>78</sup> , em tampão borato 0,025 M e pH 9,3 , usando-se o aparelho FANEN , com câmara de imersão CHEMETRON, aplicando-se uma diferença de potencial de 245 V e uma corrente de 4 - 5 mA .

As diferentes frações polissacarídicas obtidas , bem como os padrões empregados nas dosagens colorimétricas , foram secas em aparelho de secagem a vácuo (ABDERHALDEN) .

As evaporações das soluções contendo os alditóis acetatos foram executadas em evaporador a vácuo e sob pressão reduzida, à temperatura de no máximo  $40^{\circ}C$  , sendo que os produtos de metanólise do polissacarídeo metilado, bem como os derivados / parcialmente metilados na forma de alditóis acetilados foram / concentrados a  $20-25^{\circ}C$  .

As hidrólises totais das diferentes frações polissacáridicas foram feitas com ácido trifluoracético (TFA) 0,5 N a 100°C durante 5 horas em tubo de vidro selado. O excesso de TFA foi eliminado após a hidrólise por simples evaporação a vácuo e, novas porções de água foram adicionadas ao material hidrolisado e removidas no evaporador, a fim de eliminar os vestígios de ácido do meio.

As hidrólises totais com ácido sulfúrico 1 N foram realizadas durante 5 horas a 100°C, em tubo de vidro selado. A neutralização foi feita com carbonato de bário e o hidrolisado foi em seguida centrifugado, filtrado e deionizado em resina trocadora de íons (Dowex 50W-X8, 200 - 400 mesh, forma H<sup>+</sup>).

As reduções foram realizadas com boroidreto de sódio, sendo o excesso de boroidreto destruído com ácido acético a 50%. Após a remoção dos cátions com resina Dowex 50W-X8, 200 - 400 mesh, forma H<sup>+</sup>, os íons borato foram eliminados através de sucessivos tratamentos com metanol e evaporações simultâneas.

A acetilação dos açúcares <sup>79</sup>, após conversão em alditóis, foi realizada com anidrido acético - piridina (1 : 1, v/v), durante 12 horas à temperatura ambiente. Os alditóis acetatos foram extraídos com clorofórmio (fase inferior), após eliminação do excesso de piridina através de lavagens com ácido sulfúrico 0,1 M (fase superior). Os alditóis acetatos (solução clorofórmica) foram concentrados em evaporador a vácuo e analisados cromatograficamente (p.c., t.l.c. e g.l.c.)

## 2.2. Material

O caule seco da Mimosa bracaatinga Hoehne foi gentilmente cedido pelo Departamento de Engenharia e Tecnologia da Madeira, da Faculdade de Florestas da Universidade Federal do Paraná. Após a remoção da casca e da medula (que foram desprezadas), o caule foi cortado em pequenos pedaços, os quais foram moídos em moinho WILEY, empregando-se uma peneira de 60 mesh (Esquema I). Os pigmentos, os lipídeos e os açúcares livres foram extraídos exaustivamente em SOXHLET, utilizando-se como solvente uma mistura de benzeno-etanol (2:1, v/v)<sup>80</sup>. O extrato foi desprezado, e o resíduo após secagem em capela foi submetido ao processo de extração com água (3 litros) a 80-85°C durante 2 horas, filtrado a vácuo com funil de BUCHNER usando-se como filtro tecido de algodão. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Em seguida foi realizada uma extração com solução de oxalato de amônia-ácido oxálico a 0,5%. Estas extrações visavam eliminar substâncias pécticas.

### 2.3. Obtenção das hemiceluloses do caule de Mimosa bracaatinga ( Esquema I )

O resíduo seco (400,0 g), após eliminação das substâncias pécticas, foi submetido à extração com hidróxido de sódio a 8%, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo contínuo) durante 16 horas à temperatura ambiente, em agitador, conforme WHISTLER/ & FEATHER<sup>81</sup>, usando-se boroidreto de sódio como protetor das pontas redutoras dos polímeros. A seguir, filtrou-se através de tecido de algodão (Cf. 2.2.), lavando-se o resíduo exaustivamente com água destilada. O extrato alcalino e os líquidos de lavagens foram reunidos e neutralizados com ácido acético a

50 % , até pH 5,0 , quando se obteve por precipitação a fração de hemicelulose A (designada A8), enquanto a fração de hemicelulose B (designada B8) permanecia na solução ácida <sup>9</sup>. As duas frações hemicelulósicas foram melhor separadas por centrifugação, após deixar a solução (pH 5,0) em repouso por 24 horas a 4°C. O sobrenadante foi concentrado em evaporador até um volume de aproximadamente 600 ml e tratado com etanol (3 volumes). Obteve-se por centrifugação um precipitado rico em hemicelulose B8. As frações hemicelulósicas A8 e B8 foram lavadas com álcool etílico a 95% e , também, com acetona (3 vezes), sendo a seguir secas sob pressão reduzida em aparelho de ABDERHALDEN / contendo pentóxido de fósforo. A fração de hemicelulose A8, de coloração esbranquiçada pesou 38,0 g , e a de hemicelulose B8, de coloração marron-escuro pesou 4,7 g. O resíduo das extrações anteriormente descritas foi submetido a uma nova extração alcalina com hidróxido de sódio a 24% e, usando-se a mesma sequência empregada na obtenção das frações A8 e B8 , obteve -se as frações hemicelulósicas A<sup>24</sup> e B<sup>24</sup>, com rendimento de 12,8 g e 3,7 g , respectivamente .

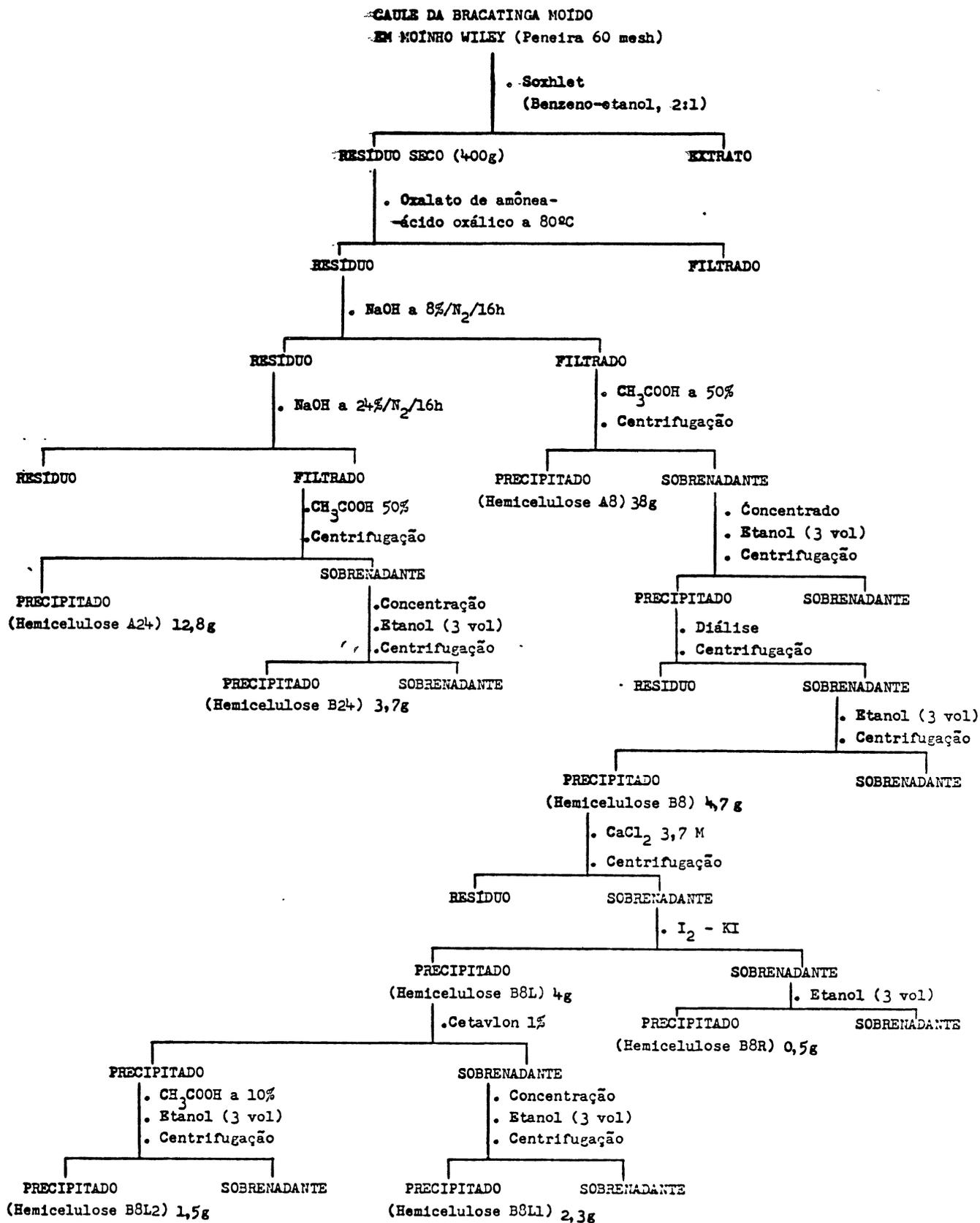
#### 2.4. Fracionamento da hemicelulose B8 (Esquema I)

A fração B8 (4,7 g) , após diálise, foi dissolvida em cloreto de cálcio 3,7 M (470 ml). Em seguida foi adicionada / sob agitação constante , uma solução de iodo-iodeto de potássio (a 3 e 4%, respectivamente), na proporção de 10 ml de solução/ de iodo-iodeto para 100ml de solução polissacarídica em cloreto de cálcio, conforme GAILLARD <sup>82,83</sup>. Após este tratamento formou-se um precipitado de coloração azul-escuro que foi recuperado por centrifugação. O precipitado, que continha a fração linear (ou relativamente linear) e designada B8L, foi lavado 3

vezes com soluções de cloreto de cálcio e iodo-iodeto nas mesmas proporções já descritas acima. Ao sobrenadante, juntamente com os líquidos de lavagens, foi adicionado uma solução saturada de tiosulfato de sódio para remover o excesso de iodo. Após diálise contra água corrente a solução foi concentrada (para metade do volume) e tratada com 3 volumes de etanol, obtendo-se assim um precipitado que foi recuperado por centrifugação. Este resíduo / foi lavado com álcool e acetona e seco em aparelho de ABDERHALDEN . Esta fração foi denominada de B8R (fração ramificada) a qual apresentou um rendimento de 0,5 g. A fração B8L complexada com iodo foi, também, tratada com solução saturada de tiosulfato de sódio a fim de eliminar o iodo remanescente, após suspensão/ em água aquecida. A suspensão polissacarídica, depois de dialisada contra água corrente, foi tratada com etanol (3 volumes) e centrifugada, desprezando-se o sobrenadante. A fração B8L depois de seca rendeu 4,0 g. Esta fração foi solubilizada em água (100 ml) , adicionando-se-lhe, lentamente, sob agitação constante, uma solução aquosa de brometo de cetiltrimetilamônio a 1% (cetavlon) até que não mais houvesse formação de precipitado <sup>84,85</sup>. O complexo polissacarídeo-detergente foi coletado por centrifugação , lavado com água para eliminar o excesso de base quaternária e, a seguir tratado com ácido acético a 10% (100ml). O polímero livre de base quaternária foi tratado com etanol, rendendo depois de seco 1,5 g. Este polímero, de coloração marron-escuro, foi designado pela sigla B8L2. O sobrenadante da solução contendo cetavlon foi dialisado e em seguida tratado com etanol, apresentando um precipitado branco , com um rendimento de 2,3 g após seco . Essa fração, designada B8L1, apresentou rotação óptica específica -63,3

Amostras das frações A8, A24, B24, B8R, B8L1 e B8L2 (5,0 mg ) foram totalmente hidrolisadas e os resultados das análises de g. l.c. (alditóis acetatos, coluna b), bem como o açúcar total se encontram na Tab. I .

## ESQUEMA I



## 2.5. Cromatografia em coluna de Sephadex

Amostras das frações B8L1 e B8L2 (10,0 mg) foram solubilizadas em água (0,5 ml) e, aplicadas no topo de uma coluna de Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala), previamente calibrada com Blue dextran. O leito do gel era de 50 x 2 cm. Os eluatos aquosos foram coletados em aparelho BECKMANN, à temperatura ambiente, com velocidade de escoamento de , aproximadamente, 30 ml por hora . O teor em carboidrato total determinado em cada fração cromatográfica de 0,5 ml, foi executado conforme DUBOIS et al. <sup>74</sup> A cromatografia em peneira molecular teve por finalidade precípua, verificar a homogeneidade das amostras em estudo. (Figura 2).

## 2.6. Oxidação pelo periodato e degradação tipo Smith

Uma alíquota da fração B8L1 (60,0 mg) foi oxidada com m-periodato de sódio 0,05 M (50,0 ml) na ausência de luz, e à temperatura de 4°C <sup>86,87</sup>. Uma solução de m-periodato foi usada como "branco" . A diferentes intervalos de tempo foram retiradas alíquotas (1,0 ml) da mistura oxidante e do branco, para a determinação do consumo de periodato pelo método de FLEURY & LANGE <sup>88</sup> . A alíquota foi tratada com excesso de bicarbonato de sódio e, também, com um excesso de arsenito de sódio 0,05 M (padrão primário) A reação foi catalisada por iodeto de potássio a 20% em água. Após agitar e deixar 15 minutos no escuro, o excesso de arsenito/ foi titulado em cada alíquota com solução de iodo recém padronizada, usando-se amido a 1% como indicador. A molaridade M da solução oxidante, foi calculada empregando-se a seguinte fórmula:

$$M = \frac{(\text{ml da solução de arsenito} - \text{ml da solução de iodo}) \times N^*}{2 \times (\text{ml da alíquota titulada})}$$

N\* = normalidade da solução de iodo .

Pela molaridade da solução oxidante, calculou-se o consumo em moles de periodato por mol de pentose anidra, em cada alíquota :

$$\frac{\text{moles periodato}}{\text{mol pentose anidra}} = \frac{\text{vol. total da solução oxidante (Mo - Mt) W}}{\text{g de carboidrato na sol. oxidante total} \times 1000}$$

onde :

Mo = molaridade do branco

Mt = molaridade da solução oxidante

W = 132 , que é o peso molecular de uma pentose anidra .

Observação: O teor em ácido urônico na fração em estudo foi bastante baixo, não alterando significativamente esse valor .

O valor do consumo de periodato foi obtido pela extrapolação da curva para o tempo zero (Figura 3) .

O ácido fórmico liberado na solução oxidante foi determinado por titulação com hidróxido de sódio 0,01 N, sob atmosfera de nitrogênio, usando-se fenolftaleína como indicador, através a seguinte fórmula :

$$N_{AF} = \frac{\text{ml de NaOH} \times N \times \text{volume da solução oxidante} \times 132}{\text{ml da amostra} \times \text{g de polissacarídeo} \times 1000}$$

N = normalidade do hidróxido de sódio

Tão logo a solução oxidante estabilizou quanto ao consumo de periodato, foi a ela adicionado etilenoglicol para destruir o excesso de periodato de sódio. A solução foi dialisada contra água corrente por 24 horas, adicionando-se a seguir, boroidreto de sódio (150 mg), deixando-se processar a redução do polialdeído a poliálcool durante 24 horas, à temperatura ambiente. O excesso de boroidreto foi decomposto por ácido acético a 50%, e a solução polialcoólica foi, novamente dialisada. Hidrolisou-se,

neutralizou-se (métodos gerais) e reduziu-se com boroidreto de sódio (100,0 mg) à temperatura ambiente. Após deionização, os alditóis resultantes foram acetilados e analisados por g.l.c. (métodos gerais) .

## 2.7. Determinação do grau de polimerização das frações B8L1 e B8L2

As frações B8L1 e B8L2 foram solubilizadas em água (2 ml) e reduzidas com boroidreto de sódio, durante 48 horas, à temperatura ambiente. O excesso de agente redutor foi eliminado com ácido acético 3 N até pH 6 . Adicionou-se a cada fração 1,0 ml de periodato de sódio 0,5 M , completando-se o volume para 5,0 ml com água destilada (ficando assim o periodato numa concentração final 0,1 M). Em paralelo, fez-se um branco e, como padrão de referência, usou-se uma solução de eritritol 0,002 M. As misturas/oxidantes foram deixadas no escuro, à temperatura ambiente, agitando-se-as ocasionalmente. Após 48 horas, alíquotas de 4,0 ml foram transferidas para tubos de ensaio, sendo o excesso de periodato, bem como o iodato, precipitados com uma solução saturada de acetato de chumbo (6,0 ml em cada tubo). Em seguida, foram introduzidos nos tubos de ensaio, tubos de diálise contendo 10,0 ml de água destilada. A diálise foi processada por 48 horas nos tubos vedados (para evitar evaporação), agitando-se de vez em quando. Alíquotas de 1,0 ml foram removidas do interior dos tubos de diálise, adicionando-se a elas 10,0 ml de ácido cromotrópico <sup>89,90</sup>. O precipitado de sulfato de chumbo formado foi separado por centrifugação , e os sobrenadantes transferidos para tubos de vidro e vedados, deixando-se durante 30 minutos em banho-maria fervente, na ausência de luz. Resfriou-se-os à temperatura ambiente, e as absorbâncias foram lidas a 570 nm, contra o branco (executado nas mesmas condições) .

O grau médio de polimerização de cada fração, foi calculado pela fórmula <sup>89</sup> :

$$\overline{DP}_n = \frac{Y (30 \cdot n)}{132 \cdot X}$$

onde :

Y = g de carboidrato total

X = g de formaldeído fornecido pelo padrão (eritritol)

n = número de moles de formaldeído liberado por grupo terminal redutor (no caso, n = 1 )

30 = peso molecular do formaldeído

132 = peso molecular de uma pentose anidra

## 2.8. Processos de metilação da fração B8L1

### 2.8.1. Processo de HAWORTH <sup>91,92,93</sup>

A fração B8L1 (30,0 mg) foi submetida, primeiramente, ao método de metilação de Haworth, adicionando-se a ela, vagarosamente, sob constante agitação, 4,0 ml de hidróxido de sódio a 40% e 2,0 ml de sulfato de dimetila, alternadamente, isto é , duas gotas do álcali e uma gota da substância metilante, respectivamente, durante 6 horas à temperatura ambiente. A seguir, a solução foi neutralizada com ácido sulfúrico 6 N, em banho de gelo. Dialisou-se, concentrou-se até secura e deixou-se no aparelho de ABDERHALDEN durante uma noite. O mesmo processo de metilação/ foi repetido sobre a fração B8L1 .

### 2.8.2. Processo de HAKOMORI <sup>94,95</sup>

A fração B8L1 metilada conforme Haworth (2 vezes), depois de seca sob pressão reduzida em aparelho de ABDERHALDEN contendo pentóxido de fósforo , foi solubilizada em 5,0 ml de dimetil-sulfóxido seco com "molecular sieves" .

Agitando-se continuamente, sob atmosfera de nitrogênio, juntou-se à solução 0,002 equivalente do ânion metilsulfinil, esperando-se reagir durante 4 horas para completa formação do alcóxido. Para a reação de metilação, a solução de alcóxido de polissacarídeo foi colocada em banho de água a 20°C. Iodeto de metila (0,4ml) foi gotejado à solução em agitação, numa velocidade tal a não permitir que houvesse elevação da temperatura acima de 25°C. (Finda a adição do iodeto de metila, a solução tornou-se clara, diminuindo visivelmente a viscosidade, indicando que a reação havia se completado). A solução de polissacarídeo metilado foi dialisada e, em seguida, extraída com clorofórmio em funil de separação. O extrato clorofórmico foi evaporado até secura à temperatura ambiente, sob pressão reduzida. A espectroscopia no infra-vermelho do polissacarídeo metilado não mostrou absorção para grupos OH.

### 2.9. Metanólise da fração B8L1 metilada

Uma alíquota (5,0 mg) do polissacarídeo metilado (método de Haworth e de Hakomori) foi tratada com metanol contendo 3% de cloreto de hidrogênio <sup>91</sup> (1,0 ml), durante 6 horas a 100°C em tubo selado. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente, neutralizando-se com carbonato de prata, filtrando-se em funil de placa porosa F, sendo o resíduo da placa lavado várias vezes com pequenos volumes de metanol. Concentrou-se o filtrado em evaporador, sob pressão reduzida, à temperatura ambiente, e analisou-se a mistura de 0-metilglicosídeos por g.l.c. <sup>68</sup> (coluna a), usando-se clorofórmio como solvente. Os tempos de retenção relativa T dos produtos metanolisados são dados na Tabela II.

### 2.10. Obtenção de alditóis acetatos parcialmente metilados

A fração B8L1 metilada (5,0 mg) foi tratada com ácido fórmico a 90% (5,0 ml) durante uma hora a 100°C. A solução foi concentrada até secura, e o resíduo hidrolisado com ácido sulfúrico 0,25 M (5,0 ml) a 100°C por 16 horas. Após os devidos tratamentos (métodos gerais), o hidrolisado foi convertido em derivados parcialmente metilados na forma de alditóis acetilados <sup>70</sup>, e analisado por g.l.c. (colunas b e c). Os resultados estão na Tabela III.

### 2.11. Degradação do polissacarídeo acetilado

A fração B8L1 foi degradada de acordo com o procedimento de LINDBERG et al. <sup>96</sup> O polissacarídeo (50,0 mg) foi dissolvido em formamida (10,0 ml), adicionando-se a seguir, piridina-anidrido acético (1:1, 5,0 ml). A solução de polissacarídeo foi deixada em reação de acetilação durante 15 horas, à temperatura ambiente e, então evaporada até secura. O resíduo foi dialisado contra água corrente durante uma noite, e evaporado sob pressão reduzida, à temperatura de cerca de 30°C. O polissacarídeo acetilado foi solubilizado em anidrido acético (8,0 ml), adicionando-se trietilamina (7,0 ml), deixando-se 2,5 horas em banho-maria fervente. Os reagentes foram evaporados, e o resíduo foi tratado em ácido acético a 90% (5,0 ml) durante 2 horas a 100°C. Baixada a temperatura da solução, colocou-se-a para dialisar contra água corrente. Evaporou-se novamente (para diminuir o volume), dosando-se uma alíquota da solução pelo teste de BITTER & MUIR <sup>75</sup>, que deu resultado negativo quanto à presença de ácido urônico. A seguir, o polissacarídeo modificado foi metilado duas vezes pelo método de HAKOMORI <sup>94</sup>. Os açúcares metilados foram analisados por g.l.c., como o-metilglicosídeos <sup>71</sup> na coluna a (Tabela II), e como alditóis acetilados <sup>73</sup> nas colunas b e c (Tabela III).

## 2.12. Isolamento e análise de um ácido aldobiurônico após hidrólise ácida parcial

A fração B8L1 (400,0 mg) foi tratada com ácido sulfúrico 0,5 M (5,0 ml) durante 5 horas à 100°C. Após neutralização e deionização (métodos gerais), o hidrolisado foi concentrado até a obtenção de um resíduo xaroposo que foi aplicado numa coluna/ de resina AGL-X10 forma  $\text{AcO}^-$  (200-400 mesh), percolando-se água a fim de eluir os açúcares neutros. Os componentes acídicos foram eluídos com ácido acético a 30%, sendo o eluato concentrado em evaporador. A cromatografia em papel (solvente b) do resíduo revelou componentes tendo  $R_{\text{xil}}$  1,35, 0,68 e 0,20. O ácido aldobiurônico ( $R_{\text{xil}}$  0,68) foi posteriormente purificado, através de cromatografia em papel (Whatman 3MM), usando-se o solvente b. A polarimetria do ácido aldobiurônico (em água) deu uma rotação específica igual a + 78. Uma alíquota (cerca de 2,0 mg) do ácido aldobiurônico foi convertida no metil-éster metilglicosídeo, através tratamento com cloreto de hidrogênio metanólico a 3% (2,0 ml), durante 8 horas a 100°C, e então reduzido com boroidreto de sódio. Após deionização, o produto foi hidrolisado com ácido sulfúrico (métodos gerais). G.l.c. do hidrolisado na forma de alditóis acetilados (coluna b), revelou proporções equimolares de 4-O-metil-D-glucose e D-xilose. O ácido aldobiurônico (cerca de 5,0 mg) foi metilado pelo processo de HAKOMORI<sup>94</sup>, e o dissacarídeo metilado foi carboxi-reduzido através do tratamento com boroidreto de sódio em metanol, e a seguir, permetilado, sendo o produto extraído com clorofórmio e hidrolisado (métodos gerais). Os açúcares metilados resultantes foram analisados como alditóis acetilados<sup>70</sup>. G.l.c. (colunas b e c) deu proporções equimolares de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucose e 3,4-di-O-metil-D-xilose.

R E S U L T A D O S

E

D I S C U S S Ã O

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Extração das hemiceluloses

O caule da Mimosa bracaatinga (Esquema I) foi moído e extraído exhaustivamente com benzeno-etanol (2:1), para remover pigmentos, lipídeos e açúcares livres. O resíduo foi, a seguir, tratado com oxalato de amônia-ácido oxálico 0,5 % , a quente, com a finalidade de eliminar substâncias pécticas. Tratou-se o resíduo com uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 8 % , empregando-se boroidreto de sódio como protetor da ponta redutora dos polímeros, sob atmosfera de nitrogênio e à temperatura ambiente, conforme WHISTLER & FEATHER <sup>81</sup>, obtendo-se assim um extrato alcalino de hemiceluloses, que foi separado em duas frações ricas em hemiceluloses e designadas por hemiceluloses A8 e B8 . Posterior extração do resíduo com hidróxido de sódio a 24% forneceu as hemiceluloses A24 e B24. Os dados analíticos das frações polissacáridicas são apresentados na Tabela I .

A opção pelas extrações com hidróxido de sódio foi devida ao fato de que as hemiceluloses (80-95 %), são extratáveis diretamente em meio alcalino sem delignificação prévia <sup>4</sup>, pois nos processos de remoção da lignina, além de haver perda de polissacarídeos (10-20 %), os xilanos são passíveis de oxidação nos pontos de ligação covalente com a lignina; por outro lado, com ou sem delignificação prévia sempre há uma parcela de hemicelulose que continua em mistura com a  $\alpha$ -celulose <sup>94</sup>. Portanto, os rendimentos apresentados na Tabela I são relativos somente aos produtos extraídos com solução alcalina. Nas extrações alcalinas à temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio, protegendo -

-se as pontas redutoras do polissacarídeo com boroidreto de sódio, as transformações químicas nas hemiceluloses são reduzidas/ao mínimo, embora ocorra deesterificação dos polímeros parcialmente acetilados e dos prováveis ésteres carboxílicos<sup>4</sup>. OLIVEIRA<sup>66</sup> encontrou um teor de 20-22 % em grupos O-acetil no material hemicelulósico extraído com dimetil-sulfóxido da hemicelulose do caule da Mimosa bracaatinga Hoehne .

Os espectros no infra-vermelho, de amostras das diferentes frações polissacarídicas extraídas com álcali, não mostraram absorção característica de grupos O-acetil ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ), nem de grupos carbonila do éster acetato ( $1740\text{ cm}^{-1}$ ); os espectros de ressonância nuclear magnética ( $\text{D}_2\text{O}$ ) da fração B8 também não mostraram absorção característica de grupos O-acetil (T 7,8), indicando que o polissacarídeo se encontrava completamente desacetilado .

As hemiceluloses A8 e A24, insolúveis em água, foram as frações mais abundantes extraídas com NaOH, apresentando composições similares à correspondente hemicelulose A isolada do caule da Mimosa bracaatinga com NaOH a 6%<sup>67</sup> .

A fração B24 , constituída por unidades de D-manose (60%), D-glucose (19,7%), D-xilose (13,3%), ácido urônico (5,4%) , L-arabinose e L-ramnose (vestígios), será analisada com maior profundidade oportunamente .

Os teores em nitrogênio das diferentes frações polissacarídicas foram desprezíveis.

### 3.2. Fracionamento da hemicelulose B8

O extrato hemicelulósico B8 (Esquema I) foi subsequentemente fracionado em frações polissacarídicas linear (B8L) e ramificada (B8R), por interação com iodo, de acordo com o procedimento de GAILLARD<sup>10</sup> e GAILLARD et al.<sup>97</sup>. Esses autores demonstraram a capacidade de formação de complexos de coloração azul-es

curo de muitos polissacarídeos lineares solubilizados em cloreto de cálcio e iodo, como é o caso da amilose<sup>98</sup>. Entretanto, polissacarídeos levemente ramificados podem, também, formar tais complexos. A complexação independe dos resíduos de açúcar componentes da cadeia principal do polissacarídeo, sendo imprescindível, todavia, que todas as ligações glicosídicas, ou quase todas, sejam do tipo (1→4) entre os resíduos constituintes do esqueleto do polímero e, que se houver ramificações, estas ocorram em pequeno grau<sup>97</sup>. Polissacarídeos formados por resíduos de D-xilose, D-glucose e D-manose reagem positivamente com iodo; é interessante lembrar que estas três unidades de açúcar ostentam configuração semelhante em torno do carbono número quatro (C-4), o que parece contribuir com grande relevância para que o complexo/se forme. Assim, mesmo que um polissacarídeo possua outros tipos de ligações glicosídicas, a formação de um precipitado pela adição de iodo, é um forte indício da presença de seqüências de enlaces do tipo (1→4) na cadeia principal. Além disso, para haver uma reação positiva com iodo, há necessidade de pelo menos 6 unidades de açúcar interligados seqüencialmente, através de ligações glicosídicas do referido tipo, seja na cadeia principal, ou numa ramificação<sup>97</sup>.

A variação da absorbância a 610 nm em soluções de concentrações crescentes de polissacarídeo, mantendo-se fixas as concentrações dos outros reagentes, obedece à lei de Lambert-Beer, dentro de um determinado limite de concentração do polímero. A representação gráfica da variação da densidade ótica a 610 nm, com crescentes concentrações de polissacarídeo em soluções de títulos fixos de cloreto de cálcio e iodo-iodeto de potássio, indica que a hemicelulose B8L (solúvel em água) é mais ramificada do que a hemicelulose A8 (insolúvel em água), como pode ser visto na Figura 1.

A fração B8R, obtida em menor rendimento (Tabela I), é provavelmente, um arabinoglucoxilano muito ramificado. Esta fração deu também consideráveis proporções de ácido urônico e ramnose; contudo, carece ser demonstrado se estas unidades de açúcar, são partes integrantes da molécula ou não.

A fração B8L foi, posteriormente, submetida à complexação com Cetavlon<sup>84,85</sup>, obtendo-se um precipitado de coloração escura, recuperado por centrifugação, que foi designado por B8L2. A solução clara, sobrenadante à complexação com Cetavlon, após uma purificação através diálise, e precipitação com etanol, deu um polímero branco, designado por fração B8L1. Estas frações são essencialmente xilanos solúveis em água, apresentando similar composição em monossacarídeos (Tabela I)

A fração B8L1 purificada deu uma única banda na eletroforese em acetato de celulose, e um único pico simétrico na cromatografia em Sephadex G-75 (Figura 2), o mesmo ocorrendo com a fração B8L2.

A fração B8L1 apresentou  $[\alpha]_D^{25} = -63$ , semelhante aos valores encontrados por CORREA et al.<sup>64</sup>, GOMES<sup>65</sup>, OLIVEIRA<sup>66</sup> e GEBARA<sup>67</sup> na hemicelulose A de Mimosa bracaatinga, indicando este valor de rotação específica, predominância de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  no polímero. A polarimetria da fração B8L2 não foi possível devido à sua forte pigmentação escura.

### 3.3. Grau médio de polimerização

O grau médio de polimerização das frações polissacarídicas B8L1 e B8L2 (Cf. 2.7.), pelo método envolvendo a redução do resíduo terminal a alditol, seguido da oxidação com periodato e a determinação do formaldeído liberado<sup>89,90</sup>, foi de 43 e 82, respectivamente, enquanto que o grau médio de polimerização da he

micelulose A do caule de M. bracaatinga, conforme CORREA et al.<sup>64</sup> foi de 150 .

No fracionamento com Cetavlon (Cf. 2.4.), que é um processo de separação dos polissacarídeos ácidos dos neutros, o precipitado de polímeros acídicos é formado em poucos minutos, logo após a adição da solução de Cetavlon. No entanto, segundo SCOTT<sup>85</sup> os polissacarídeos de baixos pesos-moleculares com baixa densidade de carga, às vezes necessitam ser deixados uma noite para que ocorra total fracionamento. Esse detalhe de técnica não foi observado no presente trabalho por ocasião do fracionamento da fração B8L com o referido sal de amônia quaternário. Portanto, o valor do grau médio de polimerização talvez possa explicar a existência de ácido urônico na fração B8L1 (Tabela I), quando apenas a fração B8L2 deveria contê-lo.

### 3.4. Isolamento e análise do ácido aldobiurônico

Um ácido aldobiurônico foi isolado após hidrólise ácida / parcial da fração B8L1 (Cf. 2.12). O valor de  $[\alpha]_D^{25}$  (+ 78) do ácido aldobiurônico indicou uma configuração  $\alpha$  para a ligação glicosídica, e os açúcares constituintes foram determinados por redução do metil éster metilglicosídeo com boroidreto de sódio, seguido por hidrólise ácida, a qual deu proporções equimolares de D-xilose e 4-O-metil-D-glucose, através g.l.c. dos alditóis/acetilados (coluna b). Metilação do ácido aldobiurônico, seguida de carboxi-redução, permetilação e hidrólise, deu 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucose e 3,4-di-O-metil-D-xilose por g.l.c. dos alditóis acetilados (colunas b e c). Por conseguinte, o ácido aldobiurônico encontrado foi o ácido 2-O-(4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-D-xilose, o mesmo encontrado em todos os xilanos do caule de madeiras duras investigadas (Cf. 1.2.) .

### 3.5. Estudos de metilação da fração B8L1 e B8L1 modificada

A metilação da fração B8L1 e B8L1 modificada (Cf. 2.11.) e análise de seus produtos de metanólise por g.l.c. (Tabela II) e como alditóis acetatos parcialmente metilados (Tabela III), mostrou o 2,3-di-O-metil-D-xilose como principal componente e, o 2,4-di-O-metil-D-xilose em menor proporção .

Estes resultados indicam que a cadeia principal do polissacarídeo consiste de unidades  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-D-xilopiranosídicas, contendo em adição unidades  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-D-xilopiranosídicas .

Os produtos de metanólise das frações B8L1 e B8L1 modificada metiladas (Tabela II), revelaram que os ácidos urônicos foram eliminados após a degradação do polímero por acetilação e tratamento com anidrido acético - trietilamina. Assim, a presença do mono-O-metil-D-xilose nos produtos de metanólise da fração B8L1 modificada metilada (Tabelas II e III) fornece evidências para a proposição de uma cadeia ramificada neste polissacarídeo. Estas evidências são ampliadas pela proporção relativamente alta de 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose e mono-O-metil-D-xilose , comparada ao grau médio de polimerização encontrado .

DUTTON & UNRAU <sup>29</sup> , através da técnica de degradação tipo Smith foram os primeiros a mostrar que xilanos de madeira dura podem , sem dúvida , ser fracamente ramificados. ZINBO & TIMELL <sup>30</sup> , demonstraram que o 4-O-metilglucurono-xilano presente na madeira do álamo (Populus tremuloides) , contém dois pontos de ramificações (nos carbonos C-3 das unidades de D-xilopiranosose ) por macromolécula média , e que as evidências anteriores nas quais se propunha uma estrutura tipicamente linear para o referido xilano foram baseadas em dados obtidos através de técnicas experimentais falhas .

O mono-0-metilxilósídeo, como mostrado na Tabela II e Figura 4, mostrou um tempo relativo de retenção (T) com valor de 6,38. Este resultado não está em concordância com aqueles obtidos por STEPHEN <sup>71</sup> (5,88 e 9,35 para 2-0-metilxilósídeo e, 5,00 e 8,12 para 3-0-metilxilósídeo : Figura 5). Portanto, o mono metil encontrado poderia ser o 4-0-metilxilósídeo, que forneceria outra evidência para a presença de ligações  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) na cadeia do xilano.

Na análise dos derivados parcialmente metilados na forma/ de acetatos de alditóis (coluna b), encontrou-se significativa área de um produto de tempo de retenção relativa (T) igual a 5,75 (Figura 7), que não foi computado aos dados obtidos (Tabela III) por não ter sido identificado como açúcar. Na cromatografia em camada delgada (t.l.c.) dos produtos de hidrólise da fração B8L1 (solvente c), foi observada uma mancha fosforescente sob luz ultravioleta (antes da revelação do cromatograma), caracterizando a presença de um composto insaturado. Este composto apresentou o mesmo tempo relativo de retenção (T) do produto isolado por ZERMIANI <sup>68</sup> da hemicelulose A do caule de Mimosa bracaatinga (Figura 6). Posteriormente, o referido produto foi identificado por REICHER & CORREA <sup>99</sup> como derivado do fenilpropano, monômero de lignina.

### 3.6. Oxidação da fração B8L1 com periodato de sódio e degradação tipo Smith (Cf. 2.6.)

A oxidação do polissacarídeo com periodato de sódio, à temperatura de 4°C, resultou num consumo de 1,05 mol de periodato por mol de pentose anidra, quando extrapolado para o tempo zero da curva (Figura 3). Este consumo de periodato é compatível com o apresentado por xilanos isolados de outras fontes.

O ácido fórmico produzido na solução oxidante foi de 0,26 mol/ mol de pentose anidra, quantidade essa relativamente alta indicando uma proporção considerável de grupos finais .

Na análise dos grupos terminais pelo processo de degradação tipo Smith, os produtos foram analisados por g.l.c. na forma de alditóis acetilados (coluna c), encontrando-se glicerol(69%) e xilitol (27%), além de outros produtos não identificados. A elevada proporção de xilitol indica que 27% das unidades de xilose da fração B8L1 foram resistentes à oxidação pelo periodato.

Desse modo, os resultados obtidos e discutidos, estão em boa concordância para a proposição de uma estrutura ramificada na referida fração polissacarídica , ou substituída no carbono C-3 .

### 3.7. Algumas estruturas possíveis para a fração polissacarídica B8L1 (Figura 8)

Baseando-se somente nos dados obtidos pela oxidação com periodato, ácido fórmico produzido na solução oxidante, e análise dos grupos terminais pelo processo de degradação tipo Smith (Cf. 2.6 e 3.6), as estruturas I, II, III e IV apresentadas na figura 8 poderiam ser propostas para a fração hemicelulósica analisada .

Todavia, as análises de metilação do ácido aldobiurônico, (isolado da fração B8L1 após hidrólise ácida parcial, cf. 2.12.) identificaram-no como sendo o 2-O-(ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-D-xilose. Esse mesmo ácido aldobiurônico foi encontrado por ZERMIANI <sup>68</sup> na hemicelulose A isolada com álcali , do caule da Mimosa bracaatinga ; aliás, todos os xilanos de madeiras duras e de madeiras moles até nos dias de hoje estudados (Cf. 1.2. e 1.3.), apresentam a unidade de ácido urônico ligada glicosidicamente ao C-2 de uma unidade de xilose da cadeia prin

cial. Assim, é improvável que a fração polissacarídica analisada ocorra na forma apresentada na estrutura I da figura 8, sendo a estrutura II mais provável do que a I sob esse aspecto.

No entanto, a proposição das estruturas I e II ficam comprometidas pelos estudos de metilação da referida fração (Tabela II), devido ao tempo relativo de retenção T com valor de 6,38 (Figura 4), apresentado pelo mono-O-metil-D-xilósídeo, que não corresponde ao 2-O-metil-D-xilósídeo, nem ao 3-O-metil-D-xilósídeo (Figura 5). Além disso, as análises dos açúcares por g.l.c. das frações B8L1 e B8L1 modificada (Cf. 2.10. e 2.11.), na forma de alditóis parcialmente metilados e parcialmente acetilados, revelaram um sensível aumento na proporção do 2,4-di-O-metil-D-xilose no polímero modificado. (Tabela III).

A estrutura III, torna-se impraticável pela análise do ácido aldobiurônico, já comentada. Além do mais, se assim fosse a estrutura, deveria ser detectado o 2-O-metil-D-xilósídeo entre os produtos de metanólise da fração B8L1 metilada (Tabela II e Figura 4), o que não ocorreu.

Portanto, com apoio nos dados obtidos e analisados, sugere-se que a estrutura IV da figura 8, seja a mais viável para a hemicelulose B (fração B8L1), sendo a mesma estrutura proposta, recentemente por ZERMIANI<sup>68</sup> como a mais provável para a hemicelulose A isolada do caule da Mimosa bracaatinga.

Assim, parece não haver diferenças estruturais significativas entre as hemiceluloses A e B (fração B8L1) do caule da referida planta, a não ser o menor grau de polimerização, bem como a maior quantidade de ramificações apresentado pela hemicelulose B, o que poderia justificar, pelo menos em parte, sua maior solubilidade em água em relação à hemicelulose A.

T A B E L A S

E

G R Á F I C O S

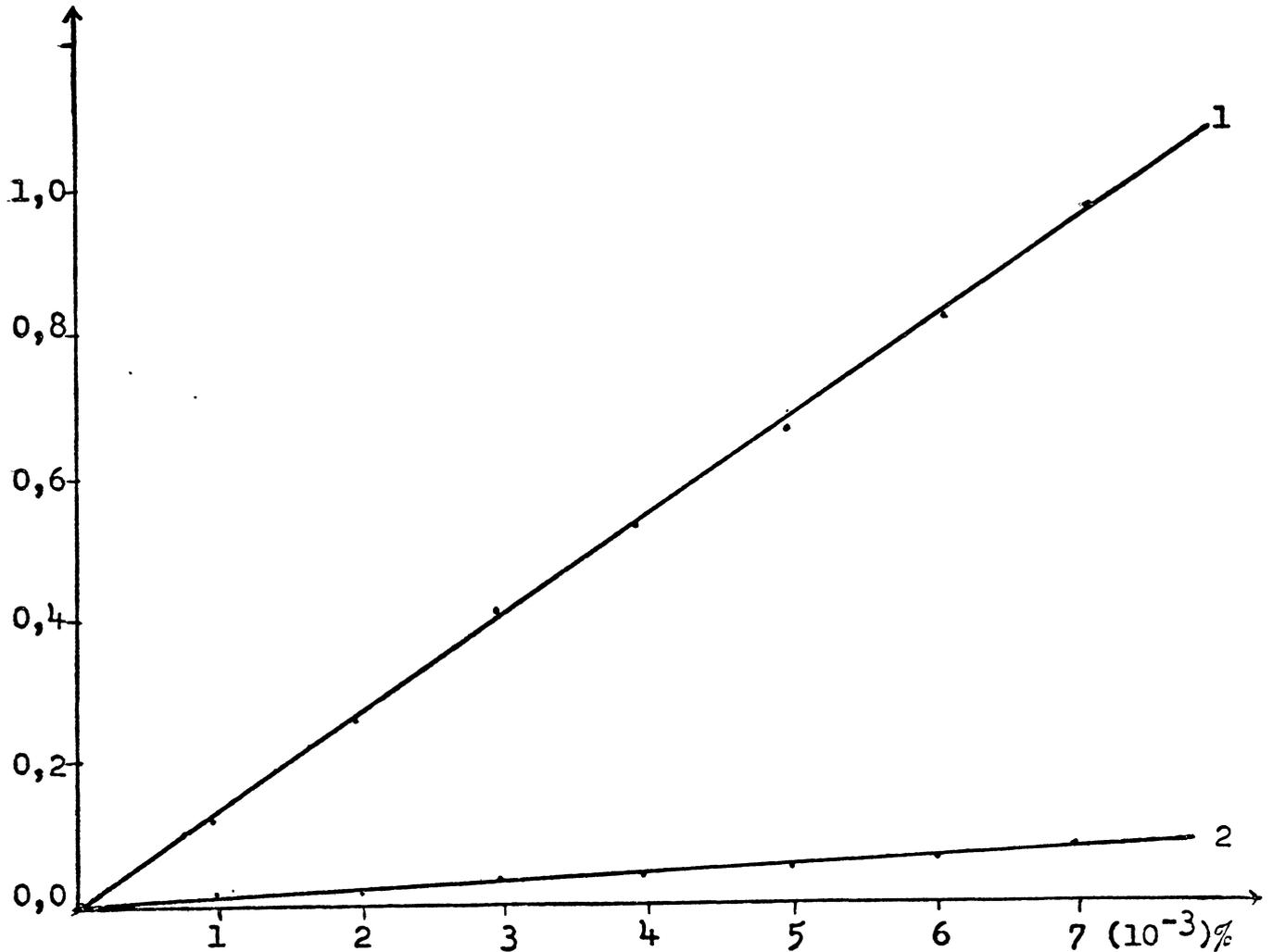


Figura 1 : Variação da densidade ótica a 610 nm com crescentes concentrações de polissacarídeo em cloreto de cálcio 3,7 M , contendo 0,05% de iodo e 0,21% de iodeto de potássio. 1) Hemicelulose A da madeira de Mimosa bracaatinga H. , insolúvel em água (CORREA et al.<sup>64</sup>) ; 2) Fração B8L , solúvel em água .

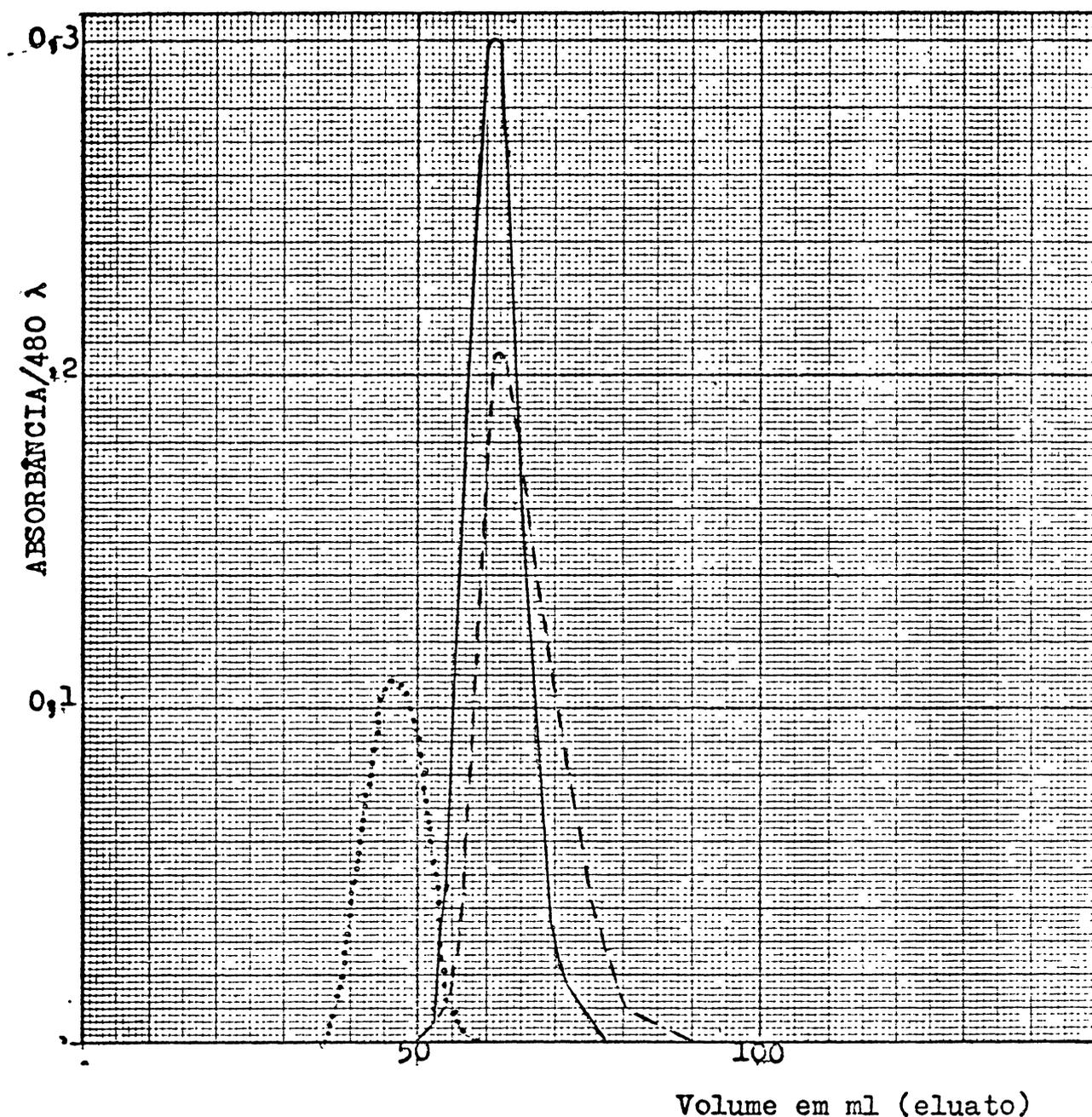


Figura 2 : Cromatografia em Sephadex G-75 das frações B8L1 (- - -) e B8L2 (—) . A coluna de gel de dextrano (50 x 2 cm) foi calibrada com Blue dextran (.....) . As frações de 0,5 ml foram coletadas em coletor de frações Beckmann , com a velocidade de escoamento de 30 ml/hora e analisadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico .

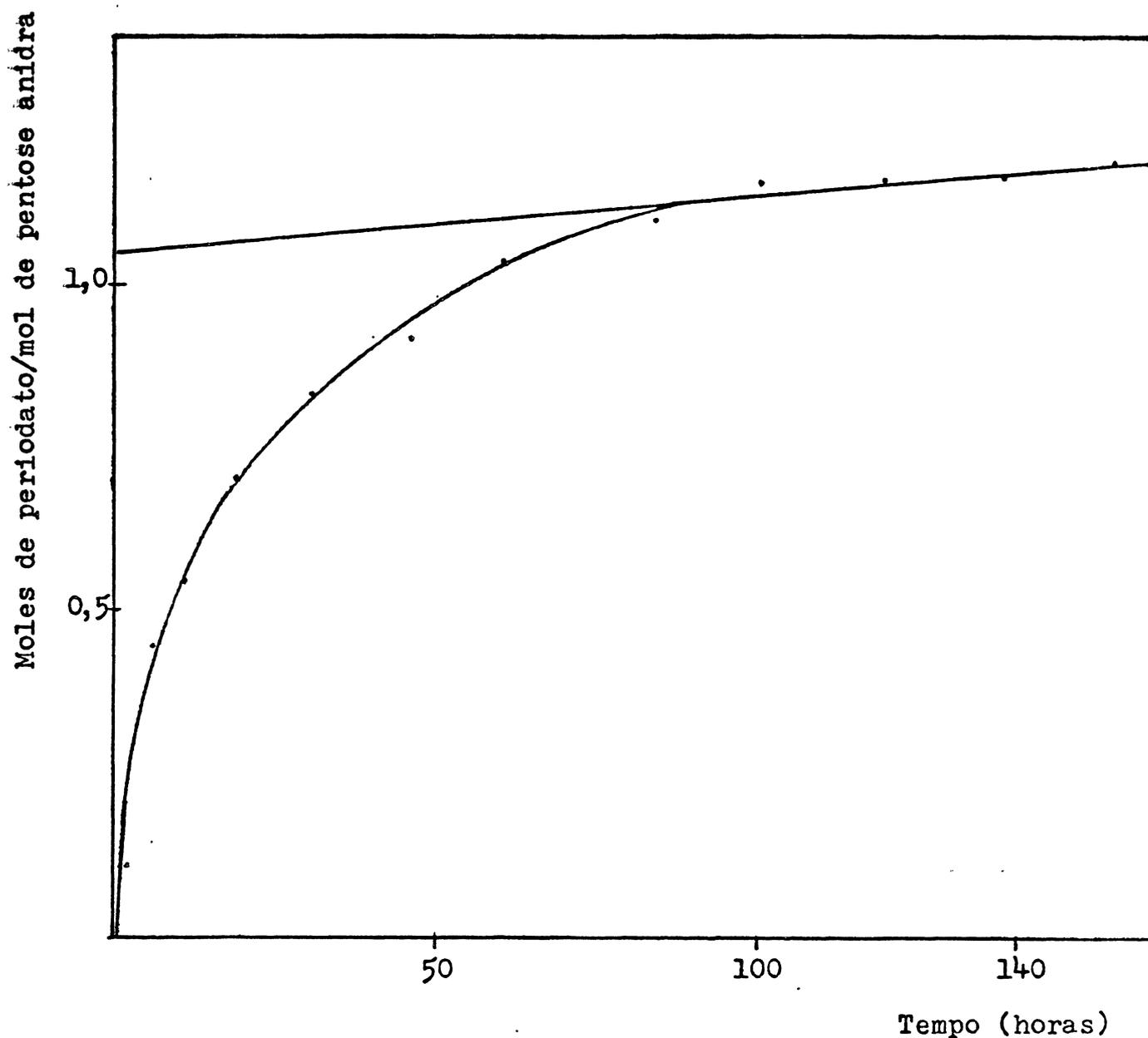


Figura 3 : Determinação do consumo de periodato da fração B8L1. Uma amostra (60,0 mg) foi oxidada com periodato de sódio 0,05 M à temperatura de 4°C. Alíquotas de 1,0 ml foram retiradas da solução oxidante a diferentes intervalos de tempo, para a determinação do consumo de periodato pelo método de titulação com iodo. Os valores obtidos foram extrapolados para o tempo zero .

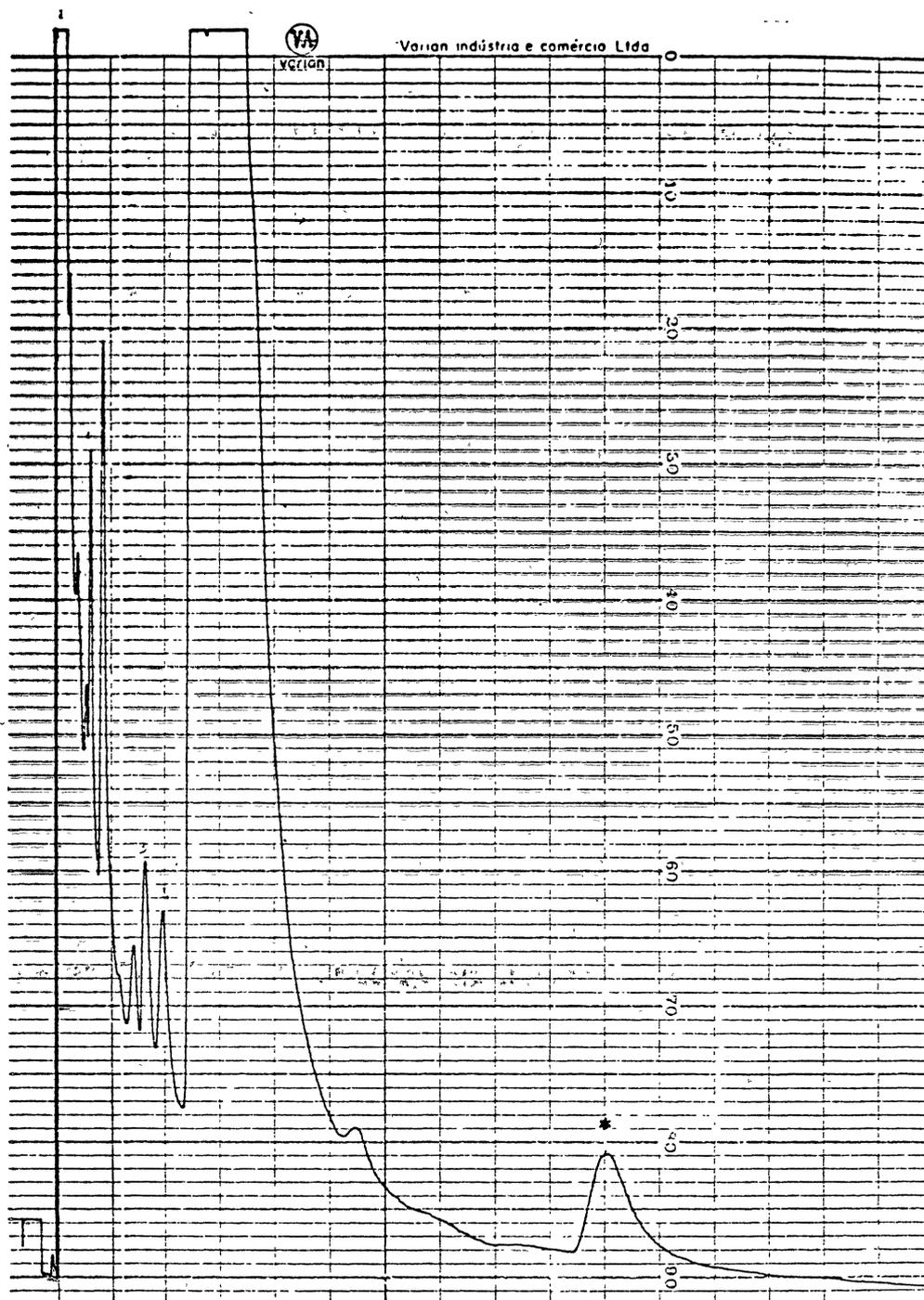


Figura 4 : Análise por g.l.c. dos produtos de metanólise da fração B811 metilada (coluna a) .

\*Mono-O-metil-D-xilosídeo : Tempo de retenção T 1 igual a 6,38 (Tab. II), calculado em relação ao 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosídeo .

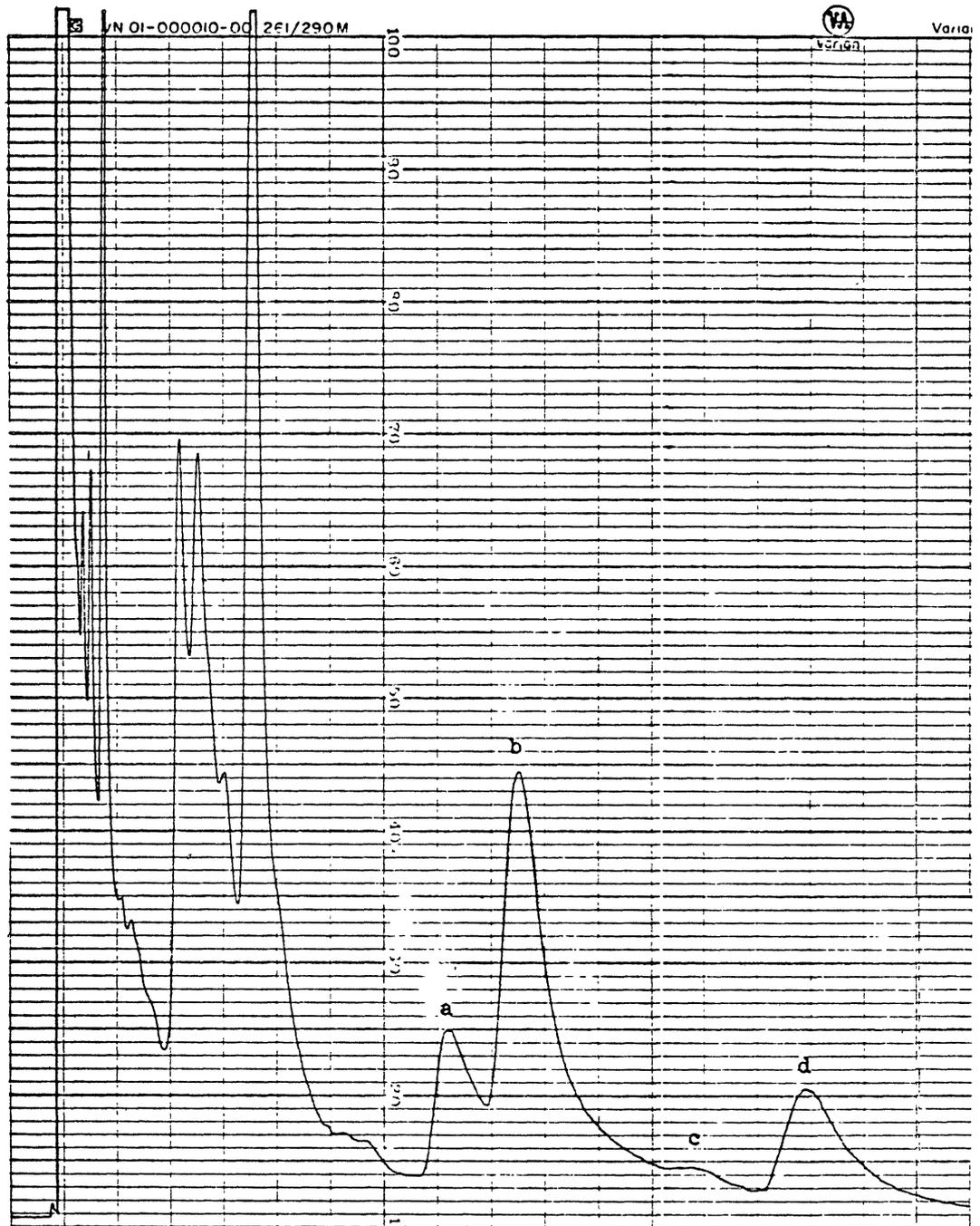


Figura 5 : Mistura de xilosídeos padrões (coluna a), relativos ao 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucosídeo (T, 1,00) .  
 Picos a e c : T igual a 5,00 e 8,10 , respectivamente.  
 Correspondem ao 3-O-metil-D-xilosídeo .  
 Picos b e d : T igual a 5,80 e 9,33 , respectivamente.  
 Correspondem ao 2-O-metil-D-xilosídeo .

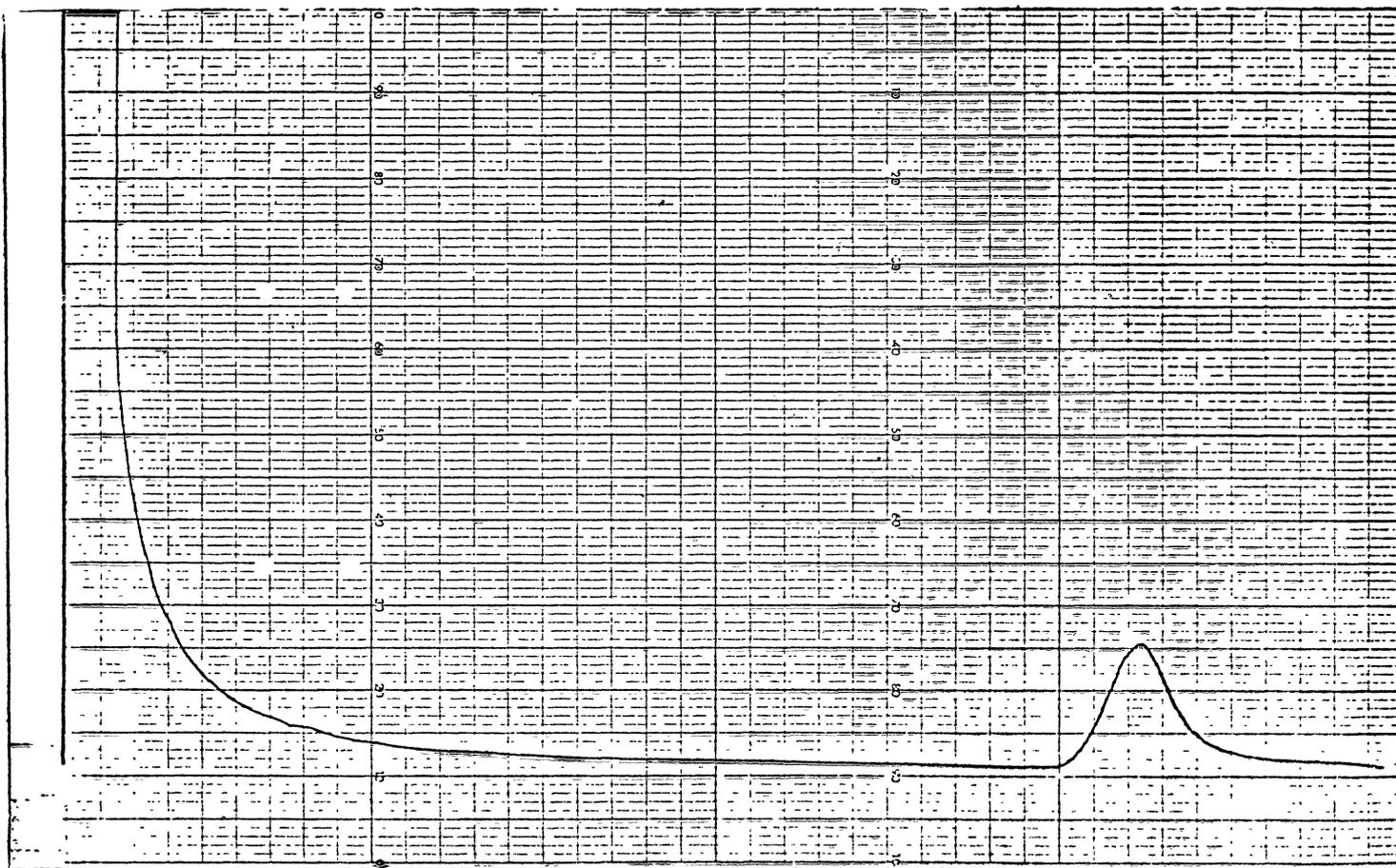


Figura 6 : Análise por g.l.c. (coluna b) do produto da hidrólise da hemicelulose A permetilada, eluído com água da coluna de carvão - celite 1:2 , reduzido e acetilado , (Cf. ZERMIANI <sup>68</sup>) .

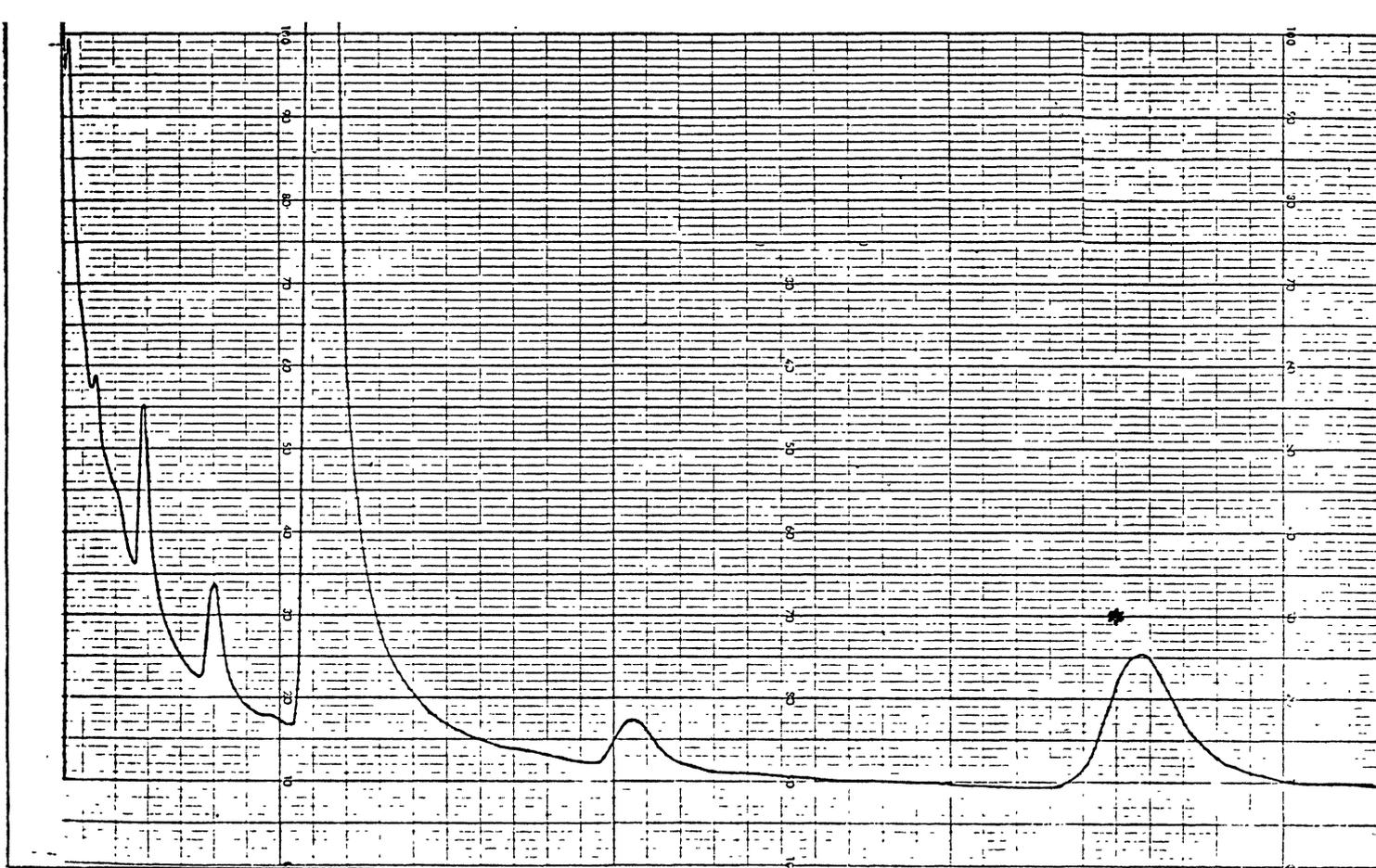


Figura 7 : Análise por g.l.c. (coluna b) dos derivados parcialmente metilados da fração B8L1 , na forma de alditóis acetilados (Cf. 3.5.)

\* Não identificado como açúcar .

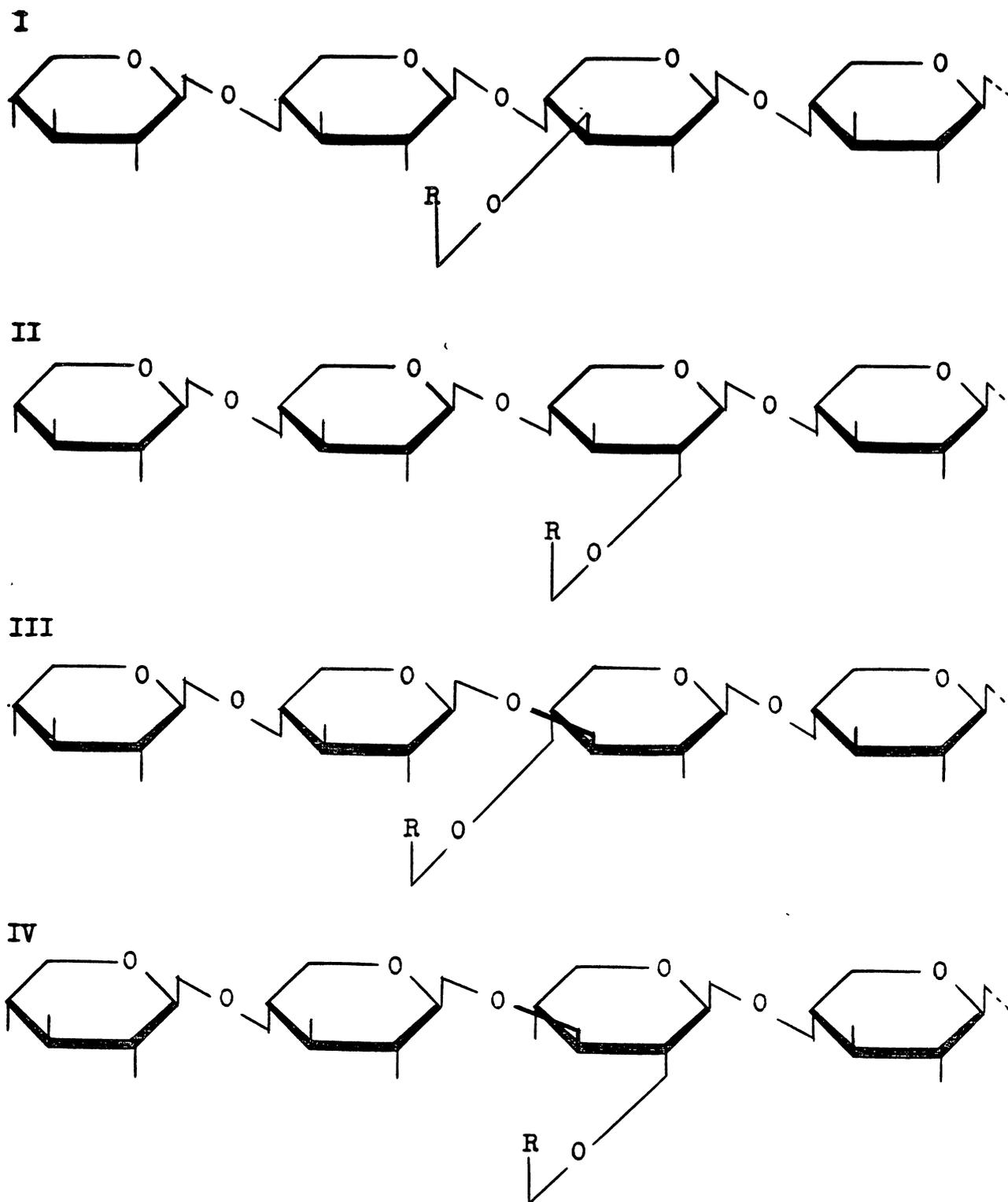


Figura 8 : Algumas estruturas possíveis para a hemicelulose B (fração B8L1) do caule da Mimosa bracaatinga H .

R = ácido urônico ,  
 xilose ou  
 monômero de lignina .

TABELA I - Análise das frações hemicelulósicas do caule de Mimosa bracaatinga Hoehne .

Frações	Rendimento* (g)	Carboidrato total <sup>a</sup> (g)	Proporção molar dos açúcares componentes <sup>b</sup>						
			L-Ram	L-Ara	D-Xil	D-Man	D-Gal	D-Glu	Ácido urônico <sup>c</sup>
A8	38,0	25,9	2,4	0,5	91,9	-	-	-	5,1
A24	12,8	8,9	1,3	0,2	88,5	0,5	-	4,2	5,2
B24	3,7	2,8	0,6	0,9	13,3	60,0	-	19,7	5,4
B8R	0,5	0,2	10,7	7,6	55,2	-	2,0	14,0	10,4
B8L1	2,3	1,4	1,8	0,6	94,2	-	-	-	3,3
B8L2	1,5	0,9	0,8	1,2	94,4	-	-	-	3,5

<sup>a</sup> Método do fenol-ácido sulfúrico

<sup>b</sup> G.l.c. dos alditóis acetilados (coluna b)

<sup>c</sup> Método do carbazol

\* A partir de 400,0 g de pó cetônico seco .

TABELA II - Produtos de metanólise da fração B8L1 original e modificada , metiladas.

<u>O</u> -metil-glicosídeos	T <sup>a</sup>		Amostras <sup>b</sup>		
			I	II	
2,3,4-tri- <u>O</u> -metil-D-xilosídeo	0,47m	0,62f	+	+	
3,4-di- <u>O</u> -metil-L-ramnosídeo	1,10		+	-	
3,5-di- <u>O</u> -metil-D-xilosídeo	1,40		+	-	
2,3-di- <u>O</u> -metil-D-xilosídeo	1,83m	2,00fr	2,26f	+++++	+++++
Ácido 2,3,4-tri- <u>O</u> -metil-D-glucurônico <sup>c</sup>	2,75m	3,80f		+	-
Mono- <u>O</u> -metil-D-xilosídeo	6,38			+	+

<sup>a</sup> Tempos de retenção relativos ao metil-2,3,4,6-tetra-O-metil- $\beta$ -D-glucosídeo (coluna a):  
f forte ; m moderado ; fr fraco

<sup>b</sup> (I) fração B8L1 metilada ; (II) fração B8L1 modificada metilada (Cf. 2.11.)

<sup>c</sup> Como metil éster-O-metilglicosídeo .

TABELA III - Análise de metilação da fração B8L1 original e modificada .

Alditóis acetilados	T <sup>a</sup>		Amostras <sup>b</sup> (moles %)	
	coluna <u>b</u>	coluna <u>c</u>	I	II
2,3,4-tri- <u>O</u> -metil-D-xilose	0,65	0,56	2,5	6,7
3,4-di- <u>O</u> -metil-L-ramnose (ou 2,3)	1,00	0,90	tr	-
3,5-di- <u>O</u> -metil-D-xilose	1,00	-	tr	-
2,4-di- <u>O</u> -metil-D-xilose	1,34	1,06	tr	3,0
2,3-di- <u>O</u> -metil-D-xilose	1,54	1,20	85,0	80,0
Mono- <u>O</u> -metil-D-xilose	3,00	2,15	12,5	10,3

<sup>a</sup> Tempos de retenção relativos ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

<sup>b</sup> (I) Fração B8L1 metilada ; (II) fração B8L1 modificada metilada (Cf. 2.11.) .

tr traço

R E F E R Ê N C I A S  
B I B L I O G R Á F I C A S

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TALMAGE, K.W. ; KEEGSTRA, K. ; BAUER, W.D. ; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls, I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore/cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. Plant Physiology , 51 : 158 - 73, 1973 .
2. ASPINALL, G.O. Pectins, plant gums and other plant polysaccharides. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. (Ed.). The carbohydrates — Chemistry and Biochemistry , II B, New York, Acad. Press, 1970 , p. 515 - 36 .
3. ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. Scientific American, 232:81 - 95 , 1975 .
4. TIMELL, T.E. Wood hemicelluloses. Part I. In: WOLFROM, M.L. (Ed.). Adv. Carbohyd. Chem., XIX, New York, Acad. Press, 1964 , p. 247 - 302 .
5. WENZEL, G.E. Fracionamento e purificação das hemiceluloses de folha de caféiro (Coffea arabica L. , var. Mundo Novo) — Análise estrutural de um O-metil-D-glucuronoxilano. Curitiba, 1975. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná . 96 p.
6. ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses . In: WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S. (Ed.). Adv. Carbohyd. / Chem., XIV , New York, Acad. Press, 1959, p. 429 - 68 .
7. TIMELL, T.E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Science and Technology , I : 45 - 70 , 1967 .
8. TIMELL, T.E. Wood hemicelluloses. Part II. In: WOLFROM, M. L. (Ed.). Adv. Carbohyd. Chem. , XX , New York, Acad. / Press, 1965, p. 409 - 83 .
9. O'DWYER, M.H. The hemicelluloses. Part IV. The hemicelluloses of beech wood. Biochem. J. , 20 : 656 - 64, 1926 .
10. GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. Nature , 191 : 1295 - 6 , 1961 .

11. BLAKE, J.D. ; MURPHY, P.T. ; RICHARDS, G.N. Isolation and A/B classification of hemicelluloses. Carbohyd. Res. , 16 : 49 - 57 , 1971 .
12. JONES, J.K.N. & WISE, L.E. The hemicelluloses present in Aspen wood (Populus tremuloides). Part I and II. J. Chem. Soc. , 2750 - 6 , 1952 .
13. MILKS, J.E. & PURVES , C.B. Attempted preparation of a homogeneous hemicellulose from Aspen wood. J. Am. Chem.Soc. , 78 : 3738 - 44 , 1956 .
14. JONES, J.K.N. ; MERLER, E. ; WISE, L.E. The hemicelluloses present in Aspen wood (Populus tremuloides). Part III. The constitution of pentosan and hexosan fractions. Can. J. Chem. , 35 : 634 - 45 , 1957 .
15. SAARNIO, J. ; WATHEN, K. ; GUSTAFSSON, C. Structure of an acidic xylan isolated from birch wood holocellulose. Acta Chem. Scand. , 8 : 825 - 8 , 1954 .
16. TIMELL, T.E. The polysaccharides of yellow birch (Betula lutea). II. The constitution of the main hemicellulose. J. Am. Chem. Soc. , 81 : 4989 - 94, 1959 .
17. TIMELL, T.E. Isolation and properties of an O-acetyl-(-4-O-methylglucurono)-xyloglycan from the wood of white birch (Betula papyrifera). J. Am. Chem. Soc. , 82 : 5211 - 7, 1960.
18. HAVLICEK, J. & SAMUELSON, O. Chromatography of oligosaccharides from xylan by various techniques. Carbohyd. Res.,22: : 307 - 16 , 1972 .
19. ROSELL, K-G & SVENSSON, S. Studies of the distribution of the 4-O-methyl-D-glucuronic acid residues in birch xylan . Carbohyd. Res. , 42 : 297 - 304, 1975 .
20. ASPINALL, G.O. ; HIRST, E.L. ; MAHOMED, R.S. Hemicellulose A of beechwood (Fagus sylvatica). J. Chem. Soc., 1734 - 8 , 1954 .
21. ADAMS, G.A. Constitution of a water soluble hemicellulose from american beechwood (Fagus grandifolia). Can. J. Chem. , 35 : 556 - 64 , 1957 .
22. GILLHAM, J.K. & TIMELL, T.E. The hemicellulose of white elm (Ulmus americana). I. Identification of 2-O-(-4-O-methyl-D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylopyranose. Can. J. Chem., 36 : 410 - 3 , 1958 .

23. GILLHAM, J.K. & TIMELL, T.E. The hemicellulose of white elm (Ulmus americana). II. Constitution of the methyl glucuronoxylan. Can. J. Chem. , 36 : 1467 - 74 , 1958 .
24. DUTTON, G.G.S. & MURATA, T.G. The constitution of the hemicellulose of apple wood (Malus pumila L. var. golden transparent). Can. J. Chem. , 39 : 1995 - 2000 , 1961 .
25. DUTTON, G.G.S. & MCKELVEY, S.A. The constitution of a hemicellulose of cherry wood (Prunus avium L. var. Bing). Can. J. Chem. , 39 : 2582 - 9 , 1961 .
26. POLGLASE, W.J. Polysaccharides associated with wood cellulose. In : WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S. (Ed.). Adv. Carbohyd. Chem. , X, New York, Acad. Press, 1955, p. 283 - 333 .
27. WHISTLER, R.L. Xylan. In: HUDSON, C.S. & CANTOR, S.M. (Ed.). Adv. Carbohyd. Chem. , V , New York , Acad. Press, 1950 , p. 269 - 90 .
28. JONES, J.K.N. ; PURVES, C.B. ; TIMELL, T.E. Constitution of a 4-O-methylglucuronoxylan from the wood of trembling aspen (Populus tremuloides Michx). Can. J. Chem. , 39 : 1059 - 66 , 1961 .
29. DUTTON, G.G.S. & UNRAU, A.M. The structural analysis of some acidic xylans by periodate oxidation. Can. J. Chem. , 40 : 348 - 52 , 1962 .
30. ZINBO, M. & TIMELL, T.E. Degree of branching of hardwood xylans. Chem. Ind. (London) , p. 222 .
31. DUTTON, G.G.S. & SMITH, F. The constitution of the hemicellulose of western hemlock (Tsuga heterophylla). II. Hydrolysis of the methylated hemicellulose. J. Am. Chem. Soc. ; 78 : 3744 - 8 , 1956 .
32. ASPINALL, G.O. & CARTER, M.E. The constitution of a xylan from Norway spruce (Picea excelsa). J. Chem. Soc. , 3744 - 8 , 1956 .
33. JONES, J.K.N. & PAINTER, T.J. The hemicelluloses of Loblolly pine (Pinus taeda) wood. Part I. The isolation of five oligosaccharide fragments. J. Chem. Soc. , 669 - 73, 1957 .

34. GAREGG, J. & LINDBERG, B. The constitution of an araboxylan from scots pine (Pinus silvestris L.). Acta Chem. Scand., 14 : 871 - 6 , 1960 .
35. RICHARDS, G.N. & WHISTLER, R.L. Isolation of two pure polysaccharides from the hemicellulose of slash pine (Pinus eliottii). Carbohyd. Res. , 31 : 47 - 55 , 1973 .
36. MEIER, H. Isolation and characterisation of an acetylated glucomannan from pine (Pinus silvestris L.). Acta. Chem.Scand , 15 : 1381 - 5 , 1961 .
37. CHANDA, S.K. ; HIRST, E.L. ; JONES, J.K.N. ; PERCIVAL, E.G.V. The constitution of xylan from esparto grass (Stipa tenacissima L.). J. Chem. Soc. , 1289 - 97 , 1950 .
38. ASPINALL, G.O. & MAHOMED, R.S. The constitution of a wheat-straw xylan. J. Chem. Soc. , 1731 - 4 , 1954 .
39. ADAMS, G.A. Constitution of a polyuronide hemicellulose from wheat leaf. Can. J. Chem. , 32 : 186 - 94, 1954 .
40. FALCONER, E.L. & ADAMS, G.A. The aldobiouronic acids of hemicellulose B of oat hulls. Can. J. Chem. , 34 : 338 - 44, 1956 .
41. BUCHALA, A.J. An arabinogalacto-(-4-O-methylglucurono)-xylan from the leaves of Hordeum vulgare. Phytochemistry, 12 : 1373 - 6 , 1973 .
42. WOOLARD, G.R. & RATHBONE, E.B. Structural studies on a glucuronoarabinoxylan from the husk of sorghum grain. Carbohyd. Res. , 51 : 239 - 47 , 1976 .
43. ASPINALL, G.O. & WILKIE, K.C.B. The constitution of an oat - straw xylan. J. Chem. Soc. , 1072 - 6 , 1956 .
44. REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B. An acidic galactoarabinoxylan and other pure hemicelluloses in oat leaf. Phytochemistry, 8 : 2053 - 8 , 1969 .
45. DUTTON, G.G.S. & KABIR, M.S. A comparison of the xylans from corn leaves and stalks. Phytochemistry , 11 : 779 - 85 , 1972 .

46. CHEETHAM, N.W.H. & McILROY, R.J. Polysaccharides of tropical grass species. I. Giant star grass (Cynodon plectostachyus). Carbohyd. Res. , 21 : 201 - 10 , 1972 .
47. BARNOUD, F. ; DUTTON, G.G.S. ; JOSELLEAU, J.P. La D-xylane du roseau Arundo donax . Carbohyd. Res. , 27 : 215 - 23 , 1973 .
48. LABAVITCH, J.M. & RAY, P.M. Structure of hemicellulosic polysaccharides of Avena sativa coleoptile cell walls . Phytochemistry, 17 : 933 - 7 , 1978 .
49. SAVUR, G.R. Constitution of tamarind-seed polysaccharides and the structure of the xylan. J. Chem. Soc. , 2600-3, 1956 .
50. AMIN, E.S. & EL-SAYED, M.M. The polysaccharides of mango seeds (Mangifera indica , var. Bullock's heart). Carbohyd. Res. , 27 : 39 - 46 , 1973 .
51. BISHOP, C.T. Carbohydrates of sunflower heads. Can. J. Chem., 33 : 1521 - 9 , 1955 .
52. CHANDA, S.K. ; HIRST, E.L. ; PERCIVAL, E.G.V. The constitution of a pear cell-wall xylan . J. Chem. Soc., 1240 - 6 , 1951 .
53. SIDDIQUI, I.R. & WOOD, P.J. Structural investigation of an acidic xylan from rapeseed. Carbohyd. Res. , 54:231-6 , 1977 .
54. BARDALAYE, P.C. & HAY, G.W. Structural studies on the hemicelluloses of the roots of the sugar maple (Acer saccharum Marsh). Part 2. Two (4-O-methyl-D-glucurono) -glucoxylans from the sapwood of mature lateral roots . Carbohyd. Res. , 32 : 339 - 50 , 1974 .
55. BARTH, F.W. & TIMELL, T.E. The constitution of a hemicellulose from milkweed (Asclepias syriaca) floss. J. Am. Chem. Soc. , 80 : 6320 - 5, 1958 .
56. CURRIE, A.L. & TIMELL, T.E. The constitution of a methyl glucuronoxylan from kapok (Ceiba pentandra). Can.J.Chem. , 37 : 922 - 9 , 1959 .

57. PERCIVAL, E. Algal polysaccharides. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. (Ed.). The Carbohydrates — Chemistry and Biochemistry, II B, New York, Acad. Press, 1970, p. 537 - 68.
58. PERCIVAL, E.G.V. & CHANDA, S.K. The xylan of Rhodymenia palmata. Nature, 166 : 787 - 8, 1950.
59. BJØRNDAL, H. ; ERIKSSON, K-E. ; GAREGG, J. ; LINDBERG, B. ; SWAN, B. Studies on the xylan from the red seaweed Rhodymenia palmata. Acta Chem. Scand., 19 : 2309 - 15, 1965.
60. CEREZO, A.S. ; LEZEROVICH, A. ; LABRIOLA, R. A xylan from the red seaweed Chaetangium fastigiatum. Carbohyd. Res., 19, : 289 - 96, 1971.
61. HOEHNE, F. A bracaatinga ou abaracaatinga. São Paulo - SP, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de S. Paulo, 1930. 47 p.
62. VIANNA, E.F. Breves instruções sobre a cultura da bracaatinga. Rio de Janeiro-RJ, Serviço de Informação Agrícola, 1942. 3 p.
63. HOEHNE, F.C. Mimosa bracaatinga. "Bracatinga". In: \_\_\_ ; KUHLMANN, M. ; HANDRO, O. (Ed.). O Jardim Botânico de S. PAULO, São Paulo-SP, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio, 1941, p. 426 - 7.
64. CORRÊA, J.B.C. ; GOMES, S.L. ; GEBARA, M. Structural features of the hemicellulose A from the stem of Mimosa bracaatinga. Carbohyd. Res., 60 : 337 - 43, 1978.
65. GOMES, S.L. Análise estrutural de um metil-glucuronoxilano, isolado do caule da bracatinga (Mimosa bracaatinga H.). Curitiba, 1975. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 42 p.
66. OLIVEIRA, M.L. Alguns aspectos estruturais de O-acetil-(4-O-metilglucurono)-xilano da Mimosa bracaatinga. Curitiba, 1977. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 41 p.

67. GEBARA, M. Degradação enzimática da hemicelulose A da Mimosa bracaatinga. Curitiba, 1977. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 34 p.
68. ZERMIANI, A. Novos aspectos sobre a estrutura da hemicelulose A do caule de Mimosa bracaatinga Hoehne. Curitiba, 1980. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 96 p.
69. TREVELYAN, W.E. ; PROCTER, D.P. ; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. Nature, 166 : 444 - 5, 1950 .
70. HOUGH, L. ; JONES, J.K.N. ; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatography . J. Chem. Soc. , 1702 - 6, 1950.
71. STEPHEN, A.M. ; KAPLAN, M. ; TAYLOR, G.L. ; LEISEGANG, E.C . Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides. Tetrahedron Supplement , 7 : 233 - 40 , 1966 .
72. SAWARDEKER, S.S. ; SLONEKER, J.H. ; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. Anal. Chem. , 37 : 1602 - 4 , 1965 .
73. LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. In : GINSBURG, V. (Ed.). Methods in Enzymology , XXVIII B, New York, Acad. Press, 1972, p. 178 - 95 .
74. 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 - 6, 1956.
75. BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. , 4 : 330 - 4 , 1962 .
76. SELVENDRAN, R.R. ; MARCH, J.F. ; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem. , 96 : 282 - 92, 1979 .

77. LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A.L. ; RANDALL, R.J .  
Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. , 193 : 265 - 75 , 1968 .
78. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed polysaccharides on cellulose acetate. Can. J. Chem., 46 : 3079 - 84 , 1968 .
79. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R.L. (Ed.). Methods Carbohyd. Chem. , II. New York, Acad. Press, 1963. p. 211 - 5.
80. KATO, Y & MATSUDA, K. Presence of a xyloglucan in the cell wall of Phaseolus aureus hypocotyls. Plant & Cell Physiol 17 : 1185 - 98, 1976 .
81. WHISTLER, R.L. & FEATHER, M.S. Hemicelluloses. Extraction from annual plants with alkaline solutions. In: WHISTLER, R.L. (Ed.). Methods Carbohyd. Chem. , V. New York, Academic Press, 1965. p. 144 - 5 .
82. GAILLARD, B.D.E. ; THOMPSON, N.S. ; MORAK, A.J. The interaction of polysaccharides with iodine. Part I. Investigation of the general nature of the reaction. Carbohyd. Res., 11 : 509 - 19 , 1969 .
83. GAILLARD, B.D.E. & THOMPSON, N.S. Interaction of polysaccharides with iodine. Part II. The behavior of xylans in different salt solutions. Carbohyd. Res., 18 : 137-46 , 1971.
84. BARKER, S.A. ; STACEY, M. ; ZWEIFEL, G. The separation of neutral polysaccharides . Chem. & Ind. (London), 330, 1957 .
85. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In : WHISTLER, R.L. (Ed.). Methods Carbohyd. Chem., V. New York, Acad. Press, 1965. p. 38 - 44.
86. DYER, J.R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. In : GLICK, D. (Ed.). Methods Biochem. Anal. , III , New York, Interscience Publishers Inc. , 1956. p. 111-52.
87. HAY, G.W. ; LEWIS, B.A. ; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. In: WHISTLER, R.L. (Ed.). Methods Carbohyd. Chem. , V. New York, Acad. Press, 1965. p. 357 - 61 .

88. GUTHRIE, R.D. Periodate oxidation. Determination of periodate. In : WHISTLER, R.L. (Ed.). Methods Carbohyd. Chem., I, New York, Acad. Press., 1962. p. 435 - 41 .
89. HAY, G.W. ; LEWIS, B.A. ; SMITH, F. ; UNRAU, A. M. Determination of reducing end-groups by periodate oxidation. In: WHISTLER, R.L. (Ed.). Methods Carbohyd. Chem., V . New York , Acad. Press, 1955. p. 251 - 3 .
90. UNRAU, A.M. & SMITH, F. A chemical method for the determination of the molecular weight of certain polysaccharides. Chem. & Ind. (London), 330 - 1 , 1957 .
91. CORRÊA, J.B.C. Metilação. In : \_\_\_\_ . Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos. Curitiba, 1971. p. 39 - 40 (Monografia didática) .
92. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem.Soc., 107 : 8 -16 , 1915 .
93. BJÖRNDAL, H. ; HELLERQVIST, C.G. ; LINDBERG, B. ; SVENSSON, S. Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. Angew. Chem. Internat. Edit, 9 : 610 - 9 , 1970 .
94. HAKOMORI, S. Rapid permethylation of glycolipids and polysaccharides catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J. Biochemistry (Tokyo), 55 : 205 - 8 , 1964 .
95. SANDFORD, P.A. & CONRAD, H.E. The structure of the aerobacter aerogenes A<sub>3</sub> polysaccharides. I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochem., 5 : 1508 - 17 , 1966 .
96. LINDBERG, B. ; LINDH, F. ; LÖNNGREN, J. Modification of polysaccharides containing uronic acid residues. Carbohyd. Res., 61 : 81 - 7 , 1978 .
97. GAILLARD, B.D.E. & BAILEY, R. W. Reaction with iodine of polysaccharides dissolved in strong calcium chloride. Nature, 212 : 202 - 3 , 1966 .
98. BANKS, W. ; GREENWOOD, C.T. ; KHAN, K.M. The interaction of linear amylose oligomers with iodine. Carbohyd. Res. , 17: : 25 - 33 , 1971 .
99. REICHER, F. & CORRÊA, J.B.C. Comunicação pessoal .