

RENATO BOCHICCHIO

**HEMICELULOSES DO XILEMA DO  
GÊNERO *Podocarpus***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Bioquímica da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

CURITIBA  
1999

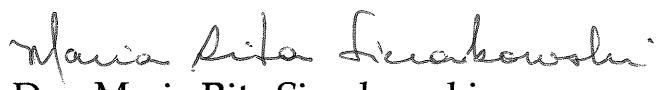
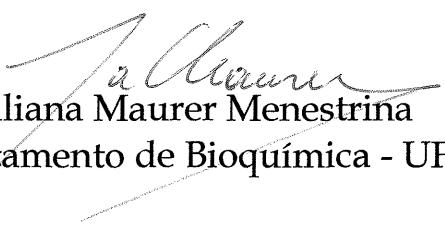
HEMICELULOSES DO XILEMA DO GÊNERO *Podocarpus*

Renato Bochicchio

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



Dra. Fany Reicher (Orientadora)  
Departamento de Bioquímica - UFPR

  
Dra. Maria Rita Sierakowski  
Departamento de Química - UFPR  
Dra. Juliana Maurer Menestrina  
Departamento de Bioquímica - UFPR

Curitiba, 21 de julho de 1999

Orientação: Profa. Dra. FANY REICHER

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, responsáveis diretos pelo sucesso alcançado ao longo deste caminho de vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Fany Reicher, a quem devo meu ingresso ao mundo bioquímico. Seu conhecimento, bom senso e liderança são virtudes que, certamente, servirão de espelho em minha carreira profissional.

À Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter, pelos conselhos científicos e sobretudo, pelos conselhos de vida, vindos de quem gosta de aproveitá-la.

Ao Prof. Dr. Philip Albert James Gorin, de quem a experiência sempre servirá de exemplo.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em nome da Profa. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira.

À Chefia do Departamento de Bioquímica, em nome da Profa. Dra. Glaci Zancan.

Aos colegas de laboratório Ana Paula, Angela, Eliana, Fabíola, Gisele, Juan, Luciane, Sílvia e às colegas que por aqui passaram: Anat, Carmen, Eloisa, Janyce, Juliana, Tania Bresolin, Tania Mara e Vanessa. A todas essas pessoas, meu especial agradecimento, pela convivência, pelas boas risadas e pelas brigas e discussões. Tudo fez e continua fazendo parte importante de minha vida.

Aos “irmãos” César e Guilherme, não preciso dizer mais nada.

À Rose Adele, de quem poderia muito bem chamar de “irmã”, mas é prima mesmo.

Aos meus amigos Humberto, Jean Patrik, Leonardo e Rodrigo Reis, companheiros da Bioquímica e da bola.

Às minhas amigas Ana Paula, Carolina, Carolina Galvão, Fabiane, Fabiana, Fernanda, Lilian, Luciana, Luiza, Mariana, Patrícia Sassaki e Simone. Todas são um espetáculo!

À todas as meninas de Iniciação Científica. Elas iluminam o Departamento, os olhos e, por vezes, o coração...

Às Profas. Dras. Juliana Maurer Menestrina e Selma Faria Zawadzki-Baggio, pelas conversas, sugestões e sobretudo, pelo bom-humor sempre demonstrado.

Ao Laboratório de Nutrição Mineral do Departamento de solos desta Universidade, em nome do Prof. Dr. Bruno Reissmann, pelas análises de proteínas, cinzas e minerais.

Ao Laboratório de Anatomia da Madeira do Departamento de Silvicultura e Manejo desta Universidade, em nome da Profa. Dra. Graciela Muniz, pelas fotografias anatômicas de xilema de *P. lambertii*.

Às funcionárias da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela presteza e eficiência demonstradas.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	xix
FLUXOGRAMAS .....	xi
LISTA DE SIGLAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Hemiceluloses .....	1
1.2. O-acetyl-galactoglucomanana (GGM) .....	8
1.3. Arabino-4-O-metilglucuronoxilana (AGX) .....	11
1.4. Interação hemicelulose-polímeros da parede celular .....	16
1.5. Aplicações de hemiceluloses.. .....	19
1.6. O gênero <i>Podocarpus</i> .....	21
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivos gerais .....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Métodos gerais .....	30
3.2. Obtenção do material de pesquisa .....	33
3.3. Obtenção da holocelulose .....	33
3.4. Obtenção dos polissacarídeos .....	34
3.5. Hidrólise ácida total de hemiceluloses .....	35
3.6. Redução dos produtos hidrolisados .....	35
3.7. Acetilação dos alditóis .....	36
3.8. Fracionamento de polissacarídeos .....	36
3.8.1.Fracionamento de polissacarídeos da frações H1aT e KOH1a por solubilidade em água .....	36
3.8.2. Precipitação de polissacarídeos ácidos da fração H1-aT(água sol) utilizando CETAVLON (brometo de hexadeciltrimetilamônio) .....	37

3.8.3. Purificação de polissacarídeos ácidos da fração H1-aT(água sol) utilizando hidróxido de bário .....	37
3.8.4. Cromatografia de gel permeação em Sephadex G-200 .....	38
3.9. Teste de homogeneidade das frações eluídas em coluna .....	39
3.10. Determinação das massas moleculares das frações NaOH-a e NaOH-b por espalhamento de luz .....	39
3.11. Oxidação com metaperiodato de sódio .....	40
3.12. Polarimetria .....	40
3.13. Análises de metilação .....	41
3.13.1. Metilação da fração NaOH-a .....	41
3.13.2. Metilação da fração H1aTágua(sol) .....	42
3.14. Metanólise .....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1. Obtenção e caracterização do material de pesquisa .....	44
4.2. Obtenção e composição monossacarídica de material hemicelulósico de <i>P. lambertii</i> e <i>P. selowii</i> .....	50
4.3. Obtenção e composição monossacarídica de material hemicelulósico de <i>P. lambertii</i> , com prévia deslignificação .....	54
4.4. Análise estrutural da fração NaOH-a (galactoglucomanana) de xilema de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	70
4.5. Análise das frações H1aT e KOH1a (arabino 4-O-metilglucuronoxilana) de xilema de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	78
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	106
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	108

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura geral da parede celular da madeira, apresentando a parede primária (a); camadas da parede secundária S1 (b); S2 (c); S3 (d) e camada verrucosa (e) .....	3
<b>Figura 2.</b> Estrutura química parcial de uma O-acetil-galactoglucomanana de gimnosperma .....	8
<b>Figura 3.</b> Estrutura química parcial de uma arabino-4-O-metil glucuronoxilana de gimnosperma .....	12
<b>Figura 4.</b> Exemplos sugeridos de formação de complexo lignin-carboidrato: uma ligação éster de xilana de madeira através de um ácido 4-O-metilglucurônico (1); uma ligação éter através de uma unidade de arabinose (2); uma ligação éter de uma galactoglucomanana através de uma unidade de galactose .....	18
<b>Figura 5.</b> Representante de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	22
<b>Figura 6.</b> Característica foliar de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	24
<b>Figura 7.</b> Cone de <i>Podocarpus sp.</i> .....	26
<b>Figura 8.</b> Disposição esquemática das camadas de crescimento no tronco .....	44
<b>Figura 9.</b> Curvas de calibração dos padrões BSA, ácido salicílico e siringaldeído, utilizando o método de Hartree .....	48
<b>Figura 10.</b> Curvas de calibração dos padrões BSA, ácido salicílico e siringaldeído, utilizando o método de Bradford .....	49
<b>Figura 11.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da fração NaOH-a, em NaOD 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm .....	76
<b>Figura 12.</b> Plot de Zimm da fração NaOH-a .....	77
<b>Figura 13.</b> Plot de Zimm da fração NaOH-b .....	78
<b>Figura 14.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da fração H1aT(água sol), em D <sub>2</sub> O 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm .....	85

<b>Figura 15.</b> Região de C-1 de Xilp, em espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN, da subfração H1aT(água sol) .....	86
<b>Figura 16.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -DEPT da fração H1aT(água sol) em $\text{D}_2\text{O}$ 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm .....	88
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz, da subfração H1aT(água sol) .....	89
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico cromatográfico, realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz, da subfração H1aTcetavlon .....	92
<b>Figura 19.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da fração H1aTcetavlon, em $\text{D}_2\text{O}$ 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm .....	93
<b>Figura 20.</b> Região de C-1 de Xilp, em espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da subfração H1aTcetavlon .....	94
<b>Figura 21.</b> Perfil cromatográfico, realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz, da subfração KOH1a-água(sol) .....	97
<b>Figura 22.</b> Perfil cromatográfico, realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz, da subfração KOH1a-bário(sol) .....	99
<b>Figura 23.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da fração KOH1a-bário(sol), em $\text{D}_2\text{O}$ 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm .....	100
<b>Figura 24.</b> Região de C-1 de Xilp, em espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da subfração KOH1a-bário(sol) .....	101
<b>Figura 25.</b> Perfil cromatográfico, obtido por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz da subfração KOH1a(col) .....	102
<b>Figura 26.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN da fração KOH1a-col, em $\text{D}_2\text{O}$ 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm .....	103
<b>Fotografia 1.</b> Anatomia da madeira de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Unidades não-glucósicas de hemiceluloses de várias madeiras .....	7
<b>Tabela II.</b> Composição dos minerais em xilema de <i>P. lambertii</i> e <i>P. selowii</i> .....	46
<b>Tabela III.</b> Dosagem de proteínas em hemiceluloses de <i>P. lambertii</i> e <i>P. selowii</i> utilizando-se três métodos colorimétricos.....	47
<b>Tabela IV.</b> Composição monossacarídica das hemiceluloses de <i>P.lambertii</i> e <i>P. selowii</i> , obtida por extração com KOH 2N .....	53
<b>Tabela V.</b> Hidrólise de Saeman do resíduo das extrações alcalinas .....	53
<b>Tabela VI.</b> Composição monossacarídica, açúcares totais e fenólicos totais das frações obtidas por extrações alcalinas (KOH 4N e NaOH 4N, respectivamente), com prévia deslinificação (total e parcial) .....	57
<b>Tabela VII.</b> Rendimento em holocelulose após os diversos tratamentos, em relação ao material original (deslipidificado e despectinizado) .....	59
<b>Tabela VIII.</b> Composição monossacarídica dos resíduos submetidos à hidrólise de Saeman .....	60
<b>Tabela IX.</b> Composição monossacarídica, açúcares totais e fenólicos totais das frações obtidas por extrações alcalinas (NaOH 4N e KOH 4N, respectivamente), com prévia deslinificação (total e parcial) .....	64
<b>Tabela X.</b> Composição monossacarídica, açúcares totais e fenólicos totais das frações obtidas por extrações sequenciais alcalinas (KOH 1; 2 e 4N e NaOH 1 e 4N), com prévia deslinificação parcial .....	67
<b>Tabela XI.</b> Análise dos derivados parcialmente metilados da fração NaOH-a de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	71
<b>Tabela XII.</b> Composição dos subprodutos das duas etapas de oxidação com metaperiodato de sódio .....	72

<b>Tabela XIII.</b> Rotação ótica específica e razão entre os monossacarídeos de diversas espécies de coníferas .....	73
<b>Tabela XIV.</b> Dados de $^{13}\text{C}$ -RN para a fração NaOH-a de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	75
<b>Tabela XV.</b> Composição monossacarídica da fração H1aT e subfrações resultantes do fracionamento por solubilidade em água, H1aT(água sol) e H1aT(água ins) .....	79
<b>Tabela XVI.</b> Análise dos derivados parcialmente metilados da arabinoxilana ácida (subfração H1aT(água sol)) de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	81
<b>Tabela XVII.</b> Rotação ótica específica e razão entre os monossacarídeos de arabino-4-O-metilglucuronoxilanas de diversas espécies de coníferas .....	84
<b>Tabela XVIII.</b> Dados de $^{13}\text{C}$ -RMN para a subfração H1aT(água sol) de <i>Podocarpus lambertii</i> .....	87
<b>Tabela XIX.</b> Composição monossacarídica da fração H1aT(água sol) e a subfração resultante de precipitação com CETAVLON, H1aTcetavlon .....	91
<b>Tabela XX.</b> Composição monossacarídica da fração KOH1a e subfrações resultantes do fracionamento por solubilidade em água, KOH1a-água(sol) e KOH1a-água(ins) .....	96
<b>Tabela XXI.</b> Composição monossacarídica da fração KOH1a-água(sol) e subfrações resultantes do fracionamento por solubilidade em água KOH1a-bálio(sol) e KOH1a-bálio(ppt) .....	98
<b>Tabela XXII.</b> Composição monossacarídica de xilema de <i>Podocarpus lambertii</i> , obtida por hidrólise de Saeman em diversos tempos de pré-hidrólise .....	103

## FLUXOGRAMAS DE EXTRAÇÕES

<b>Fluxograma I.</b> Extração alcalina sequencial das hemiceluloses de <i>P. lambertii</i> e <i>P. selowii</i> .....	52
<b>Fluxograma II.</b> Extração alcalina sequencial (KOH 4N e NaOH 4N, respectivamente), com prévia deslignificação .....	56
<b>Fluxograma III.</b> Extração alcalina sequencial (NaOH 4N e KOH 4N, respectivamente), com prévia deslignificação parcial .....	63
<b>Fluxograma IV.</b> Extração alcalina sequencial (KOH 1; 2 e 4N e NaOH 1 e 4N, respectivamente), com prévia deslignificação parcial .....	66

## LISTA DE SIGLAS

<sup>13</sup> C-RMN	ressonância magnética nuclear de carbono treze
<sup>13</sup> C-DEPT	“distortions ehancement by polarization transfer”
CETAVLON	brometo de hexadeciltrimetilamônio
dn/dc	taxa de variação do índice de refração com a concentração
<sup>1</sup> H-RMN	ressonância magnética nuclear de próton
AGX	arabino 4-O-metilglucuronoxilana
BSA	soroalbumina bovina
D <sub>2</sub> O	óxido de deutério – água deuterada
DAP	diâmetro a altura do peito
DMSO	dimetilsulfóxido
g.c.-m.s.	cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa
g.l.c.	cromatografia líquido-gasosa
GGM	galactoglucomanana
GP	grau de polimerização
GPC	cromatografia em gel permeação
HMBC	“2D-heteronuclear proton-detected multiple-bond coherence”
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
I.R.	infravermelho
4-O-MeGluA	ácido 4-O-metilglucurônico
MHz	mega Hertz
Mw	massa molecular ponderal média
NaBH <sub>4</sub>	boroidreto de sódio
NaClO <sub>2</sub>	clorito de sódio
NaOD	hidróxido de sódio deuterado
NaOH	hidróxido de sódio
ppm	partes por milhão

## **Resumo**

As hemiceluloses do xilema de *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus se lowii* foram escolhidas como fonte de estudo. A similaridade das composições monossacarídicas das frações obtidas com álcali (rendimento de 0,1 a 0,5 g%) entre as duas espécies, permitiu a escolha de *Podocarpus lambertii* como modelo do estudo realizado. A deslignificação do xilema, previamente às extrações com álcali, permitiu a obtenção de quantidades significativas de hemiceluloses (15 a 20 g%). Extrações com KOH renderam polissacarídeos constituídos por unidades de xilose e arabinose. Extrações com NaOH resultaram em uma mistura de polissacarídeos constituídos por manose e xilose. A interpretação das análises químicas e físico-químicas das frações indicaram a presença de uma cadeia principal de D-xilopiranose ligada glicosidicamente  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), substituídas em O-2 por unidades de ácido-4-O-metilglucurônico e em O-3 por unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranose. Subsequente à extração sequencial de arabinoxilananas com concentração variadas de KOH (1; 2 e 4 N), uma galactoglucomanana foi isolada, a partir do emprego de NaOH 1N. As análises químicas de oxidação com metaperiodato de sódio, metilação e físico-químicas por polarimetria e  $^{13}\text{C}$ -RMN, demonstraram uma estrutura constituída por uma cadeia principal de unidades de D-manopiranose e D-glucopiranose, com relação molar Man:Glu 3:1, ligadas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), eventualmente substituídas por D-galactopiranose  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), com alta massa molecular determinada por GPC, acoplada a detector por espalhamento de luz, em torno  $8 \times 10^5$  g/mol, que pode ser atribuída à presença de agregados moleculares. As estruturas químicas caracterizadas mostraram-se típicas de outras gimnospermas anteriormente estudadas, no entanto observou-se que estas encontram-se em quantidades similares, diferente do que normalmente é encontrado para coníferas.

# 1. Introdução

---

### 1.1. Hemiceluloses

As hemiceluloses são consideradas como o segundo material orgânico natural mais encontrado na biosfera, ficando atrás apenas da celulose (JOSELEAU *et al.*, 1992; POPA, 1996). Plantas vivas contém cerca de  $6 \times 10^{11}$  toneladas de hemicelulose e em torno de  $3 \times 10^{10}$  toneladas são fotossintetizadas, anualmente, por plantas terrestres superiores (WILKIE, 1983).

A origem do termo deve-se ao fato que, inicialmente, acreditava-se que estes polissacarídeos fossem os precursores da síntese de celulose (NEUKOM *et al.*, 1967). O termo foi introduzido por Schulze, em 1891, o qual extraiu polissacarídeos de plantas com álcali diluído. Neste aspecto, hemiceluloses são frequentemente definidas como polissacarídeos de parede celular de vegetais superiores que podem ser extraídas com álcali (FENGEL & WENGER, 1989; SJÖSTRÖM, 1993; WILKIE, 1983). Entretanto, alguns polissacarídeos extraídos com água, como as arabinogalactanas e glucomananas, também são considerados hemiceluloses (MILLS & TIMELL, 1963; SCHWARZ & TIMELL, 1963; WILKIE, 1979).

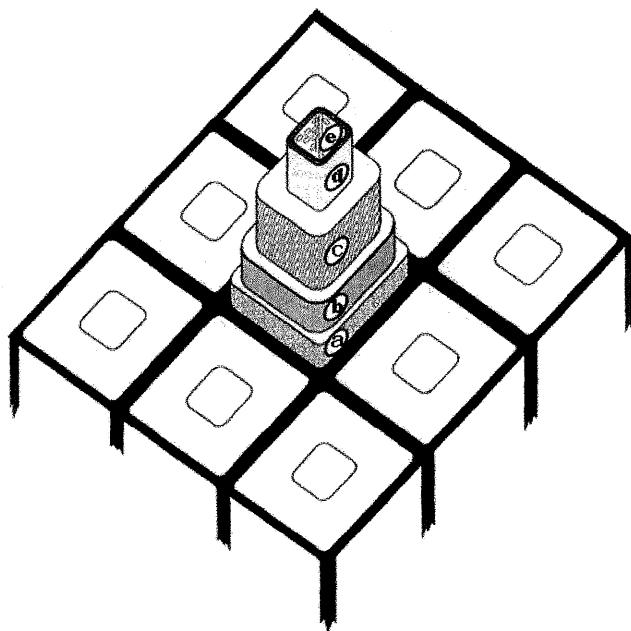
Dentro das características específicas das hemiceluloses, alguns autores definem-as como sendo heteropolissacarídeos com função estrutural na parede celular apresentando, em geral, massa molecular menor que a celulose e grau de ramificação reduzido. A quantidade de hemiceluloses, em massa seca da madeira, geralmente gira em torno de 20 a 30%. As diferenças no conteúdo de hemiceluloses, tanto no aspecto constitutivo quanto ao percentual em massa, em

diferentes estágios de crescimento, não se mostraram significativas (BUCHALA & WILKIE, 1974; ROMANOWSKI, 1986). Entretanto, a composição monossacarídica de hemiceluloses de diferentes tecidos em um mesmo indivíduo apresenta bastante variabilidade (WILKIE, 1983).

Estes polissacarídeos são constituídos pelos monossacarídeos D-xilose, D-manoze, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, ácido 4-O-metilglucurônico, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico. Eventualmente, apresenta grupamentos O-acetyl ligados às unidades pertencentes à cadeia principal (FENGEL & WENGER, 1989; JOSELEAU *et al.* 1993; PULS & SCHUSEIL, 1993; SJÖSTRÖM, 1993).

As hemiceluloses estão inseridas na parede celular de plantas em um complexo fortemente associado, juntamente com a celulose e lignina (JOSELEAU *et al.*, 1992). Analisando células individuais, as hemiceluloses são encontradas na parede primária, juntamente com celulose, pectinas e proteínas (Figura 1).

A parede secundária é dividida em três camadas, caracterizadas principalmente pelas diferentes orientações das microfibrilas de celulose. As hemiceluloses estão localizadas também na parede secundária, que é lignificada (FENGEL & WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM, 1993).



**Figura 1.** Estrutura geral da parede celular da madeira, apresentando a parede primária (a); camadas da parede secundária S1 (b); S2 (c); S3 (d) e camada verrucosa (e)

Fonte: REID (1997).

A extração dos polissacarídeos da parede celular é realizada mediante diversos tipos de solventes. A água é capaz de solubilizar pectinas e algumas hemiceluloses, como arabinogalactanas e glucomananas (FENGEL & WEGENER, 1989; MILLS & TIMELL, 1963; SCHWARZ & TIMELL, 1963; WILKIE, 1983). O emprego de álcalis, como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidróxido de bário são capazes de solubilizar de forma eficiente polissacarídeos hemicelulósicos (TIMELL, 1965a; WILKIE, 1979). Estes podem ser seletivos na obtenção de polissacarídeos específicos. Xilanias são extraídas de forma mais eficiente quando utiliza-se hidróxido de potássio ou uréia (SJÖSTRÖM, 1993;

BACIC & STONE, 1981), enquanto glucomananas são solubilizadas, de maneira mais eficaz, com hidróxido de bário ou ácido bórico (MEIER, 1965; BACIC & STONE, 1981).

Os solventes alcalinos, no entanto, causam modificações na estrutura nativa das moléculas, pela remoção de grupos O-acetil e  $\beta$ -eliminação da cadeia polissacarídica, sendo o último amenizado pela adição de boroidreto de sódio à solução extrativa (ASPINALL, 1982; MEIER, 1965; SJÖSTRÖM, 1993; WOLFROM & THOMPSON, 1963).

Solventes inertes, como dimetilsulfóxido (DMSO), dioxano ou dimetilformamida também podem ser empregados nas extrações hemicelulósicas, apresentando como principal vantagem o efeito mínimo de degradação da estrutura nativa, preservando os grupos O-acetil e a massa molecular mais próximas da forma original, nos polissacarídeos, apesar dos baixos rendimentos obtidos (BOUVENG & LINDBERG, 1965; HÄGGLUND *et al.*, 1956; PULS & SCHUSEIL, 1993; SJÖSTRÖM, 1993). HÄGGLUND *et al.*, 1956, citam ainda que parte das hemiceluloses são extraídas com DMSO e que o material celulósico exibe significativo inchamento intermicelar durante o tratamento, razão pela qual muito material hemicelulóciso ainda é obtido após subsequente extração com água.

As hemiceluloses podem ser classificadas de acordo com o agente precipitante empregado. Hemiceluloses **A** são aquelas que precipitam em pH 5,0, após neutralização do meio alcalino de extração. Geralmente são polissacarídeos

ácidos. Já hemiceluloses do tipo B são aquelas solúveis em pH 5,0 e que precipitam com a adição de etanol (SJÖSTRÖM, 1993).

Grande parte dos trabalhos envolvendo a elucidação estrutural de hemiceluloses de xilema de vegetais superiores teve seu início no final da década de 50, a partir da descoberta e aperfeiçoamento dos métodos químicos de análise.

Em diversos trabalhos com madeiras de coníferas, os estudos de hemiceluloses dos gêneros *Picea*, *Gingko*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Thuja* e *Tsuga* evidenciaram a existência de uma similaridade em torno de suas estruturas químicas. Todas as espécies dos gêneros estudados apresentaram, como principal hemicelulose, O-acetil-galactoglucomananas e em menores quantidades, arabino-4-O-metilglucuronoxilananas, com diferentes razões entre os monossacarídeos constituintes (ADAMS, 1965a; ASPINALL, 1959; CROON & LINDBERG, 1958; DUTTON & HUNT, 1960 a e b; TIMINSKI & TIMELL, 1960).

Outros trabalhos que se seguiram demonstraram o mesmo perfil estrutural, como no estudo da madeira de *Abies amabilis* (SCHWARZ & TIMELL, 1963) e *Picea engelmanni* (MILLS & TIMELL, 1963). Desta forma, graças à reunião de resultados, pôde-se caracterizar as hemiceluloses de gimnospermas, de maneira genérica, como sendo constituídas por um polissacarídeo hemicelulósico principal, O-acetil-galactoglucomana (20-25%), onde grupos O-acetyl e galactose substituem unidades de glucose ou manose, da cadeia principal. Em menor proporção, são encontrados as arabino-4-O-metilglucuronoxilananas, com proporções de monossacarídeos dependentes do tipo do extrativo utilizado e da

fonte estudada (FELGEL & WEGENER, 1989; PULS & SCHUSEIL, 1993; SJÖSTRÖM, 1993; TIMELL, 1964; TIMELL, 1965 b).

As hemiceluloses de madeiras de angiospermas também possuem uma similaridade em torno da composição e estrutura. Diferem substancialmente, no entanto, daquelas encontradas em gimnospermas. São constituídas basicamente por 4-O-metil glucuronoxilananas (cerca de 30% em massa seca de madeira), com taxas inferiores de outros polissacarídeos. (FELGEL & WEGENER, 1989; PULS & SCHUSEIL, 1993; SJÖSTRÖM, 1993; TIMELL, 1964; TIMELL, 1965 b).

Desta forma, a composição monossacarídica da madeira de coníferas deve apresentar teores mais elevados de manose e glucose, enquanto que na madeira de angiospermas, os níveis de xilose devem ser maiores, como mostrado na Tabela I.

**Tabela I.** Unidades não-glucósicas de hemiceluloses de várias madeiras.

Divisão	Espécies	Composição monossacáridica (mol %)					
		Man	Xil	Gal	Ara	GluA	Acetil
Gimnosperma	<i>Abies balsamea</i>	10,0	5,2	1,0	1,1	4,8	1,4
	<i>Larix decidua</i>	11,5	5,1	6,1	2,0	2,2	
	<i>Larix laricina</i>	12,3	6,0	2,4	1,3	2,8	1,6
	<i>Picea abies</i>	13,6	5,6	2,8	1,2	1,8	
	<i>Picea glauca</i>	12,0	7,0	1,9	1,1	4,4	1,2
	<i>Picea mariana</i>	9,4	6,0	2,0	1,5	5,1	1,3
	<i>Pinus strobus</i>	8,1	7,0	3,8	1,7	5,2	1,2
	<i>Pinus sylvestris</i>	12,4	7,6	1,9	1,5	5,0	1,6
	<i>Tsuga canadensis</i>	10,6	3,3	1,8	1,0	4,7	1,4
	<i>Thuja occidentalis</i>	7,4	3,8	1,5	1,7	5,8	0,9
Angiosperma	<i>Acer rubrum</i>	3,3	18,1	1,0	1,0	4,9	3,6
	<i>Betula alleghaniensis</i>	1,8	18,5	0,9	0,3	6,3	3,7
	<i>Betula papyrifera</i>	2,0	23,9	1,3	0,5	5,7	3,9
	<i>Betula verrucosa</i>	3,2	24,9	0,7	0,4	3,6	
	<i>Fagus grandiflora</i>	1,8	21,7	0,8	0,9	5,9	4,3
	<i>Fagus sylvatica</i>	0,9	19,0	1,4	0,7	4,8	
	<i>Fraxinus excelsior</i>	3,8	18,3	0,9	0,6	6,0	
	<i>Populus tremuloides</i>	3,5	21,2	1,1	0,9	3,7	3,9
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	2,2	16,7	0,8	0,4	4,7	2,7

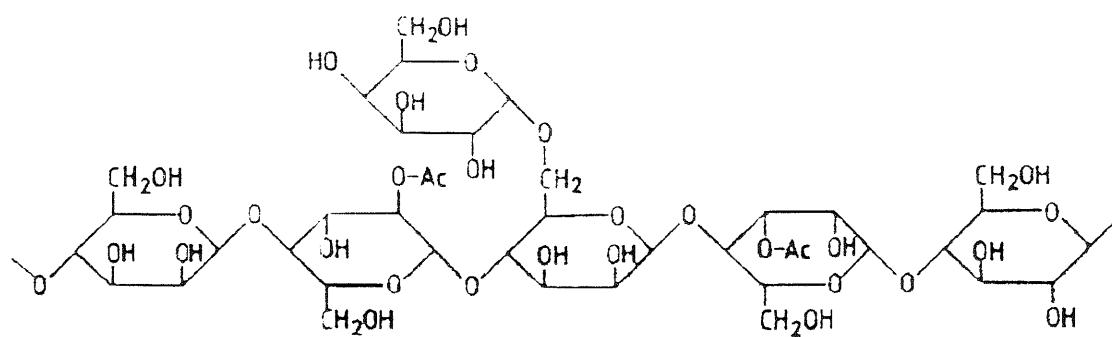
Fonte: FENGEL & WENEGER (1989).

Hemiceluloses de xilema de angiospermas e gimnospermas apresentam, portanto, um padrão diferenciado em sua composição monossacáridica (FENGEL

& WENGER, 1989). Nos anos 80, o advento de técnicas mais sofisticadas, como o emprego de métodos espectroscópicos e equipamentos cromatográficos de alta resolução, tanto no processo de isolamento, quanto na etapa de elucidação estrutural, trouxe enormes avanços ao estudo dos polissacarídeos. Levando-se em conta que grande parte dos trabalhos envolvendo estruturas de hemiceluloses de madeiras, principalmente gimnospermas, datam das décadas de 50, 60 e 70, poucos exploraram o mesmo, a partir das décadas seguintes, através do uso das mais modernas técnicas.

### 1.2. O-acetil-galactoglucomanana (GGM)

São hemiceluloses que apresentam uma cadeia principal de unidades de manose e glucose alternadas ligadas  $\beta$  ( $1\rightarrow4$ ), eventualmente substituídas por galactose  $\alpha$  ( $1\rightarrow6$ ) e grupos O-acetil nas posições O-2 e/ou O-3 das unidades de manose (FENGEL & WEGENER, 1989).



**Figura 2.** Estrutura química parcial de uma O-acetil-galactoglucomanana de gimnosperma.

Fonte: FENGEL & WEGENER (1989).

A razão Man:Glu:Gal (3:1:0.1) é geralmente encontrada, podendo, no entanto, variar de acordo com a espécie e o método extrativo utilizado (FENGEL & WEGENER, 1989).

A razão aproximada de 3:1 (Man:Glu) entre manose e glucose é encontrada em diversos trabalhos envolvendo coníferas, como *Picea abies* (3,5:1) (CROON & LINBERG, 1958), *Picea glauca* (3:1) (TIMINSKI & TIMELL, 1960), *Pinus sylvestris* (3:1) (MEIER, 1958) e *Larix laricina* (2,7:1) (KOOIMAN & ADAMS, 1961).

As massas moleculares de glucomananas têm sido determinadas ao longo do tempo por diversas técnicas de análise. CROON & LINBERG (1958), determinaram o grau de polimerização (GP) do polissacarídeo através dos derivados metilados, a partir da razão existente entre os derivados 2,3,6 tri-O-metil manitol, 2,3,6 tri-O-metil glucitol e o terminal não-redutor 2,3,4,6 tetra-O-metil hexitol, resultando em GPs de 68 e 100, para glucomananas extraídas com água e álcali, respectivamente, de madeira de *Picea abies*, uma conífera. Da mesma forma, outra espécie do mesmo gênero, *Picea glauca*, rendeu uma glucomanana com GP médio de 172 (TIMINSKI & TIMELL, 1960).

Em estudo mais recente, glucomananas de sementes de *Asparagus officinalis*, uma monocotiledônea, apresentaram massas moleculares entre  $1,5 \times 10^5$  -  $2 \times 10^5$ , quando cromatografados por gel-filtração, em Sephadex G-200, (GOLDBERG et al., 1987).

O efeito degradativo dos métodos de deslignificação utilizados devem ser considerados, dificultando a elucidação das massas moleculares de

hemiceluloses nativas (ASPINALL, 1982; TYMINSKI & TIMELL, 1960; SIMKOVIC *et al.*, 1986). Além disso, extrações alcalinas também são responsáveis pela clivagem de ligações  $\alpha$ -glicosídicas das unidades de galactose (FENGEL & WEGENER, 1989). Em GGM de tabaco (*Nicotiana tabacum*), o conteúdo de unidades substituintes de galactose, após extração com hidróxido de sódio 25% e ácido bórico, foi de aproximadamente 14%.

A extração de GGM na sua forma acetilada pode ser obtida pelo emprego de DMSO como agente extrator. GGM de *Pinus sylvestris* possui cerca de 5% de grupos O-acetil (MEIER, 1961). Estudos de GGM foram realizados em hemiceluloses de uma espécie dicotiledônea, *Linum usitatissimum*. O trabalho correlaciona os assinalamentos de unidades de manose e glucose acetiladas a partir de espectros bidimensionais, utilizando a técnica de HMBC (2D-heteronuclear proton-detected multiple-bond coherence) (HAZENDONK *et al.*, 1996). Outra metodologia adequada à identificação de grupamentos O-acetil utiliza FT-IR (Fourier Transform-InfraRed). Em madeira de *Populus deltoides*, moída e tratada com álcali, a determinação quantitativa de grupos acetil foi apresentada, baseada na variação da altura dos picos a 1735 cm<sup>-1</sup>, devido ao grupo carbonila da hemicelulose. Uma boa correlação com valores obtidos por cromatografia a gás foi obtida (ZANUTTINI *et al.*, 1998).

A caracterização estrutural de uma GGM de suspensão em cultura de células *Nicotiana plumbaginifolia* foi determinada a partir do estudo dos oligossacarídeos produzidos pela digestão com diferentes enzimas. O tratamento com  $\alpha$  e  $\beta$ -galactosidase mostrou que a maioria da cadeia era composta por

unidades de Galp- $\alpha$ -(1→3) substituindo a cadeia principal de glucomanana. Tratamento com endo-(1→4)- $\beta$ -mananase confirmou a presença alternada de unidades de →4-D-Manp- $\beta$ -(1→3) e →4)-D-Glcp- $\beta$ -(1 (SIMS *et al.*, 1997). Estudos a partir de oligossacarídeos também foram realizados por hidrólise ácida parcial, como em GGM de *Populus mollinifera* (KUBACKOVA *et al.*, 1992).

### **1.3. Arabino-4-O-metilglucuronoxilana (AGX)**

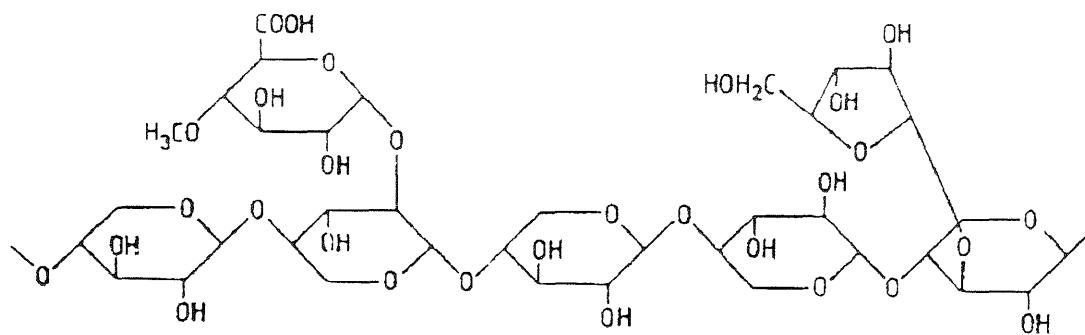
Em gimnospermas, são constituídas por uma cadeia principal de unidades de xilopiranose ligadas  $\beta$  (1→4), substituídas por  $\alpha$  (1→3) arabinofuranose e ácido 4-O-metilglucurônico ligadas  $\alpha$  (1→2), enquanto que em angiospermas dicotiledôneas as unidades xilopiranose são substituídas não mais por arabinose, mas por grupos acetil nas posições O-2 ou O-3, ou ainda em menor quantidade, substituições em O-2,3 (CARPITA, 1996)(Figura 3).

Em xilema de *Mimosa scabrella*, uma angiosperma dicotiledônea, a ocorrência de grupos O-acetil na cadeia de xilana indicou substituições em O-2 (14%), O-3 (16%) e O-2,3 (5%) (REICHER *et al.*, 1984).

Em recente trabalho, HAZENDONK *et al.*, 1996, estudando hemiceluloses acetiladas (xilana) de *Linum usitatissimum*, uma angiosperma herbácea (JOLY, 1991), aplicaram técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) a fim de elucidar a localização de grupo acetil nas moléculas de xilana, a partir de espectros bidimensionais, utilizando técnica de HMBC. Como parte conclusiva do trabalho, a xilana linear ligada  $\beta$  (1→4) possui grupos O-acetil substituintes em C-

2 e C-3, com grau de acetilação 0,5. Já OHKOSHI *et al.* (1997), estudaram grupos O-acetil em xilana de *Betula maximowiczii*, a partir de experimentos de  $^{13}\text{C}$ -RMN e HSQC (Heteronuclear Signal Quantum Coherence). Os autores afirmam ainda que não há mudanças na distribuição dos grupos O-acetil quando o material é submetido ao processo de deslignificação pelo método que utiliza clorito de sódio como agente deslignificante.

Considerando os substituintes em AGX, de forma geral, a cada dez unidades de xilose, cerca de sete são substituídas por unidades terminais de 4-O-metilglucurônico, enquanto que uma unidade terminal de arabinose ocorre a cada oito ou nove unidades de xilose (FENGEL & WEGENER, 1989; PULS & SCHUSEIL, 1993). Em hemiceluloses de xilemas, as derivatização de ácidos urônicos, pela inserção de grupos 4-O-metil, é total. Em monocotiledôneas, como acontece na maioria das espécies, os ácidos urônicos não apresentam grupos O-metil ligados (CARPITA, 1996; ASPINALL, 1959; CARPITA & WHITTEN, 1986; WILKIE, 1983).



**Figura 3.** Estrutura química parcial de uma arabinô-4-O-metil glucuronoxilana de gimnosperma.

Fonte: FENGEL & WEGENER (1989).

Arabinoxilanás ácidas, em angiospermas monocotiledôneas, diferem daquelas encontradas para dicotiledôneas. As primeiras são formadas por cadeias de unidades de xilopiranose ligadas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), substituídas por arabinofuranose  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) e/ou  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) e ácido glucurônico ligadas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2).

A razão Xil:Ara neste grupo de vegetais pode chegar até 1:1, o que confere características fisico-químicas distintas daquelas encontradas em coníferas e dicotiledôneas. ANDREWARTHA (1979), cita que a distribuição de grupos arabinosil ao longo da cadeia de xilana é de grande importância, já que afetam a conformação e a capacidade das AGX interagirem entre si e/ou com outros polissacarídeos. Conformação da cadeia e interações intermoleculares influem no comportamento relacionado a certas propriedades físicas e funcionais dessas macromoléculas (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995). As AGX de caules de gimnospermas e angiospermas monocotiledôneas geralmente apresentam solubilidade em meio aquoso, apesar do método extrativo geralmente utilizar soluções alcalinas. Há, no entanto, possibilidade de formação de agregados moleculares (GRUPPEN *et al.*, 1992a).

A massa molecular de AGX, independente do grupo vegetal, apresenta grande disparidade de valores. Em cereais, por exemplo, as massas podem atingir de  $6,5 \times 10^4$  a  $6,6 \times 10^4$  para o trigo, quando obtidos por sedimentação (ANDREWARTHA *et al.*, 1979). Para a mesma espécie, estes valores alcançam  $8,0 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$ , quando avaliados por gel filtração (FINCHER & STONE, 1986),  $7,0 \times 10^5$  -  $1,0 \times 10^6$  (FINCHER & STONE, 1974),  $2,2 \times 10^5$  (GHIRHAMMAR *et al.*, 1986). GHIRHAMMAR & NAIR (1992), utilizando HPLC,

estimou massas moleculares médias de AGX de centeio em valores em torno de  $5,2 \times 10^5$  a  $7,7 \times 10^5$ .

Utilizando técnicas modernas, como análise por espalhamento de luz (“light scattering”), GRUPPEN *et al.* (1992a), reportaram a diferença existente entre as massas moleculares de uma arabinoxilana de trigo extraída com NaOH 1N ( $M_w \approx 8,5 \times 10^5$ ) com suas subfrações obtidas por separação em coluna por troca iônica DEAE-Sepharose CL 6B. As subfrações originadas resultaram em massas moleculares menores que a fração original, variando de  $2,6 \times 10^5$  a  $6,4 \times 10^5$ . Os autores citam que a diferença observada pode ser devida a agregação molecular. Da mesma forma, IZIDORCZYK & BILIADERIS (1995), comentam que, em HPSEC (high pressure size-exclusion chromatography) a estimativa de massas moleculares dependem da técnica, condição do solvente utilizados durante a medida e eventos de agregação das cadeias.

Estudos realizados por espalhamento de luz revelaram que o tempo de armazenamento de frações por pelo menos três anos pode gerar um alto fator de agregação, comprometendo a elucidação das propriedades fisico-químicas de arabinoxilananas (EBRINGEROVA *et al.*, 1994b). No mesmo trabalho, vários solventes apróticos como DMSO, cuoxano, cadoxeno (CdO) e tartarato férrico de sódio, foram utilizados como solventes de AGX. Foram realizadas análises por difusão de luz, onde foram avaliadas as massas moleculares e os raios de gираção de amostras armazenadas durante longos períodos, onde observou-se uma um aumento de agregação proporcional ao tempo de armazenamento da fração.

Cadeias não-substituídas de xilanas  $\beta(1\rightarrow4)$  formam complexos insolúveis, estabilizados pelas interações por pontes de hidrogênio (ANDREWARTHA, 1979). A agregação de moléculas de AGX é limitada pelo impedimento estérico imposto por unidades laterais de arabinosil. A adição dessas unidades parece manter a cadeia em forma estendida e com flexibilidade restrita. Como resultado dessa conformação rígida, as AGX podem exibir alta viscosidade em soluções aquosas (IZIDORCZYK & BILIADERIS, 1995).

O estudo de cinco frações de AGX de trigo, por exemplo, mostrou que o aumento do conteúdo de arabinose reduzia a viscosidade intrínseca da solução, ao mesmo tempo em que se aumentava o conteúdo de grupamentos fenólicos, sendo estes últimos responsáveis pela diminuição do grau de viscosidade (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1994).

Já em gimnospermas, a partir de estimativas realizadas por método de metilação, arabinoxilana de *Abies amabilis* apresentou um grau de polimerização da cadeia principal de xilana  $\beta$  ( $1\rightarrow4$ ) em torno de 100 (SCHWARZ & TIMELL, 1963), enquanto em *Picea engelmanni*, o GP é de 88 (MILLS & TIMELL, 1963).

Deve-se ressaltar que a massa molecular de polissacarídeos pode variar de acordo com a metodologia utilizada na obtenção dos mesmos. Deslignificação e extrações alcalinas são citadas como responsáveis pela clivagem de polissacarídeos (ASPINALL, 1982; WILKIE , 1979). SIMKOVIC *et al.* (1986), descrevem, a partir de análises  $^{13}\text{C}$ -RMN, treze sub-produtos de degradação alcalina de uma arabino-4-O-metilglucuronoxilana. Perdas de unidades de arabinose e ácidos urônicos foram também relatadas.

Estudos de oligossacarídeos produzidos pela ação de enzimas (MCLEAR & MATHESON, 1986) ou tratamento ácido (GOLDSTEIN *et al.*, 1980), podem resultar em respostas conclusivas à respeito da distribuição dos monômeros em torno da molécula. Trabalhos recentes avaliaram oligossacarídeos de AGX de trigo, produzidos pelo tratamento com endo-(1→4)- $\beta$ -D-xilanase I, onde foram analisados por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN (GRUPPEN *et al.*, 1992b). A caracterização dos elementos, que possuíam GP de 3 a 7, reportou análises espectroscópicas bidimensionais de próton, utilizando experimentos de ROESY (Rotating n.O.e. spectroscopy) e HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn), além de f.a.b.-ms e análises de metilação (HOFFMANN *et al.*, 1991; HOFFMANN *et al.*, 1992).

Do mesmo modo, xilo-oligossacarídeos permitem a elucidação estrutural a partir de espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, combinados com espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN (KOVAC & HIRSCH, 1980).

#### **1.4. Interação hemicelulose-polímeros da parede celular**

Muitos autores avaliam a existência de interações entre as hemiceluloses e os outros componentes da parede secundária de espécies dicotiledôneas, como a celulose e lignina (AZUMA *et al.*, 1981; DAS *et al.*, 1981; DAS *et al.*, 1984a e b; JOSELEAU *et al.*, 1993; REICHER, 1984; SJÖSTRÖM, 1993), ou de espécies monocotiledôneas, principalmente gramíneas e cereais, que ainda vêm sendo extensivamente caracterizadas (GRAHAN *et al.*, 1995; KATO & NEVINS,

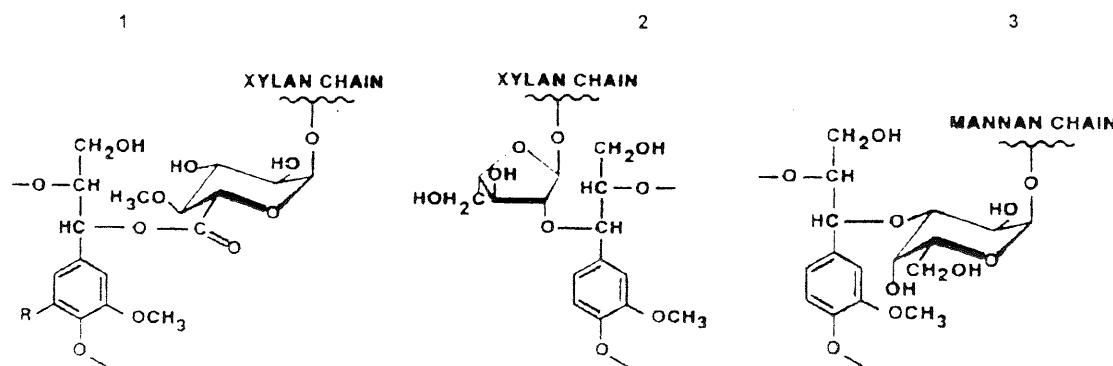
1985; MORRISON, 1974; MARKWALDER & NEUKOM, 1976; MICHNIEWICZ *et al.*, 1990; RYBKA *et al.*, 1993; WALLACE *et al.*, 1995; WENDE & FRY, 1997; WHITMORE, 1974). Com relação a proteínas, o estudos das interações se processa, de forma majoritária, nos polissacarídeos da parede primária de vegetais superiores (EBRINGEROVA, *et al.*, 1994a; KEEGSTRA *et al.*, 1973; SHOWALTER, 1993; VARNER & LIN, 1989).

Existem evidências sobre o tipo de interação envolvendo as hemiceluloses e lignina. A lignina é um biopolímero estrutural, formado por unidades de fenilpropano, constituinte da parede celular de vegetais superiores (SJÖSTRÖM, 1993). Em gimnospermas, podem ser chamadas de “guaiacil lignina”, referência ao produto de polimerização do álcool coniferílico, enquanto que em angiospermas podem ser denominadas “guaiacil-siringil lignina”, um copolímero de unidades de álcool coniferílico e sinapílico (SARKANEN & HERGERT, 1971; SJÖSTRÖM, 1993). Estes dois tipos de lignina podem ser melhor diferenciados com base nos produtos de oxidação com nitrobenzeno. Ligninas de gimnospermas produzem principalmente vanilina e pequenas quantidades de hidroxibenzaldeído, enquanto que em angiospermas, os produtos gerados são siringaldeído e vanilina (SARKANEN & HERGERT, 1971).

Interações entre lignina e carboidratos foram investigados, em caule de *Mimosa scabrella*. Ligações do tipo éster envolvendo a carboxila em C-6 das unidades de ácido 4-O-metilglucurônico com fenólicos constituintes da lignina, onde cerca de 15% do ácido urônico total estaria envolvido com este tipo de

ligação. Ligações do tipo éter também foram investigadas (REICHER & CORRÊA, 1982).

Em caule de outra angiosperma, *Cochruss capsularis*, popularmente conhecida como juta, o grau de esterificação foi estimado em 34% (DAS *et al.*, 1984). Outros trabalhos mostram a possível existência de ligações covalentes do tipo éter entre C-5 das unidades substituintes de arabinose, constituintes de AGX, com grupamentos fenólicos da lignina ou ainda ligações do tipo éter entre o C-3 de unidades substituintes de galactose, que formam as galactoglucomanananas, com os compostos fenólicos (Figura 4).



**Figura 4 .** Exemplos sugeridos de formação de complexo lignina-carboidrato: uma ligação éster de xilana de madeira através de um ácido 4-O-metilglucurônico (1); uma ligação éter através de uma unidade de arabinose (2); uma ligação éter de uma galactoglucomanana através de uma unidade de galactose (3)

Fonte: SJÖSTRÖM (1993).

SUN *et al.* (1998), revelou estudos sobre interação lignina-carboidrato em parede celular de *Musa textilis*, uma monocotiledônea de onde se utiliza as fibras na fabricação de papel, a partir da detecção por FT-IR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) de grupamentos envolvidos nas ligações dos complexos. FILIPPOV (1992), cita que a espectroscopia de FT-IR pode ser útil, em particular, para resolver problemas de identificação de polissacarídeos, checar sua pureza, assim como na investigação de interações intermoleculares.

### **1.5. Aplicações de hemiceluloses**

Hemiceluloses são atualmente muito utilizadas em processos industriais, devido a suas características químicas. São facilmente convertidas a componentes primários, como xilose, xilitol, hidroximetilfurfural e ácido levulínico, na formação de glicol e ácido glicônico (usado na indústria alimentícia como sequestrante de cátions). O principal derivado, xilitol, consiste em polialcool de cinco carbonos, é utilizado como adoçante não-cariogênico em xaropes e balas (WADE & WELLER, 1994; POPA, 1996).

Outro importante emprego de hemiceluloses na indústria consiste na bioconversão de xilose a xilitol, onde *Candida* é considerado um dos principais gêneros de fungos utilizados, considerando o rendimento e otimização do processo (WINKELHAULSEN & KUZMANOVA, 1998). Atualmente, as hemiceluloses apresentam largo emprego na bioconversão enzimática para

produção de etanol. São inúmeros os microorganismos capazes de transformar xilose em etanol, sob condições anaeróbicas. (FEIN *et al.*, 1984; TORGET *et al.*, 1995; POPA, 1996). O trabalho de LASTICK *et al.* (1990), porém, cita que é mais difícil a fermentação de xilose a etanol, do que o mesmo processo para glucose, derivada da celulose.

Hemiceluloses são também aplicadas em processos fotográficos, cosméticos, estabilizantes de cervejas e no melhoramento da qualidade das fibras na produção de papel e celulose (WILKIE, 1983).

A propriedade geleificante de xilanás ácidas foi avaliada, quando introduzida em meio contendo quitosana. Provavelmente, a complexação entre ácido glucurônico da xilana e o grupamento amino da quitosana é a responsável pela formação do hidrogel (GABRIELLI & GATENHOLM, 1998).

Na área farmacológica, muitos estudos estão sendo desenvolvidos no teste da atividade biológica de hemiceluloses e oligossacarídeos derivados das mesmas, principalmente como atividade antitumoral (RAIDARU *et al.*, 1997; MAEDA *et al.*, 1998; POPA, 1996; WANG & ZHENG, 1997).

Em diferentes tipos de organismos, os polissacarídeos podem apresentar potencial como indicadores quimiotaxonômicos. Em fungos, por exemplo, GORIN & SPENCER (1970), apresentaram uma discussão taxonômica de diversos gêneros, a partir da identificação, por espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN, de oligossacarídeos produzidos pela hidrólise de mananas e glucanas (hidrólise parcial e enzimólise) da parede celular.

Já em líquens, IACOMINI & SCHNEIDER (1985), relataram um estudo comparativo envolvendo três diferentes espécies do gênero *Cladonia*, onde utilizaram galactomananas como fonte principal do estudo. A continuação da pesquisa envolveu o estudo de outras espécies do gênero *Cladonia* (WORANOWICZ *et al.*, 1997). A perspectiva do emprego de galactoglucomananas existentes em líquens foi investigada em *Cladonia ibitipocae* e *Cladonia substellata* (WORANOWICZ *et al.*, 1998).

Galactomananas de endosperma de *Schizolobium parahybae* e *Schizolobium amazonicum* foram utilizadas como parâmetro taxonômico, de acordo com o padrão de oligossacarídeos produzidos por hidrólise ácida parcial (PETKOWICZ *et al.*, 1998).

Paredes celulares de vegetais superiores apresentam diferenças básicas, de acordo com o grupo vegetal. Desta forma, as gimnospermas, angiospermas mono e dicotiledôneas possuem diferentes polissacarídeos estruturais (CARPITA, 1996; FENGEL & WENGER, 1989; SJÖSTRÖM, 1993).

## 1.6. O gênero *Podocarpus*

### a) Características ecológicas

O gênero *Podocarpus* é um representante da família Podocarpaceae, ordem Coniferales e divisão gimnosperma (JOLY, 1991). Dentre as oito espécies encontradas no Brasil, *Podocarpus lambertii* é a de maior ocorrência (Figura 5),

sendo que no Paraná, aparece de forma dispersa, formando maciços puros, com elevado número de indivíduos por unidade de área (INOUE *et al.*, 1984; MAINIERI & PIRES, 1973). *P. lambertii* habita preferencialmente a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), nas formações Aluvial (galeria), Montana e Alto-Montana. É encontrada também na Floresta Estacional Decidual Montana, na região central da Bahia, nos campos rupestres ou de altitude e na Estepe Gramíneo-Lenhosa, onde se dá o início da formação dos capões de mata (CARVALHO, 1994; INOUE *et al.*, 1984).



**Figura 5.** Representante de *Podocarpus lambertii*.

Fonte: LORENZI (1992).

Outra espécie do gênero, nativa do Estado do Paraná é *Podocarpus selowii*, porém com ocorrência bastante reduzida quando comparada com *P. lambertii*. Esta encontra-se na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) e na Floresta Amazônica (JOLY, 1991; MAINIERI & PIRES, 1973). As características morfológicas e reprodutivas de *P. selowii* são muito semelhantes á *P. lambertii*, exceto a dimensão foliar, que atinge de 5-9 cm de comprimento (MAINIERI & PIRES, 1973).

### **b) Características morfológicas**

São plantas dioicas de 8-14 m de altura, com tronco de 30 a 60 cm de diâmetro, com folhas coriáceas, de 2-4 cm de comprimento (Figura 6). A ramificação é monopodial quando jovem, formando copa cônica e dicotômica (simpodial), com galhos grossos e longos nas árvores adultas (CARVALHO, 1994; LORENZI, 1992).



**Figura 6.** Característica foliar de *Podocarpus lambertii*

Fonte: INTERNET

As flores femininas são terminais, em ramos curtos especiais. Os óvulos são anátropes com um envoltório carnoso na base, que se desenvolve na semente madura, como um pedúnculo carnoso (proporcionando a origem do nome do gênero). As flores masculinas são reunidas em densos estróbilos alongados, em geral, nascendo em fascículos de vários estróbilos (CARVALHO, 1994).

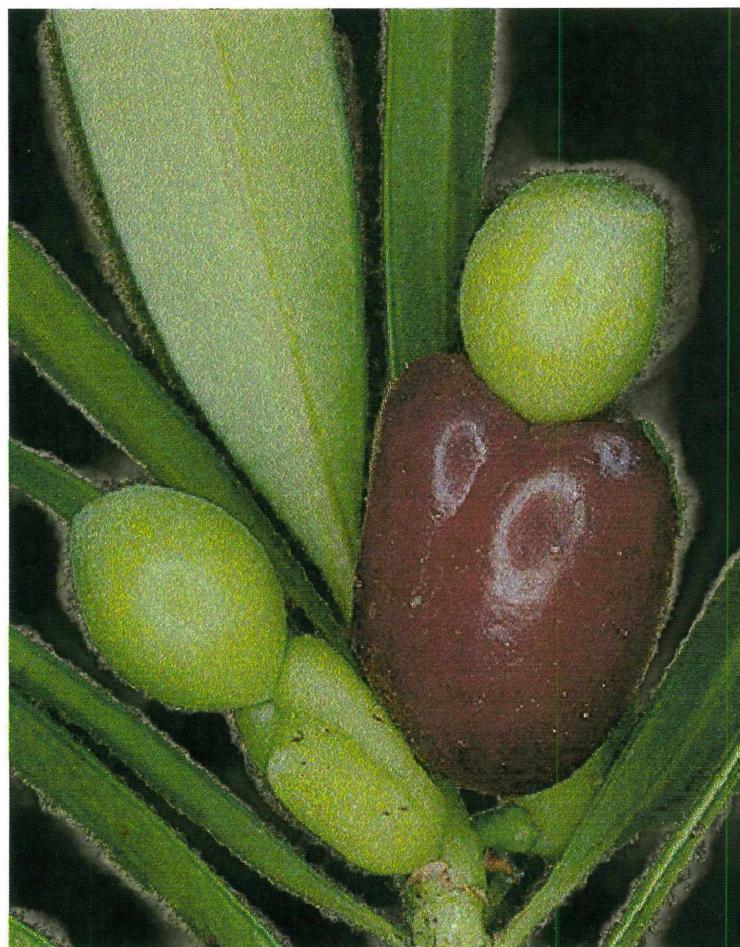
### c) Aplicações da madeira

A madeira de *P. lambertii* encontra muitas utilizações. Usada em embalagens, molduras, ripas, guarnições, carpintaria comum, tábuas para forros, caixaria, lápis e palitos de fósforo, brinquedos, marcenaria, caixa de ressonância, compensado, laminado, aglomerado e instrumentos musicais. Espécie adequada para produção de papel, principalmente para fibra longa (CARVALHO, 1994; INOUE et al., 1984). Apresenta baixa resistência ao ataque de cupins e seu crescimento é lento, o que impede um uso mais extensivo da espécie para fins comerciais (CARVALHO, 1994; LORENZI, 1992).

### d) Características evolutivas

As espécies da família Podocarpaceae são, morfologicamente e ecologicamente, a mais diversa de todas as coníferas (KELCH, 1998). Apresentam características incomuns às gimnospermas, como a formação do epímácia, um envoltório carnoso unido ao cone (JOLY, 1991) ou estrutura de suporte do óvulo (KELCH, 1998), característica que provoca, há vários anos, controvérsias em torno de seu processo evolutivo dentro das gimnospermas e sua real classificação botânica (Figura 7). FLORIN (1954), interpreta o cone como sendo homólogo à escala ovulífera de outras coníferas, como da família Pinaceae. No entanto, *Podocarpus* lança uma controvérsia, quando se considera

o epimácia como um perianto ou um segundo integumento do óvulo de angiospermas (KELCH, 1998; TOMLINSON, 1992).



**Figura 7.** Cone de *Podocarpus sp.*

Fonte: INTERNET

STOFFBERG (1991), cita o desenvolvimento do óvulo como um primórdio de uma estrutura inicial na escala das sementes. Dentro do enfoque evolutivo, fósseis encontrados do gênero *Podocarpus* datam do Período Cretáceo, muito antes, portanto, do surgimento de muitas angiospermas (KRASSILOV, 1974).

Um indicador taxonômico, utilizando componentes estruturais da lignina, podem ser atribuídos para o gênero *Podocarpus*. A oxidação com nitrobenzeno, usada para determinar subprodutos característicos para grupos vegetais rende, para gimnospermas, quantidades elevadas de metoxil, guaiacil e hidroxifenil propano. Em angiospermas, o conteúdo destes compostos é pequeno, enquanto que os teores de siringaldeído apresentam-se elevados (SARKANEN & HERGERT, 1971). No entanto, algumas espécies de *Podocarpus*, como *P. totara*, *P. amarus* e *P. pedunculatus*, são contituídas de quantidades significativas de unidades de siringaldeído.

## JUSTIFICATIVAS

As propriedades estruturais de hemiceluloses de xilema foram extensivamente estudadas entre as décadas de 50 e 70, permanecendo as décadas seguintes, até os dias atuais, com poucos trabalhos envolvendo o mesmo tema, principalmente considerando as grandes possibilidades abertas pelo avanço tecnológico dos equipamentos hoje utilizados. Hemiceluloses de xilema de espécies gimnospermas carecem de ampla revisão de suas estruturas químicas, determinadas até então por métodos químicos de análise.

As três espécies representativas de coníferas nativas do Brasil são *Araucaria angustifolia*, *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus se lowii*, sendo as duas últimas praticamente ausentes de trabalhos científicos, principalmente com relação aos aspectos estruturais das hemiceluloses.

Entretanto, o gênero *Podocarpus* é, também, extensivamente estudado em suas características morfológicas, devido a peculiaridade observada, originando diversas discussões em torno de sua taxonomia. Os estudo das hemiceluloses pode contribuir para este entendimento, pela potencialidade como indicador quimiotaxonômico.

## **2. Objetivos**

---

## Objetivo Geral

Obter e caracterizar estruturalmente as frações hemicelulósicas de *Podocarpus* e relacionar os resultados obtidos com aqueles registrados em literatura para gimnospermas e angiospermas.

## Objetivos específicos

- a. Extrair as hemiceluloses de *P. lambertii* e *P. se lowii* e determinar as composições monossacarídicas.
- b. Determinar as condições de deslignificação com clorito de sódio do caule de *P. lambertii* e avaliar a interferência dos grupos fenólicos da lignina em diversos métodos de dosagens de proteínas.
- c. Determinar a melhor condição de obtenção de hemiceluloses de caule de *P. lambertii* deslignificado, utilizando hidróxido de sódio e/ou hidróxido de potássio em diferentes concentrações.
- d. Purificar as frações através de métodos químicos e cromatográficos.
- e. Caracterizar estruturalmente as frações principais.
- f. Discutir e avaliar a taxonomia de *Podocarpus sp.*, assumindo como parâmetros comparativos as hemiceluloses e aspectos morfológicos e anatômicos das espécies.

### **3. Materiais e Métodos**

---

### 3.1. Métodos gerais

A seção de tronco utilizada foi descascada e pulverizada em moinho WILLEY, com granulometria de 200 mesh.

Para precipitação dos polissacarídeos, foi utilizado etanol com grau de pureza comercial.

Para a remoção de solventes foi utilizado rotaevaporador à vácuo, utilizando temperaturas entre 40 e 50°C

As análises de acetatos de aldítóis foram obtidas por cromatografia líquido-gasosa (g.l.c.), em cromatógrafo HP 5890 II, coluna capilar DB-225, com detector por ionização de chama (FID) e temperaturas de 250 e 300°C para o injetor e detector, respectivamente. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a 2 mL/min. A quantificação dos picos foi obtida por integrador HP acoplado ao cromatógrafo.

Os derivados metilados foram analisados em um cromatógrafo a gás VARIAN 3300, acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN MAT (g.c.-m.s., utilizando coluna capilar DB-225 e hélio ultrapuro como gás de arraste, com fluxo de 2 mL/min e temperatura do detector a 220°C. A integração dos picos foi obtida pelo software ITDS 4.10.

Os espectros de infravermelho (IR) foram obtidos em aparelho BECKMAN ACCULAB™ 10. As amostras, solúveis em clorofórmio foram analisadas em células de NaCl. A secagem das amostras para análise espectrofotométrica em infravermelho foi feita em estufa à vácuo EGDCOM 5P à temperatura ambiente.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono treze ( $^{13}\text{C}$ -RMN e DEPT) foram obtidos em aparelho BRUCKER AC-400, a 101,6 MHz acoplado a transformador de Fourier. As análises foram realizadas em amostras solubilizadas em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou hidróxido de sódio deuterado ( $\text{NaOH}$  1% em  $\text{D}_2\text{O}$ ), em tubos de 0,5 cm de diâmetro e temperatura de análise a 303 K. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm.

As dosagens de açúcar total foram determinadas pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando curvas padrão de xilose e manose, em comprimentos de onda a 480 e 490 nm, respectivamente.

Ácidos urônicos foram dosados utilizando o método descrito por BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973, com padrão de ácido glucurônico e leituras em comprimentos de onda de 520 nm.

Três métodos colorimétricos para dosagens de proteínas foram utilizados. O método descrito por BRADFORD (1976) (leitura das absorbâncias em 595 nm); o método descrito por HARTREE (1972), em comprimentos de onda a 650 nm, também utilizado para as dosagens de compostos fenólicos. Por último, o método descrito por PETERSON (1977), a 750 nm. Para todos os métodos colorimétricos para dosagem de proteína utilizou-se curva padrão de soroalbumina bovina (BSA).

Para dosagem de compostos fenólicos, curvas de ácido coniferílico e siringaldeído foram utilizadas.

Foi realizado também dosagem de proteínas utilizando método titulométrico de Kjeldahl (KABAT & MAYER, 1964). Esta determinação foi realizada no

Laboratório de Nutrição Mineral do Departamento de Solos desta Universidade, assim como as dosagens dos minerais fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), cálcio (Ca) e teor de cinzas.

Os teores de lignina em *P. lambertii* e *P. selowii* foram determinados utilizando-se metodologia descrita por ADAMS, 1965, a partir da obtenção da Klason-lignina.

As determinações espectrofotométricas para a região do visível foram realizadas em aparelho SPECTRONIC 20 GENESYS. Para a região do ultravioleta, foi utilizado o aparelho HITACHI U-2001.

As análises de homogeneidade foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) WATERS 2410, detector por índice de refração (RI), em série com detector de espalhamento de luz, utilizando quatro colunas WATERS dispostas de forma sequencial e apresentando diferentes limites de exclusão ( $1 \times 10^6$  (coluna 2000);  $4 \times 10^5$  (coluna 500);  $8 \times 10^4$  (coluna 250) e  $5 \times 10^3$  (coluna 120)). As colunas são alimentadas pelos solventes através de bomba peristáltica WATERS 515.

A filtração das amostras para utilização em HPLC e espalhamento de luz foram feitas em aparelho de ultrafiltração SARTORIUS com pressão máxima de 2 kgf/cm<sup>2</sup>, em membranas SARTORIUS ou MILLIPORE, apresentando porosidade 0,22 µm para uso em HPLC e 0,45 µm para espalhamento de luz.

As fotografias das lâminas de xilema de *P. lambertii* foram realizadas no laboratório de Anatomia da Madeira da Escola de Florestas da UFPR.

### **3.2. Obtenção do material de pesquisa**

Uma árvore de *Podocarpus lambertii* com oito anos de idade, seis metros de altura e DAP (diâmetro a altura do peito) de 15 cm, com aspectos morfológicos adequados para a espécie, foi abatida pelo autor (Engenheiro Florestal), junto a área localizada no município de Bocaiúva do Sul, região metropolitana de Curitiba, local onde são encontrados maciços de pinheiro-bravo.

A amostra de tronco de *Podocarpus se lowii* foi obtida e identificada pelo Engenheiro Florestal Prof. Dr. Carlos Vellozo Roderjan, que coletou o material na região de Guaraqueçaba, local de ocorrência natural da espécie. A árvore abatida possuía 11 anos de idade cerca de sete metro de altura, com DAP de 15 cm.

### **3.3. Obtenção da holocelulose**

O material, previamente moído e seco, foi deslipidificado em aparelho SOXHLET, em solvente tolueno-etanol com proporção de 2:1, durante 48 horas.

O resíduo, livre de extractivos lipídicos, foi submetido ao processo de deslignificação descrito por TIMELL (1965a). As proporções de reagentes utilizadas na deslignificação foram calculados em relação a 30 g de material a ser extraído. Desta maneira, o material moído, juntamente com 490 mL de água destilada foram adicionados em um kitasato, sob aquecimento, até atingir 65°C. Adicionou-se ao sistema 3,5 mL de ácido acético glacial e 24,5 mL de clorito de sódio 40% m/v,

aplicando-se vácuo imediatamente. Após uma hora, nestas condições, a mesma quantidade de ácido acético e clorito de sódio foi adicionada, permanecendo por mais cinco horas na mesma temperatura. O método modificado, sugerido neste trabalho, exclui a segunda etapa de adição de reagentes, permanecendo todas as outras condições de extração constantes.

Ao término desta extração, o resíduo contendo celulose e hemicelulose (material holocelulósico) foi filtrado, lavado com etanol 95%, duas vezes consecutivas com etanolamina alcoólica 3% v/v e, finalizando, nova lavagem com etanol 95%, sendo todas estas etapas realizadas com solventes sob ebulação, procedendo as lavagens por 3 minutos, em refluxo (GREEN, 1963).

### **3.4. Obtenção dos polissacarídeos**

O material, deslignificado ou não, foi submetido à diferentes procedimentos de extração polissacarídica, a partir de estratégias pré-definidas. Foram realizadas extrações sequenciais com EDTA, água, KOH, NaOH e outra, isoladamente, com DMSO, conforme descrito nos fluxogramas I, II, III e IV (pág. 52, 56, 63 e 66).

As soluções hemicelulósicas foram neutralizadas com ácido acético a pH 5,0, dialisadas contra água corrente para eliminação do sal (48 horas), seguidas de redução do volume para cerca de 10 mL. Aproximadamente 3 a 4 volumes de etanol foram utilizados para precipitar os polissacarídeos. O conteúdo foi centrifugado (5.000 r.p.m., 15 min.) e precipitado com etanol absoluto.

### **3.5. Hidrólise ácida total de hemiceluloses**

Cerca de 10 mg de material hemicelulósico foram utilizados para a realização de hidrólise ácida com TFA 1N, em tubos hermeticamente fechados, durante 5 horas em banho de água fervente (ADAMS, 1965). Os produtos foram evaporados em capela.

Outra hidrólise, descrita por SAEMAN (1954), foi utilizada para os resíduos celulósicos finais das extrações alcalinas. Cerca de 10 mg de material foi submetido a uma pré-hidrólise ácida, com tempos variáveis (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 horas) com ácido sulfúrico 72% m/v em gelo, seguida por diluição do ácido a 8% m/v, em banho fervente, por 5 horas. O material foi neutralizado com carbonato de bário e filtrado.

### **3.6. Redução dos monossacarídeos**

Os monossacarídeos foram reduzidos pela adição de cerca de 10 mg de boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) (WOLFROM & THOMPSON, 1963b). Após duas horas foi adicionado resina catiônica DOWEX 50W-X 8-H<sup>+</sup> para remoção dos íons Na<sup>+</sup> (até pH 5,0). As soluções foram filtradas e o solvente evaporado à vácuo. Metanol foi adicionado ao resíduo e o borato de metila formado, evaporado à vácuo.

### **3.7. Acetilação dos alditóis**

Os alditóis foram acetilados pela adição de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina, em tubos vedados, permanecendo durante cerca de 10 horas à temperatura ambiente (WOLFROM & THOMPSON, 1963a).

A reação foi interrompida adicionando-se água gelada, sendo a seguir procedida a extração dos acetato de alditóis, através da adição de clorofórmio e posterior eliminação de piridina em tratamentos sucessivos com sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 5% e água destilada.

Os acetatos de alditóis formados foram submetidos à cromatografia líquido-gasosa (g.l.c) para análise da composição monossacarídica.

### **3.8. Fracionamento de polissacarídeos**

#### **3.8.1. Fracionamento de polissacarídeos da frações H1aT e KOH1a por solubilidade em água**

Cerca de 200 mg das frações H1aT e KOH1a foram dissolvidas em 2 mL de água destilada e congeladas. Após descongelamento os materiais foram centrifugados em microcentrífuga (12.000 rpm, 3 min). Os precipitados, secos em estufa à vácuo a 25°C, geraram as frações H1aT-água(ins) e KOH1a-água(ins), enquanto o sobrenadante foi precipitado com excesso de etanol, centrifugado

(5.000 r.p.m., 15 min.) e seco em estufa à vácuo a 25°C, gerando fração H1aT-água(sol) e KOH1a-água(sol).

### **3.8.2. Precipitação de polissacarídeos ácidos da fração H1aT-água(sol) utilizando CETAVLON (brometo de hexadeciltrimetilamônio)**

A fração H1aT-água(sol) foi submetida ao tratamento com sal de amônio quaternário (CETAVLON), conforme descrito por SCOTT, 1965, a fim de precipitar seletivamente arabinoxilanás ácidas do material hemicelulósico. Uma solução de CETAVLON 1 g% (50 mL) foi adicionada a uma solução polissacáridica 0,5 g% m/v (100 mL). Cerca de 1,5 mL de sulfato de sódio 1 M foi adicionado ao sistema (solução final 0,015 M) a fim de incrementar a agregação do complexo. O sistema permaneceu durante 30 minutos sob agitação, sendo a seguir centrifugado (15.000 r.p.m., 20 min.) e o precipitado submetido a três tratamentos sucessivos com NaCl 2M para descomplexação. A solução foi dialisada durante três dias e liofilizada, gerando a fração H1-aTcetavlon.

### **3.8.3. Purificação de polissacarídeos ácidos da fração KOH1a-água(sol), utilizando hidróxido de bário**

Cerca de 300 mg da fração KOH1a-água(sol) foram submetidas ao processo de fracionamento de arabinoxilanás ácidas e glucomananás, através do método

descrito por MEIER (1965). Cerca de 300 mg de uma solução polissacarídica 1 g%, contendo 5 mg de NaBH<sub>4</sub>, foram adicionado a 30 mL de uma solução saturada (previamente filtrada em papel filtro) de Ba(OH)<sub>2</sub>. Após 10 minutos, o precipitado, constituído por polissacarídeos contendo manose, foi separado por centrifugação (5.000 r.p.m., 15 min.) e exaustivamente lavado com etanol absoluto, até atingir a neutralidade. O material foi seco em estufa à vácuo a 25°C, gerando a fração **KOH1a-bário(ppt)**. O sobrenadante da reação foi neutralizado com ácido acético 50% e dialisado durante 48 horas. A solução teve seu volume reduzido a 10 mL, sendo a seguir precipitada com 4 volumes de etanol absoluto, centrifugada (5.000 r.p.m., 15 min.). O precipitado formado foi seco em estufa à vácuo a 25°C, gerando a fração **KOH1a-bário(sol)**.

#### **3.8.4. Cromatografia de gel permeação em Sephadryl S-200**

Foram utilizados 100 mg da fração **KOH1a-água(sol)** (Fluxograma IV) dissolvidas em 2 mL de água destilada. A solução foi aplicada no topo da coluna contendo o gel (coluna 1,5 x 32,0 cm) de Sephadryl S-200 e eluída com água destilada, sob fluxo de 0,5 mL/min. Tubos contendo cerca de 2 mL de material eluído forma monitorados em seu conteúdo de açúcar (DUBOIS *et al.*, 1956). As frações obtidas foram submetidas a análise de composição monossacarídica e teste de homogeneidade. A fração com maior rendimento e menor quantidade de

contaminantes foi submetida a análise de sua estrutura e recebeu a denominação **KOH1a-col.**

### **3.9. Teste de homogeneidade das frações eluídas em coluna**

As frações eluídas da coluna de gel permeação foram analisadas em HPLC acoplado a espalhamento de luz. Para cada fração foram utilizadas 5 mg de material previamente filtrado em membranas MILLIPORE 0,2  $\mu\text{m}$ , em nitrito de sódio 0,1N e azida de sódio 200 ppm dissolvidos em água milliQ. Foram injetados em HPLC, 150  $\mu\text{L}$  de solução, com fluxo de 0,6 mL/min.

### **3.10. Determinação das massas moleculares das frações NaOH-a e NaOH-b por espalhamento de luz.**

Soluções de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg/mL das frações NaOH-a e NaOH-b, em solvente NaOH 0,5 M, previamente filtradas em membranas MILLIPORE 0,4  $\mu\text{m}$ , foram inseridas em viais de vidro (rigorosamente limpos) a fim de proceder as análises por espalhamento de luz.

Cada vial foi acoplado ao equipamento e submetido à técnica de espalhamento de luz por múltiplos ângulos, para construção do Plot de Zimm. O valor de  $\text{dn/dc}$  utilizado como parâmetro foi de uma xiloglucana, também uma hemicelulose extraída em álcali, com valor de 0,172.

### **3.11. Oxidação com metaperiodato de sódio**

A fração **NaOH-a** foi dissolvida em água destilada (60 mg/10 mL) à qual foi adicionado mais 10 mL de solução de metaperiodato de sódio 0,1 N (GUTHRIE, 1962). O meio reagente permaneceu durante sete dias à temperatura ambiente, sob agitação, no escuro. O processo foi interrompido pela adição de 0,5 mL de etilenoglicol, para decomposição do excesso do agente oxidante. A solução foi dialisada durante dois dias e seu volume reduzido a 10 mL. A amostra foi dividida em duas alíquotas de igual volume, sendo a primeira submetida à hidrólise, redução, acetilação e análise em g.l.c. A segunda foi submetida a nova etapa de oxidação, nas mesmas condições já descritas, sendo por fim analisada em g.l.c.

### **3.12. Polarimetria**

As frações **NaOHa** e **H1aT-água(sol)** foram submetidas a análises polarimétricas em um aparelho RUDOLPH RESEARCH AUTOPOLO III. Foram preparadas soluções polissacarídicas (10 mL) de concentração 0,5 g% em solvente NaOH 1% m/v (**NaOHa**) e água (**H1aT-água(sol)**). As soluções foram inseridas em cilindros de vidro de 10 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro.

A rotação óptica específica foi determinada como segue:

$$[\alpha]^{25}_{\text{D}} = \frac{\alpha}{d \times c} \times 100 \quad \text{onde,}$$

$\alpha$  = leitura no aparelho

d = comprimento do caminho óptico (dm)

c = concentração da solução (g%)

### 3.13. Análises de metilação

#### 3.13.1. Metilação da fração NaOH-a

##### Método de Haworth

Foram utilizados 60 mg da fração NaOH-a (Fluxograma IV) para o procedimento de pré-metilação, utilizando método de Haworth (HAWORTH, 1915; HIRST & PERCIVAL, 1960). A amostra foi solubilizada em 10 mL de solução NaOH 40%. Ao sistema foi adicionada cerca de 5 mg de NaBH<sub>4</sub>. A seguir foram acrescentados sucessivamente ao sistema, sob constante agitação e temperatura ambiente, alíquotas de 0,5 mL de dimetil sulfato em intervalos de 30 minutos, por sete repetições. A reação permaneceu durante 12 horas, quando o meio foi neutralizado com ácido acético, em gelo, sendo posteriormente dialisado contra água corrente por 72 horas e posteriormente seco à vácuo.

### **Método de Ciucanu**

O material parcialmente metilado foi submetido a metilação pelo método descrito por CIUCANU & KEREK (1984). Foi adicionado a amostra seca 1 mL de DMSO e após solubilização, cerca de 40 mg de NaOH rigorosamente seco e pulverizado. Após 10 minutos de constante agitação em vortex, adicionou-se ao meio 0,5 mL de iodeto de metila, permanecendo em agitação por 6 minutos seguido pela neutralização com adição de gelo e gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 N. Os produtos metilados foram extraídos do meio com clorofórmio e submetidos a sucessivas lavagens com água destilada.

A amostra seca foi analisada por espectroscopia de infravermelho. A existência de bandas referentes a grupamentos hidroxila motivou duas repetições do mesmo método. Após metilação completa o polissacarídeo foi submetido à hidrólise de Saeman (item 3.5.), reduzido, acetilado e analisado em gc.-m.s.

#### **3.13.2. Metilação da fração H1aTágua(sol)**

A fração H1aTágua(sol), solúvel em DMSO, foi submetida diretamente ao método de metilação descrito por CIUCANU & KEREK (1984), conforme descrito anteriormente.

### 3.14. Metanólise

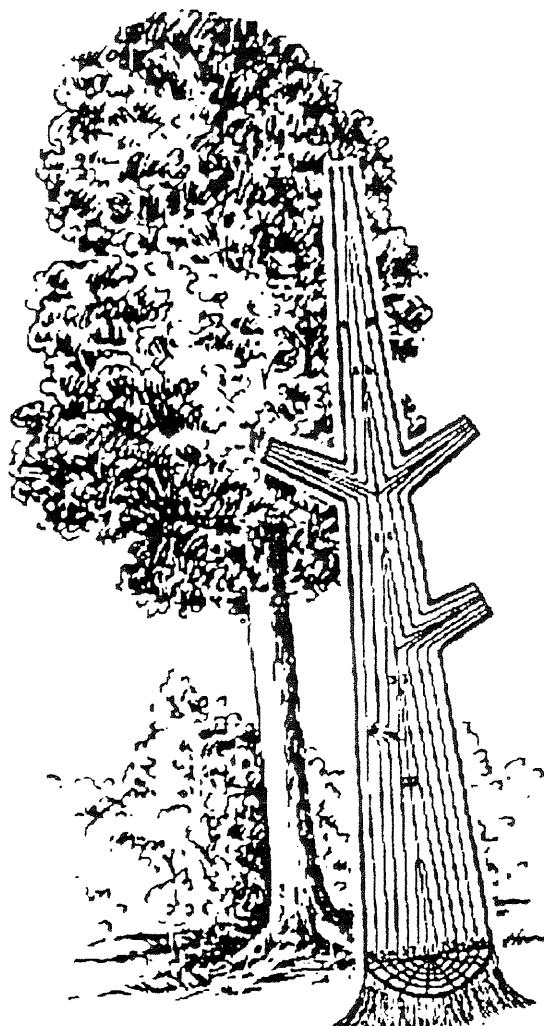
Aproximadamente 2 mL de metanol saturado com HCl gasoso foi inserido ao tubo de hidrólise contendo o polissacarídeo metilado. A solução permaneceu em banho a 65°C durante duas horas quando foi interrompida pela adição de carbonato de prata até neutralidade. O cloreto de prata formado, insolúvel, foi separado por filtração. A solução filtrada contendo o material metanolisado foi submetida a hidrólise ácida com  $H_2SO_4$  0,5 N durante 6 horas a 100°C, em estufa. A solução foi neutralizada com carbonato de bário e filtrada. Os monossacarídeos parcialmente metilados foram reduzidos, acetilados e finalmente, analisados em g.c.-m.s.

## **4. Resultados e Discussão**

---

#### 4.1. Obtenção e caracterização geral do material de pesquisa

A escolha da seção do tronco utilizada durante o trabalho, para ambas as espécies, esteve de acordo com modelo de crescimento existente para os vegetais arborescentes. Segundo KOSLOWSKI (1971), as camadas de crescimento no tronco são como um série de cones sobrepostos uns sobre os outros (Figura 8). Por isso é importante, por exemplo, para se determinar a idade de uma árvore, que a amostra seja retirada a pouca altura do fuste.



**Figura 8.** Disposição esquemática das camadas de crescimento no tronco

Fonte: KOSLOWSKI (1971).

Da mesma maneira, amostras contendo todas as idades de uma árvore devem, para fins científicos, minimizar erros referentes a variação ambiental, possibilitando resultados mais representativos para a espécie estudada. Partindo deste princípio, as seções escolhidas, para as duas espécies, foram de 50 cm, partindo-se da base do tronco.

A madeira é constituída por material polissacarídico da parede celular (celulose e hemiceluloses), lignina, proteínas (geralmente localizados em células de parênquima (SJÖSTRÖM, 1993), extractivos e minerais (cinzas).

As amostras de madeira moída de *P. lambertii* e *P. selowii* foram submetidas às determinações de seus constituintes não-polissacarídicos. O conteúdo de lignina (lignina Klason) foi de aproximadamente 32%, estando de acordo com os teores de lignina de outras coníferas (SARKANEN & HERGERT, 1971).

A composição mineral foi determinada para as duas espécies. O total de cinzas foi de 0,6 e 0,7 % para *P. lambertii* e *P. selowii*, respectivamente, sendo compatíveis com outras gimnospermas estudadas (STERK *et al.*, 1987). Deste total, foram determinados espectrofotometricamente, os teores de potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), como mostrado na Tabela II.

**Tabela II.** Composição dos minerais em xilema de *P. lambertii* e *P. selowii*

	Composição (g %)	
	<i>P. lambertii</i>	<i>P. selowii</i>
<b>Potássio (K)</b>	0,09	0,06
<b>Fósforo (P)</b>	0,04	0,01
<b>Cálcio (Ca)</b>	0,22	0,24
<b>Magnésio (Mg)</b>	0,04	0,04

A quantidade de extrativos de *P. lambertii* e *P. selowii* foi de 1,0 e 1,2%, respectivamente. Os teores de extrativos podem reunir diversos componentes, como lipídeos, taninos e resinas. Algumas coníferas apresentam alto conteúdo de extrativos, como *Pinus eliottii* e em outras praticamente encontram-se ausentes, como em *Araucaria angustifolia*. Os extrativos não constituem portanto, uma característica inerente ao grupo vegetal.

O conteúdo de proteínas no xilema, determinado pelo método de Kjeldahl, para *P. lambertii* e *P. selowii*, foi de 0,21 e 0,08 %, respectivamente, compatível com os teores normais de proteínas encontrados em parede secundária de vegetais superiores (FOSKET, 1994).

Deve-se ressaltar que, para dosagens de proteínas em hemiceluloses, são utilizados métodos colorimétricos, como os descritos por BRADFORD (1976) e HARTREE (1972). Entretanto, os resultados obtidos por estes métodos, para frações hemicelulósicas obtidas com prévia deslignificação, mostraram-se

incompatíveis com aqueles esperados para material constituinte de parede secundária, resultando em teores próximos a 17% (Tabela III). Esta superestimativa foi atribuída aos compostos fenólicos constituintes da lignina, presentes nas frações hemicelulósicas. O método descrito por PETERSON (1977), que elimina a presença de compostos fenólicos, rendeu teores em torno de 2,5%, comprovando a interferência destes compostos nas dosagens de proteínas pelos métodos de Hartree e Bradford.

**Tabela III.** Dosagem de proteínas em hemiceluloses de *P. lambertii* e *P. selowii* utilizando-se três métodos colorimétricos.

<b>Método</b>	<b>Composição (%)</b>	
	<i>P. lambertii</i>	<i>P. selowii</i>
<b>BRADFORD</b>	17,0	17,6
<b>HARTREE</b>	17,4	17,8
<b>PETERSON</b>	2,3	2,5

Foram realizadas três diferentes curvas de calibração, utilizando os padrões de fenólicos (ácido salicílico e siringaldeído) e um padrão de proteína (BSA), para o método de Hartree e Bradford.

Observa-se na Figura 9, relativa ao método de Hartree, um padrão linear de resposta para os três compostos utilizados. Este comportamento deve estar

relacionado com o reagente utilizado pelo método (reagente de Folin), também usado nas determinações colorimétricas de fenólicos (FOLIN & DENNIS, 1912).

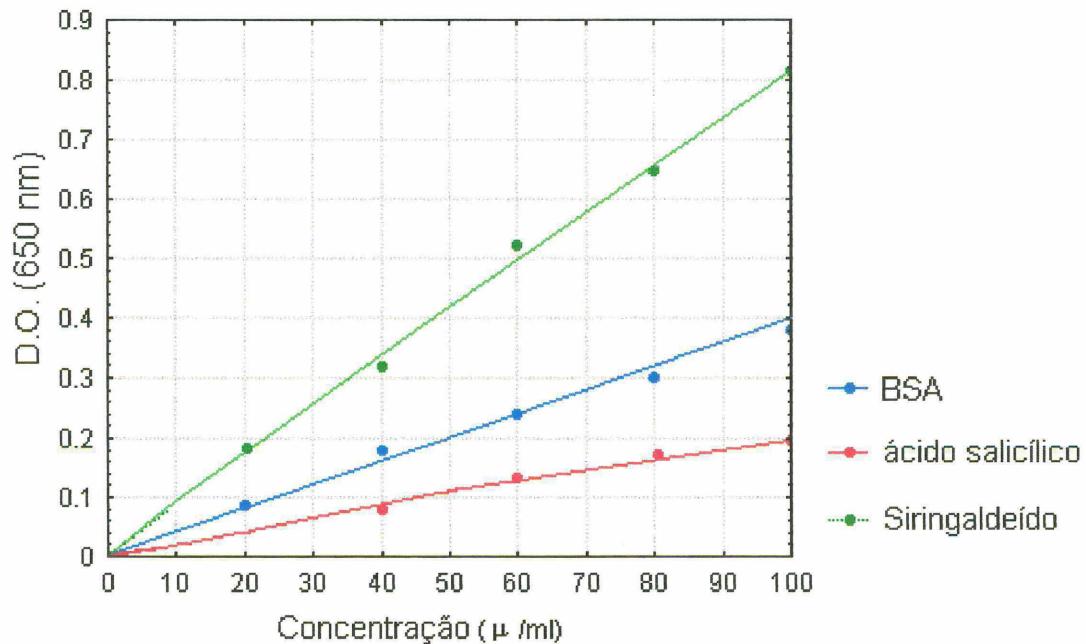
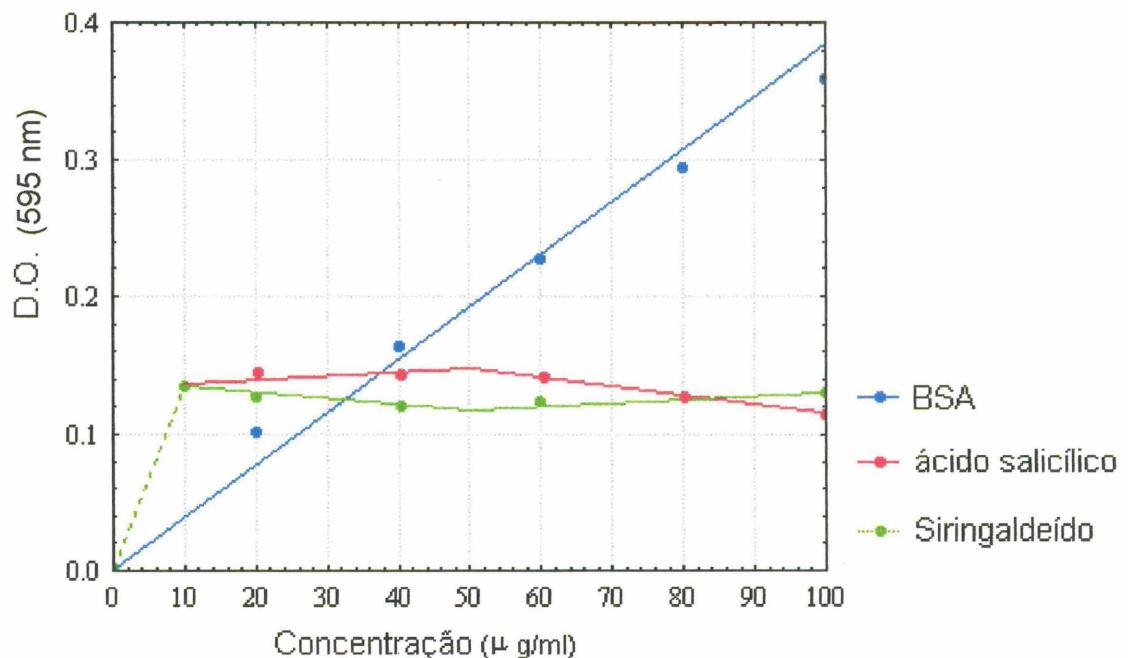


Figura 9. Curvas de calibração dos padrões BSA, ácido salicílico e siringaldeído, utilizando o método de Hartree.

Para o método de Bradford, observou-se um platô nas concentrações utilizadas, ou seja, acima de 10 mg/mL (Figura 10). Este experimento será repetido utilizando-se concentrações de padrões de fenólicos menores que 10 mg/mL, a fim de investigar a aplicação do método de Bradford para microdosagem de fenólicos.

Desta maneira, materiais contendo quantidades significativas de compostos fenólicos são inapropriados para serem submetidos a dosagens de

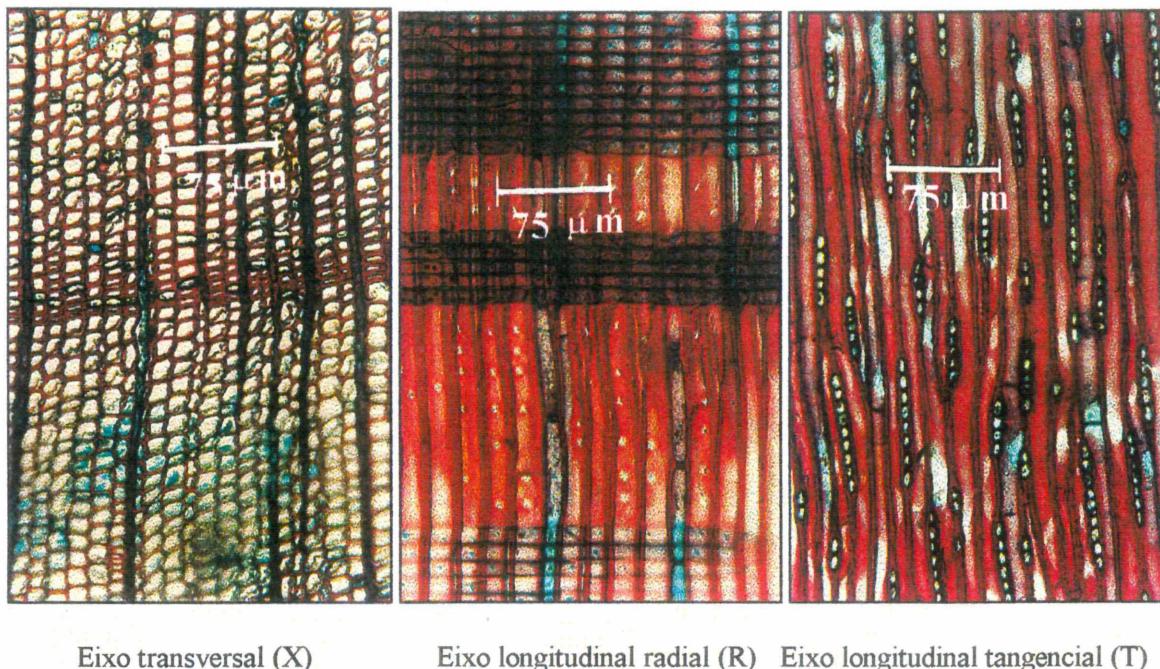
ser empregado o método de Peterson. Por outro lado, o método de Hartree mostrou-se reproduzível nas dosagens de fenólicos, sendo, desta maneira, empregado no decorrer do trabalho.



**Figura 10.** Curvas de calibração dos padrões BSA, ácido salicílico e siringaldeído, utilizando o método de Bradford.

Foram realizadas microfotografias da anatomia da madeira de *Podocarpus lambertii* (Fotografia 1). Este estudo contribui para a identificação de inúmeras espécies (BURGER & RICHTER, 1992). A Fotografia 1 apresenta o xilema de *Podocarpus lambertii*, para os três eixos anatômicos (transversal (X), longitudinal radial (R) e longitudinal tangencial (T)).

A espécie apresenta características típicas de gimnospermas, como a presença de traqueóides axiais e ausência de vasos (BURGER & RICHTER, 1992).



Eixo transversal (X)      Eixo longitudinal radial (R)      Eixo longitudinal tangencial (T)

**Fotografia 1.** Anatomia da madeira de *Podocarpus lambertii*.

#### 4.2. Obtenção e composição monossacarídica de material hemicelulósico de *P. lambertii* e *P. selowii*

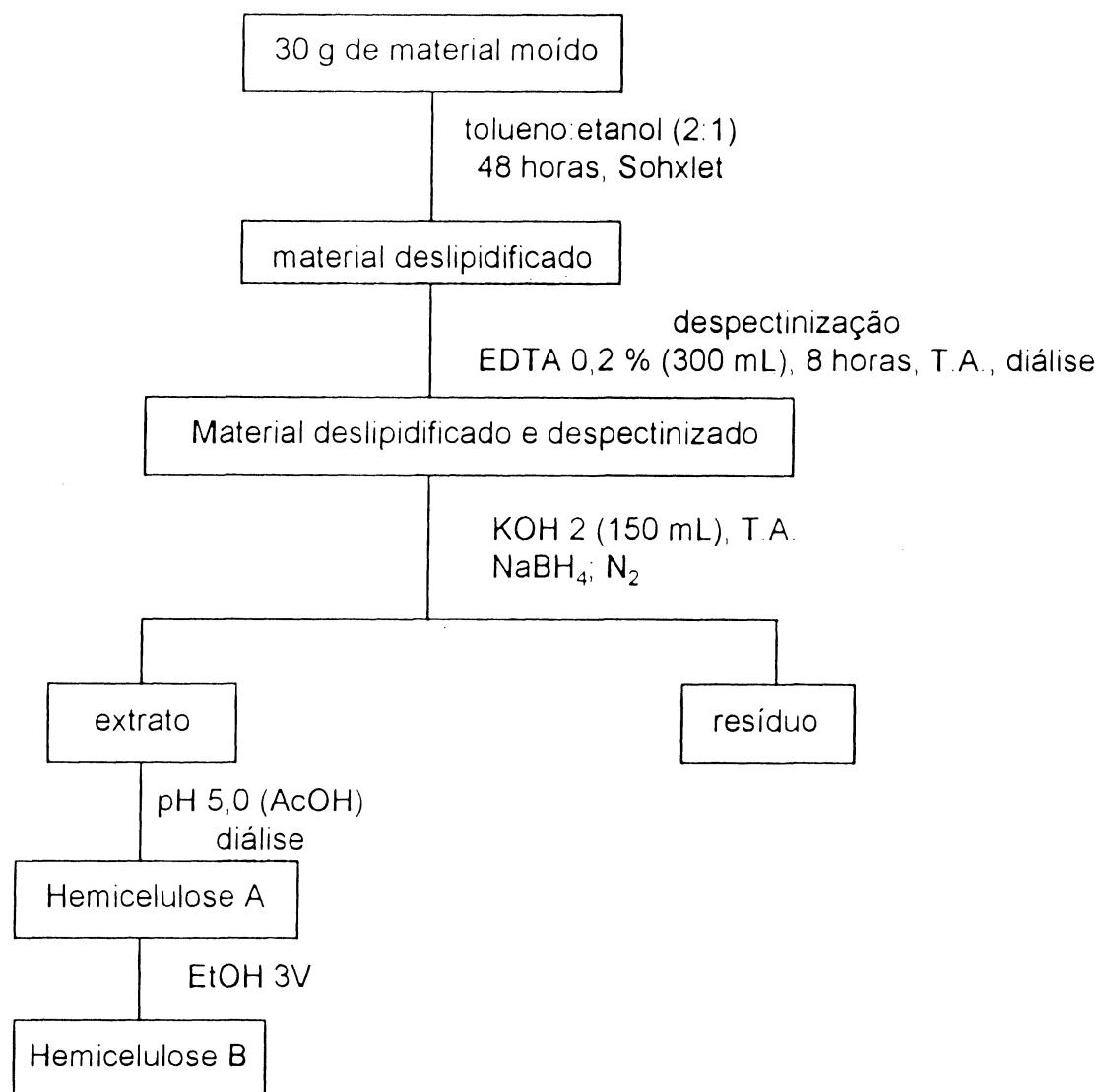
As madeiras moídas e livres de extractivos de *P. lambertii* e *P. selowii*, foram submetidas à extração de hemiceluloses com KOH 2N. Soluções aquosas de NaOH e KOH são os solventes mais largamente empregados na extração de hemiceluloses, justificando o emprego do KOH preferencialmente ao NaOH, pela

formação do acetato de potássio durante a neutralização do extrato alcalino, sal mais solúvel em etanol que o acetato de sódio, durante o processo de precipitação polissacarídica (FENGEL & WEGENER, 1989).

Em trabalho utilizando xilema de uma conífera, MEIER (1958), extraiu de forma eficiente hemiceluloses ricas em arabinoxilanás de *Pinus silvestris*, utilizando solução KOH 14% (p/v) e com prévia deslignificação pelo método clorito (TIMELL, 1965a), citando que cerca de 25% de glucomananás presentes na holocelulose ainda eram resistentes ao tratamento. Cerca de 15 % de material hemicelulósico foi extraído neste processo. Do mesmo modo, ADAMS (1965), utilizou solução de KOH 5% para remover arabinoxilanás da holocelulose.

O processo de extração com KOH 2N e as composições monossacarídicas são apresentadas no Fluxograma I, Tabela IV. Os rendimentos de material hemicelulósico seco não se mostraram significativos, indicando que a metodologia utilizada para sua obtenção não foi eficiente. Provavelmente, os teores elevados de lignina (32%) limitam a solubilização dos polissacarídeos, por impedimentos químicos e físicos, resultando no baixo conteúdo hemicelulósico. Segundo ADAMS (1965), o material tratado com agente deslignificante (holocelulose) é uma fonte mais acessível de obtenção de xilanás ácidas do que feita diretamente do material original, pois oferece maior acesso ao solvente extrator. Alguns autores extraíram hemiceluloses sem o emprego de agente deslignificante. SUN *et al.* (1996), estudando polissacarídeos de caule de trigo, realizaram extrações com NaOH de material lignificado, obtendo rendimentos significativos de até 12 g % de material polissacarídico.

Fluxograma I. Extração alcalina sequencial das hemiceluloses de *P. lambertii* e *P. selowii*.



Em todas as frações obtidas nota-se que o monossacarídeo majoritário é a xilose, principalmente nas hemiceluloses do tipo B.

**Tabela IV.** Composição monossacarídica das hemiceluloses de *P.lambertii* e *P.selowii*, obtida por extração com KOH 2N.

<b>Fração</b>	<b>Rendim. (g %)</b>	<b>Composição monossacarídica (mol %)</b>					
		<b>Ram</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glu</b>
<b>Hemi A<sup>1</sup></b>	0,1	1,7	10,4	38,1	7,2	7,0	35,6
<b>Hemi B<sup>1</sup></b>	0,2	0,3	8,1	48,0	14,8	5,7	23,0
<b>Hemi A<sup>2</sup></b>	0,2	0,9	4,2	34,1	7,8	5,6	47,2
<b>Hemi B<sup>2</sup></b>	0,5	0,7	7,4	55,4	15,3	6,5	14,7

Onde:

- 1 - *Podocarpus lambertii*
- 2 - *Podocarpus selowii*

A possibilidade de grande parte das hemiceluloses terem se apresentado resistentes ao processo extractivo levou a realização de uma hidrólise de Saeman do resíduo das extrações alcalinas (Tabela V).

**TABELA V.** Composição monossacarídica após hidrólise de Saeman do resíduo das extrações alcalinas.

	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man mol %</b>	<b>Gal</b>	<b>Glu</b>
<b><i>P. lambertii</i></b>	8,22	21,46	26,23	3,66	40,43
<b><i>P. selowii</i></b>	8,24	15,42	25,22	3,46	45,46

A composição percentual de monossacarídeos mostra que grande parte das hemiceluloses ainda permanecem retidas no material holocelulósico, com conteúdos semelhantes de xilose e manose.

Tanto as hemiceluloses A quanto as hemiceluloses B, de *P. lambertii* e *P. selowii*, mostraram um grau de similaridade em sua constituição monossacarídica. Desta maneira, as espécies provavelmente possuem hemiceluloses com estruturas químicas semelhantes. Desta maneira, devido à maior representatividade, maior facilidade para obtenção futura de amostras e proximidade de coleta, sendo muito encontrada na região metropolitana de Curitiba, *Podocarpus lambertii* foi escolhida para dar continuidade ao estudo das hemiceluloses.

#### **4.3. Obtenção e composição monossacarídica de material hemicelulósico de *P. lambertii*, com prévia deslignificação**

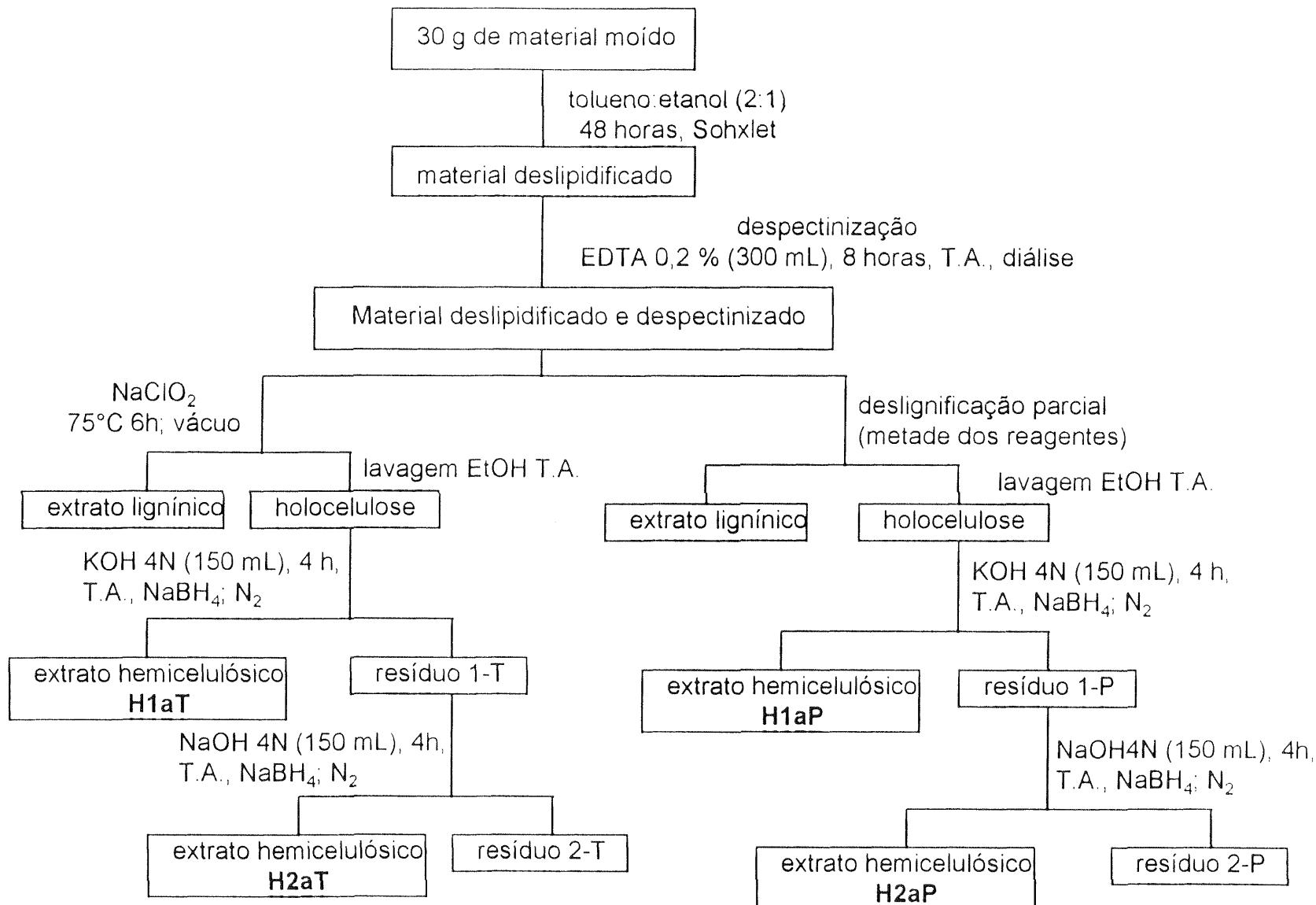
Os baixos rendimentos de hemiceluloses obtidos indicaram que o uso de um agente deslignificante, anterior à extração alcalina, seria indispensável para a obtenção de quantidades significativas de material hemicelulósico. A metodologia descrita por TIMELL (1965a), originalmente proposta por Wise & Ratliff, 1947, envolve a utilização de clorito de sódio, reconhecidamente eficaz na solubilização parcial da lignina. GREEN (1963), reportou que a eficiência do processo de deslignificação deve ser considerada sob três pontos de vista: a remoção de quantidade máxima de lignina; retenção da uma quantidade máxima de carboidratos e a degradação mínima dos polissacarídeos. Cita ainda que estes

três objetivos não são necessariamente compatíveis. SIMKOVIC *et al.* (1986), afirma que quando a madeira é deslignificada, alguns carboidratos são perdidos. Em estudos de hemiceluloses de caule de gramíneas, WILKIE (1979), também cita a existência de despolimerização durante o tratamento clorito-ácido para remoção da lignina.

As etapas sequenciais de extrações foram iniciadas pela deslipidificação do material de parede celular, seguida de uma extração com agente quelante EDTA, responsável pela solubilização de material péctico, a partir da complexação do EDTA com íons  $\text{Ca}^{++}$  ligados às unidades ácidas dos polissacarídeos (Fluxograma II). A eliminação do agente quelante por diálise tornou-se uma dificuldade, permanecendo parte do composto no material péctico seco, evidenciado pelo baixo conteúdo de açúcar total da fração (em torno de 20%). Alguns autores, estudando material péctico e utilizando CDTA como agente quelante, abordaram o problema, sugerindo que a incompleta remoção do agente seja provavelmente devido aos íons cálcio no extrato, naturalmente ligados aos açúcares ácidos, os quais complexam ao CDTA e consequentemente impedem a sua remoção por diálise (COIMBRA *et al.*, 1994; GOONERATNE, *et al.*, 1994).

Além das pectinas, hemiceluloses solúveis em água, como arabinogalactanas e glucomananas, podem eventualmente fazer parte da mistura polissacarídica, como pode ser evidenciado pelo teor elevado de unidades de manose. Os resultados sumarizados na Tabela VI, mostram que a composição dos monossacarídeos da fração Aq-1 é composta por 44,4% de unidades de glucose, podendo ser resultado de contaminação com partículas de celulose. O

Fluxograma II. Extração alcalina sequencial (KOH 4N e NaOH 4N, respectivamente), com prévia deslignificação



**TABELA VI.** Composição monossacarídica, açúcares totais e fenólicos totais das frações obtidas por extrações alcalinas (KOH 4N e NaOH 4N, respectivamente), com prévia deslignificação (total e parcial).

Fração	Rendimentos	Composição monossacarídica (mol %)								Açúcares Totais (%)	Fenólicos Totais (%) **
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Ácidos Urônicos *		
<b>Aq-1</b>  (EDTA 0,2%)	0,04 g (0,1 g%)	1,9	0,3	5,6	3,2	11,9	3,9	44,4	28,8	20	n/d
<b>H1-aP</b>  (KOH 4N)	1,8 g (12,6 g%)	0,8	0,3	8,2	41,1	8,0	6,8	5,8	28,9	32	11,6
<b>H1-aT</b>  (KOH 4N)	1,79 g (12,5 g%)	0,9	0,4	8,0	46,9	6,5	4,9	6,2	26,2	31	13,3
<b>H2-aP</b>  (NaOH 4N)	0,93 g (6,5 g%)	0,3	0,1	1,3	5,8	62,4	2,7	19,7	7,7	52	5,3
<b>H2-aT</b>  (NaOH 4N)	0,61 g (4,3 g%)	0,2	--	3,9	12,1	52,5	3,4	17,0	10,7	50	6,4

\* percentagem em relação à composição monossacarídica.

\*\* em relação ao padrão de ácido coniferílico.

conteúdo elevado de ácidos urônicos demonstra que as pectinas foram eficientemente extraídas.

Foram utilizadas duas diferentes formas de extração do conteúdo lignínico. O Fluxograma II expõe a sequência de tratamentos utilizados. A primeira estratégia baseou-se na utilização de todas as condições descritas pelo método original (denominada deslignificação total), enquanto na segunda foi o emprego de metade dos reagentes recomendados, permanecendo as outras condições constantes (deslignificação parcial). Desta maneira, pôde-se avaliar a influência dos reagentes sobre a constituição monossacarídica das frações submetidas ao tratamento e a eficiência da deslignificação, reflexo da quantidade de material hemicelulósico e holocelulósico obtida ao final dos processos de extração.

O material livre de extractivos e material péctico foi submetido a solubilização da lignina, conforme discutido, rendendo um material holocelulósico. Este material foi exaustivamente lavado com etanol, a fim de remover os solventes e subprodutos de degradação, gerados durante o tratamento.

A holocelulose foi, a seguir, submetida às extrações alcalinas, inicialmente com KOH 4N e posteriormente com NaOH 4N. Os altos rendimentos de material hemicelulósico, totalizando cerca de 18 % (conjunto de todas as frações), são muito superiores ao alcançado nas extrações realizadas sem o emprego do agente deslignificante, mostrando que a metodologia empregada na solubilização da lignina influenciou diretamente na capacidade extractiva dos solventes alcalinos. Tanto a metodologia de deslignificação total quanto a parcial proporcionaram rendimentos em material hemicelulósico bastante semelhantes,

levando o trabalho a empregar, na sequência das atividades de extração, o processo de deslignificação parcial, supostamente menos degradativo, de acordo com os pontos de vista abordados anteriormente por GREEN (1963). Os rendimentos de hemiceluloses são similares, apesar de ocorrer uma significativa diferença na eficiência da solubilização da lignina. Isto pode ser melhor explicado verificando-se os rendimentos dos resíduos holocelulósicos produzidos após as extrações (Tabela VII).

**Tabela VII.** Rendimento em holocelulose após os diversos tratamentos, em relação ao material original (deslipidificado e despectinizado).

<b>Rendimento</b>		
<b>% em relação ao material original (28,6 g)</b>		
	<b>Deslignificação</b>	<b>Deslignificação</b>
	<b>Parcial</b>	<b>Total</b>
Holocelulose	81,8	74,1
KOH 4N	60,1	51,0
NaOH 4N	50,4	32,8

Os resultados expressam a quantidade de material holocelulósico remanescente, em relação ao material de partida (livre de extrativos, pectinas e hemiceluloses solúveis em água). Os resíduos holocelulósicos das extrações, partindo-se da deslignificação total com clorito de sódio, apresentaram menores conteúdos de material remanescente, quando comparado ao processo iniciado com deslignificação parcial, evidenciando uma remoção mais eficaz da lignina.

Ao final de todos os tratamentos, o material celulósico restante foi de 50,4 e 32,8% para deslignificação parcial e total, respectivamente. Deve-se considerar que os tratamentos podem, eventualmente, solubilizar parte da celulose pertencente ao material, conforme discutido por GREEN (1963). O autor comenta que a degradação da celulose sempre ocorre durante a deslignificação e que parece ser impossível isolá-la da madeira com o mesmo grau de polimerização do material nativo. Desta maneira, o percentual final, apresentado na Tabela VII, não reflete o conteúdo real de celulose em *Podocarpus lambertii*.

A fim de verificar a composição monossacarídica nos resíduos finais de extração, foram procedidas hidrólises de Saeman, conforme mostrado na Tabela VIII. Deve-se ressaltar que a presença de glucose não foi considerada, já que este pode ser oriundo tanto da celulose como das hemiceluloses.

**TABELA VIII.** Composição monossacarídica dos resíduos submetidos à hidrólise de Saeman.

	Composição monossacarídica (mol %)					
	Ram	Ara	Xil	Man	Gal	Glu
<b>Resíduo 2-T</b>	---	2,0	4,7	28,3	5,1	59,9
<b>Resíduo 2-P</b>	1,4	4,5	10,0	29,7	6,7	50,1

O resíduo final, gerado a partir da deslignificação total, apresenta teores de glucose próximos àquele gerado a partir da deslignificação parcial. Deve-se

salientar que, apesar da hidrólise ocorrer sob condições drásticas, ainda restou material insolúvel no meio de reação.

Uma característica comum observada nas extrações alcalinas com deslignificação foi a ausência de precipitação de material polissacarídico após neutralização com ácido acético, a fim de gerar hemiceluloses do tipo A. De fato, os trabalhos que estudaram hemiceluloses de madeira de gimnospermas, com deslignificação prévia, expõe os resultados em termos de hemiceluloses totais, sem menção sobre a existência de hemicelulose do tipo A (CROON & LINBERG, 1958; KOOIMAN & ADAMS, 1961; MEIER, 1958; MEIER, 1961; MILLIS & TIMELL, 1963; SCHWARZ & TIMELL, 1963; TIMINSKI & TIMELL, 1960). Há, no entanto, trabalhos que estudaram hemicelulose A de caule de angiospermas, como em *Mimosa scabrella*, bracatinga (REICHER *et al.*, 1984) e de *Quercus suber*, carvalho (ASCENCIO, 1986), ambos utilizando remoção da lignina com agentes clorados.

Os solventes alcalinos utilizados foram avaliados quanto a sua seletividade na remoção de polissacarídeos da parede celular. Conforme apresentado na Tabela VI, as extrações com KOH 4N renderam conteúdos majoritários de xilose (cerca de 40%) e baixos teores de manose (cerca de 8%), indicando que o álcali foi capaz de solubilizar, de maneira específica, os polissacarídeos constituídos por xilose. A posterior extração com NaOH solubilizou os polissacarídeos constituídos por manose (cerca de 60 %). Considerando o rendimento em hemiceluloses totais, o emprego de KOH forneceu frações em torno de 12 g %. No entanto, os teores de açúcares totais resultaram em valores próximos de 30 %. Desta maneira, o rendimento real em

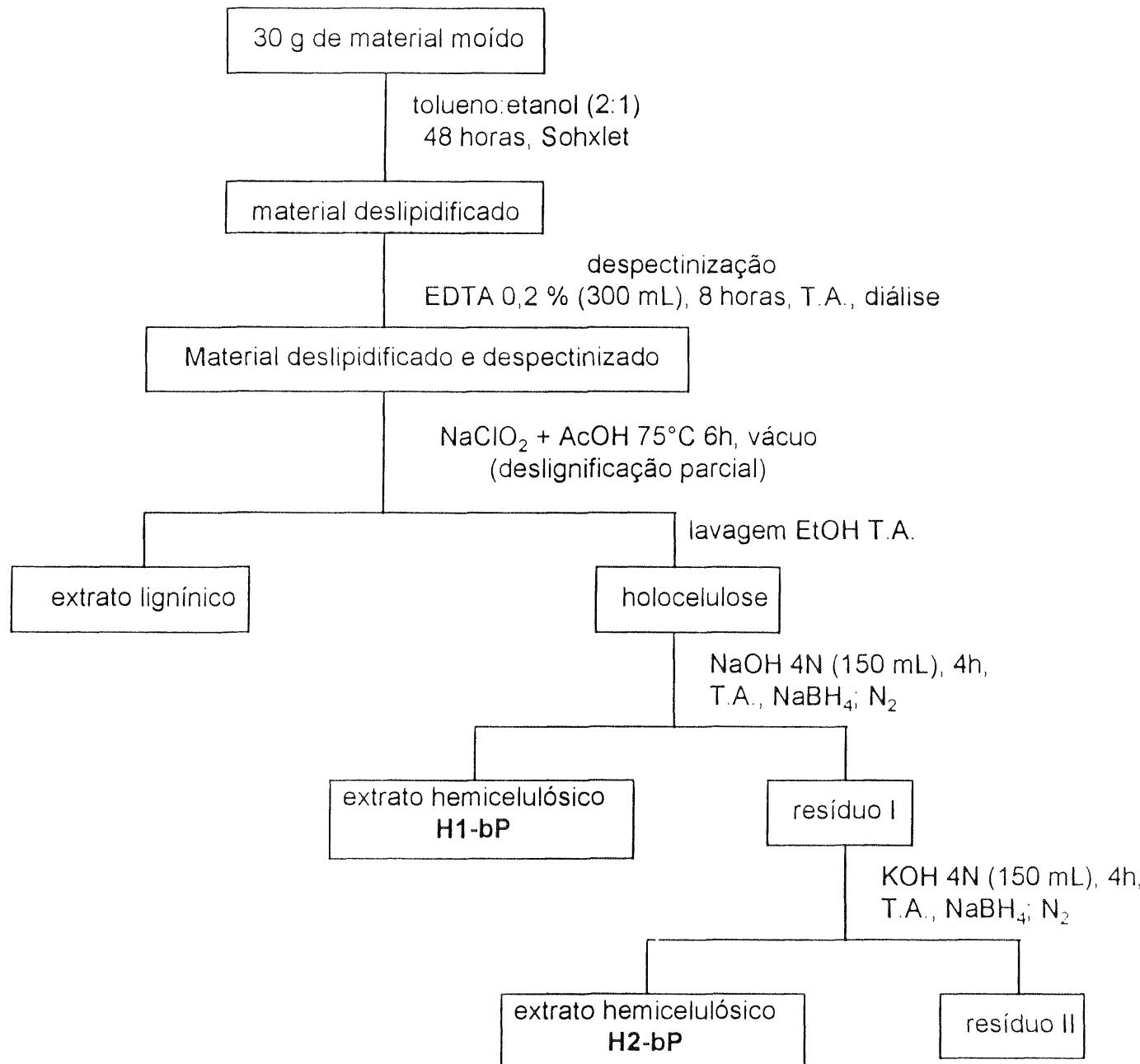
polissacarídeos devem ser próximos de 4 g %, cerca de um terço do material total obtido. Já as extrações com NaOH renderam frações entre 4 - 6 g %, com percentual de açúcares totais em torno de 50%.

A investigação em torno dos baixos rendimentos em açúcares totais recai em torno da presença de lignina e seus subprodutos (compostos fenólicos), gerados durante o processo de deslignificação, onde seriam carreados em conjunto com as hemiceluloses durante o processo extrativo. As dosagens de fenólicos pelo método de Hartree, utilizando padrão de ácido coniferílico, indicam a existência destes compostos nas frações hemicelulósicas. As frações extraídas com KOH, sucessivas ao tratamento de remoção da lignina, apresentaram teores em torno de 20 % de compostos fenólicos. As extrações com NaOH, subsequentes à extração com KOH, renderam conteúdo de fenólicos em torno de 10%. Provavelmente, o material holocelulósico originado do tratamento com clorito de sódio ainda permanecia contaminado por fenólicos da lignina, não extraídos durante a lavagem com etanol.

As dosagens, relativas ao padrão de ácido coniferílico, servem apenas como parâmetro comparativo, já que grande quantidade de produtos gerados durante a deslignificação impede a utilização de uma solução padrão específica.

Em fluxograma alternativo (Fluxograma III), foi realizada uma extração inicial com NaOH 4N, com o material previamente deslignificado (deslignificação parcial), finalizando com uma extração com KOH 4N. A Tabela IX sumariza os resultados obtidos. Pode-se observar que na fração **H1-bP**, as porcentagens de xilose e manose são praticamente iguais, sugerindo uma mistura equivalente de manose e xilose. A composição monossacarídica da fração **H1-bP** evidencia uma

Fluxograma III. Extração alcalina sequencial (KOH 4N e NaOH 4N, respectivamente), com prévia deslignificação parcial.



**TABELA IX.** Composição monossacarídica, açúcares totais e fenólicos totais das frações obtidas por extrações alcalinas (NaOH 4N e KOH 4N, respectivamente), com prévia deslignificação (total e parcial).

Fração	Rendimentos	Composição monossacarídica (mol %)								Açúcares Totais (%)	Fenólicos Totais (%) **
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Ácidos Urônicos *		
H1-b (NaOH 4N)	4,63 g (15,4 g%)	1,2	0,8	4,6	30,5	36,6	5,1	11,5	9,7	66	6,2
H2-b (KOH 4N)	0,03 g (0,1 g%)	2,8	0,8	18,9	31,2	10,3	4,8	6,1	25,0	38	7,7

\* percentagem em relação à composição monossacarídica.

\*\* em relação ao padrão de ácido coniferílico.

distribuição similar de arabinoxilanás e glucomananás. A extração subsequente com KOH resultou na fração **H2-bP**, de baixo rendimento (0,1 g %), indicando que os polissacarídeos haviam sido removidos durante a extração com NaOH.

As observações obtidas nas metodologia até então apresentadas (Fluxogramas I, II e III) sugeriram a realização de uma nova etapa de extrações, com o objetivo de fracionar hemiceluloses purificadas, utilizando extrações sequenciais com KOH 1; 2 e 4 N e NaOH 1 e 4N (Fluxograma IV).

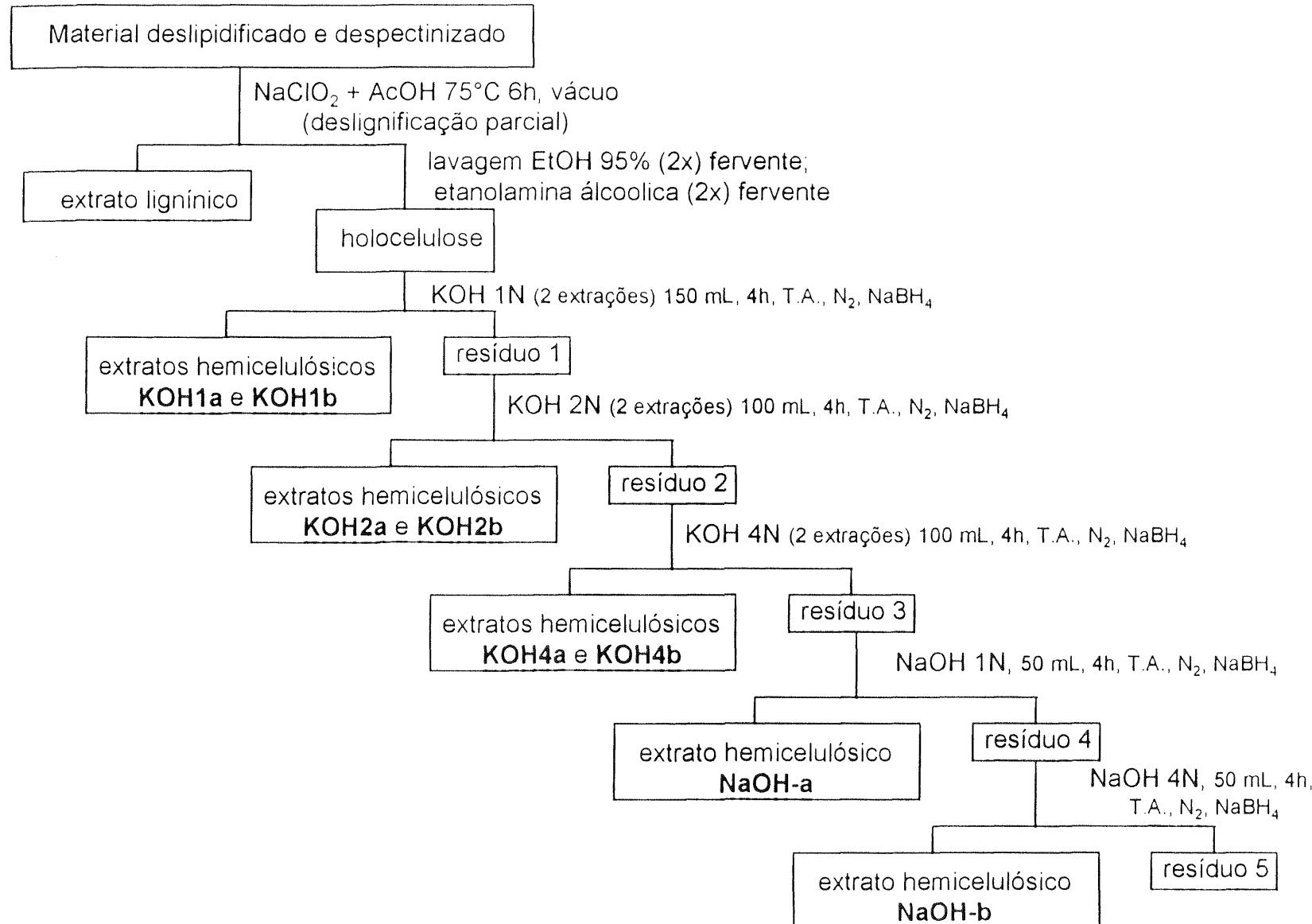
O holocelulose gerada da deslignificação parcial teve a etapa de lavagem modificada, por conta da contaminação de fenólicos, observada nas etapas anteriores. GREEN (1963), sugere sucessivas lavagens, utilizando etanol fervente a 95%, duas lavagens consecutivas com etanolamina álcoolica fervente a 3%, finalizando com nova lavagem com etanol fervente a 95%.

A Tabela X apresenta as dosagens de fenólicos nas frações hemicelulósicas, utilizando padrão de ácido coniferílico, o que resultou em valores entre 3,0 e 7,2%, apresentando um perfil descendente com o decorrer das extrações alcalinas.

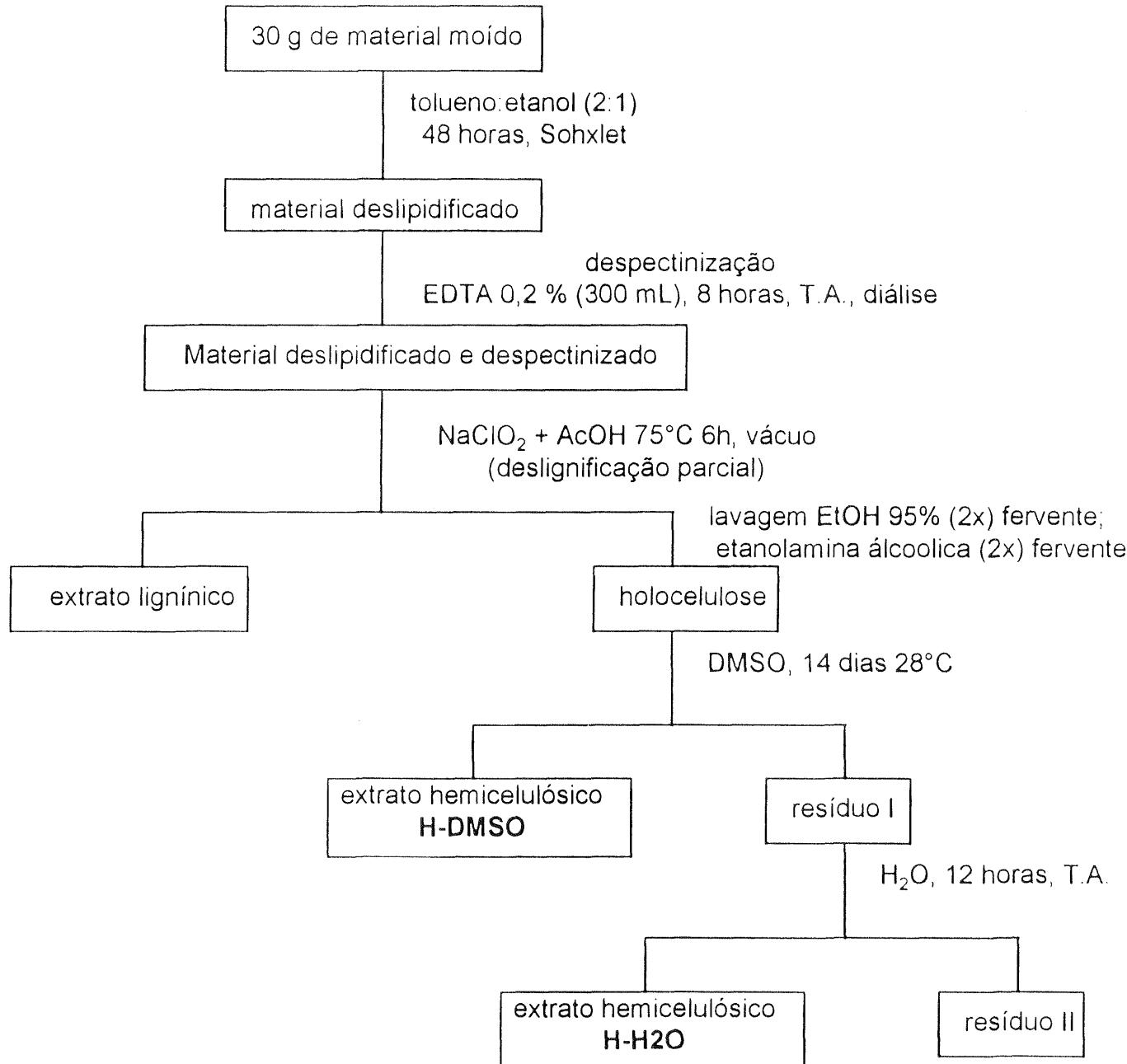
As extrações com KOH renderam frações com diferentes razões entre os seus monossacarídeos constituintes. A Tabela X mostra que a primeira extração com KOH 1N removeu a maior parte das arabinoxilanás. O rendimento da fração **KOH1a**, em material hemicelulósico total, foi de 13,8 g %.

A soma de todas as outras frações obtidas com KOH chegou a 2,2 g, aproximadamente metade do conteúdo da fração KOH1a. Isto pode indicar que o fracionamento mais efetivo ocorre em concentrações menores que KOH 1N. Em estudo de polissacarídeos da parede celular de trigo, SUN *et al.* (1996),

Fluxograma IV. Extração alcalina sequencial (KOH 1; 2 e 4N e NaOH 1 e 4N, respectivamente), com prévia deslignificação parcial.



Fluxograma V. Extração de material hemicelulósico com DMSO, submetida à prévia deslignificação parcial.



realizaram extrações com NaOH nas concentrações 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0 N. A primeira fração, na concentração de NaOH 0,25 N, rendeu 12,3 g % em material polissacarídico seco, representado cerca de 56 % de todas as frações obtidas. Da mesma forma, DU PONT & SELVENDRAN (1987), realizaram extrações sequenciais com KOH em diferentes concentrações, utilizando farelo de trigo como fonte de hemiceluloses, onde a primeira fração obtida, extraída com KOH 1N, apresentou o maior rendimento em material hemicelulósico.

Considerando que grande parte das arabinoxilananas concentraram-se na fração **KOH1a**, as frações subsequentes, extraídas com KOH, começaram a apresentar proporções cada vez maiores de manose, indicando a presença de glucomanananas, evidenciadas pela razão sucessivamente maior de Man:Xil.

Observou-se uma variação na razão Xil:Ara, onde a fração **KOH1a** apresentou uma relação de 1,8:1, enquanto a fração **KOH4a**, obtida por extração com KOH 4N, resultou uma razão de 4,4:1. IZYDORCZYK & BILIADERIS (1995), sugerem que as diferentes razões Xil:Ara ocorrem devido às técnicas e condições de solventes empregados. Relatam, no entanto, a possibilidade da existência de diferentes famílias de arabinoxilananas, em cereais, de acordo com os padrões de ramificação das moléculas.

A fração **KOH4b** apresentou alto teor de arabinose, galactose e ramnose, resultado inesperado dentro da sequência de composição monossacarídica até então obtida. A suposição que a presença destas unidades sejam ainda pertencentes a polissacarídeos pécticos pode ser fundamentada pelo trabalho realizado em cotilédones de feijão, que reporta a maior parte dos polissacarídeos pécticos extraídos com KOH 4N, após diversas extrações alcalinas com teores

menores destes polissacarídeos. Esta fração apresenta valores inesperadamente altos de arabinose, galactose e ramnose, que são geralmente obtidos em extrações aquosas (GOONERATNE *et al.*, 1996).

As extrações com NaOH renderam frações praticamente puras de galactoglucomananas, onde a fração **NaOH-a** apresentou 70,0 % de manose e 18,1 % de glucose.

A razão Man:Glu, para todas as oito frações obtidas por tratamento alcalino variaram de 2,5:1 a 3,0:1. Todas as frações obtidas (Fluxograma IV) estão de acordo com outras espécies de coníferas já estudadas (CROON & LINBERG, 1958; TIMINSKI & TIMELL, 1960; MEIER, 1958; KOOIMAN & ADAMS, 1961).

No entanto, FENGEL & WEGENER (1989), citam que as unidades laterais de galactose são lábeis a solventes alcalinos, o que pode explicar os baixos teores encontrados nas frações **NaOH-a** e **NaOH-b**.

Os teores de ácidos urônicos apresentaram-se superiores nas frações obtidas pela extração com KOH, constituindo parte das arabinoxilanas. As frações **NaOH-a** e **NaOH-b** apresentam teores em torno de 3% de açúcares ácidos. Este dado sugere que as unidades ácidas pertencem às cadeias de arabinoxilanas, como já esperado para esses polissacarídeos de hemiceluloses de madeira. A presença de ácidos urônicos nas frações de glucomananas, provavelmente fazem parte da contaminação de arabinoxilanas ainda presentes nesta fração.

As extrações com solventes alcalinos são responsáveis pela degradação de grupamentos acetil das hemiceluloses, o que motivou a realização de uma

extração alternativa da holocelulose com DMSO, solvente aprótico, usado para extração de hemiceluloses acetiladas. Os baixos rendimentos são relatados como o maior obstáculo para a utilização do solvente. A interpretação do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN sugere uma mistura de polissacarídeos e evidencia um sinal pouco intenso em  $\sigma$  20,6, indicando a presença de grupamentos acetil.

#### **4.4. Análise estrutural da fração NaOH-a (galactoglucomanana) de xilema de *Podocarpus lambertii*.**

A fração **NaOH-a**, extraída com hidróxido de sódio 4 N (Tabela X; Fluxograma IV), apresentou teores de glucose, manose e galactose de aproximadamente 90 % em composição monossacarídica. A presença de apenas 3,0 % de fenólicos totais (padrão de ácido coniferílico) indica um grau reduzido de contaminantes não-polissacarídicos. Os teores de 50% em açúcar total podem estar relacionados com o grau de umidade encontrado na fração, já que a mesma foi submetida a processo de secagem em estufa à vácuo, em temperatura ambiente, a fim de evitar perda ainda maior de solubilidade, devido à agregação molecular, característica já encontrada na fração.

A razão Man:Glu:Gal de 3,3:1,0:0,1 aproxima-se daquela encontrada para a maioria das espécies de coníferas (FENGEL & WEGENER, 1989).

A análise estrutural da fração **NaOH-a** iniciou com a metilação do material, insolúvel em DMSO, pelo método de Haworth (HAWORTH, 1915; HIRST & PERCIVAL, 1960). O polissacarídeo parcialmente metilado, agora solúvel em DMSO, foi submetido a três metilações consecutivas pelo método descrito por

CIUCANU & KEREK (1984). Uma vez completada a metilação do polissacarídeo, verificada pela ausência de banda de absorção, em espectrometria de infravermelho, na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , característica do grupamento hidroxílico, o material permetilado foi hidrolisado, reduzido, acetilado e analisado por g.c.-m.s. na forma de seus acetatos de alditóis parcialmente metilados.

**Tabela XI.** Análise dos derivados parcialmente metilados da fração NaOH-a de *Podocarpus lambertii*.

Derivado	mol %	Fragments (m/z)
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	71,9	99,101,113,117,129,131,161,173
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glu	24,4	99,101,113,117,129,131,161,173
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	0,8	87,101,117,129,145,161,205
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Hex	2,0	87,101,117,129,145,161,205
2,3-Me <sub>2</sub> -Hex	0,9	87,101,117,129,143,203

A interpretação dos resultados sugere a existência de uma galactoglucomanana típica da divisão gimnosperma. Uma cadeia principal de unidades alternadas de manose e glucose ( $1 \rightarrow 4$ ) foi indicada pela presença dos derivados 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man e 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glu, com proporção molar de 3,0:1, similar àquela encontrada na composição monossacarídica da fração original. A existência de substituições simples da cadeia principal foi confirmada pela detecção dos derivados 2,3-Me<sub>2</sub>-hexitol (atribuído às unidades de manose e/ou

glucose) e o correspondente derivado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal, substituinte unitário ligado 1→6 na cadeia principal de glucomanana.

A dificuldade de atribuir qual a unidade monossacarídica representativa das unidades terminais de hexitol deve-se a grande proximidade dos tempos de retenção relativos dos derivados 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glu e 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man. O terminal da cadeia principal constituído por 0,8 mol%, determina a cadeia principal com um GP de aproximadamente 120.

A fim de confirmar a natureza das ligações presentes na molécula, procedeu-se a oxidação com metaperiodato de sódio da fração NaOH-a. Após a oxidação (sete dias), redução com NaBH<sub>4</sub>, hidrólise ácida, nova redução e acetilação, os produtos derivados da oxidação foram analisados em g.l.c. . Esta oxidação foi repetida, a fim de se obter o polissacarídeo completamente oxidado. Os resultados das duas oxidações estão apresentados na Tabela XII.

**Tabela XII.** Composição dos subprodutos das duas etapas de oxidação com metaperiodato de sódio.

	Composição (mol%)			
	Eritritol	Manitol	Galactitol	Glucitol
1 <sup>a</sup> etapa	67,5	8,8	10,6	12,9
2 <sup>a</sup> etapa	99,2	0,8	--	--

Os únicos produtos gerados foram eritritol, com teores praticamente absolutos (99,2%) e traços de glicerol, manitol e glucitol, confirmando uma cadeia constituída por ligações do tipo 1→4.

A anomericidade da molécula de galactoglucomanana pôde ser avaliada utilizando-se análises polarimétricas. A fração NaOH-a foi solubilizada em NaOH 1%, em concentração de 0,5 g%, apresentando rotação ótica específica de  $[\alpha]^{25}_D = -40$ , representativo de ligações do tipo  $\beta$ . A diluição da mesma solução para 0,25 g% não modificou a rotação óptica, indicando que a concentração utilizada foi ideal para se obter um resultado representativo para a molécula. O resultado apresentado é bastante similar a outras espécies de coníferas já estudadas, conforme apresentado na Tabela XIII.

**TABELA XIII.** Rotação óptica específica e razão entre os monossacarídeos de galactoglucomananas de diversas espécies de coníferas.

Espécie	Man:Glu:Gal	$[\alpha]^{25}_D$
<i>Abies amabilis</i>	3:1:0,1	-38
<i>Araucaria angustifolia</i>	3,8:1:0,3	-29
<i>Picea engelmannii</i>	3:1:0,2	-40
<i>Pinus sylvestris</i>	3,3:1:0,2	-34
<i>Tsuga canadensis</i>	3:1:0,1	-40
<i>Podocarpus lambertii</i>	3:1:0,1	-40

Fonte: FENGEL & WEGENER (1989).

A análise da fração de galactoglucomanana, por ressonância magnética nuclear de carbono treze, confirmou os resultados apresentados pelos métodos químicos utilizados na elucidação estrutural da fração. O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração (Figura 11), mostra doze sinais pronunciados e característicos de uma glucomanana homogênea (Tabela XIV), evidenciado pela uniformidade dos sinais de C-1 de  $\beta$ -D-manopiranose ( $\delta$  100,2) e  $\beta$ -D-glucopiranose ( $\delta$  102,7). A intensidade dos picos referentes aos carbonos anoméricos indica uma proporção relativa de aproximadamente 3:1 entre C-1 de manose e glucose, respectivamente, confirmando os dados de metilação e composição monossacarídica da fração.

**Tabela XIV.** Dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN para a fração NaOH-a de *Podocarpus lambertii*.

	Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\rightarrow$ 4)-Manp-(1-	100,2	70,3	71,7	76,4	75,3	60,7
$\rightarrow$ 4)-Glup-(1-	102,7	73,2	75,0	78,6	74,5	60,5

KUBACKOVA *et al.* (1992), apresenta os assinalamentos de uma galactoglucomanana de *Populus molinifera*, reportando que os sinais referentes a unidades de galactose são superpostos aos sinais de manose. A fração NaOH-a

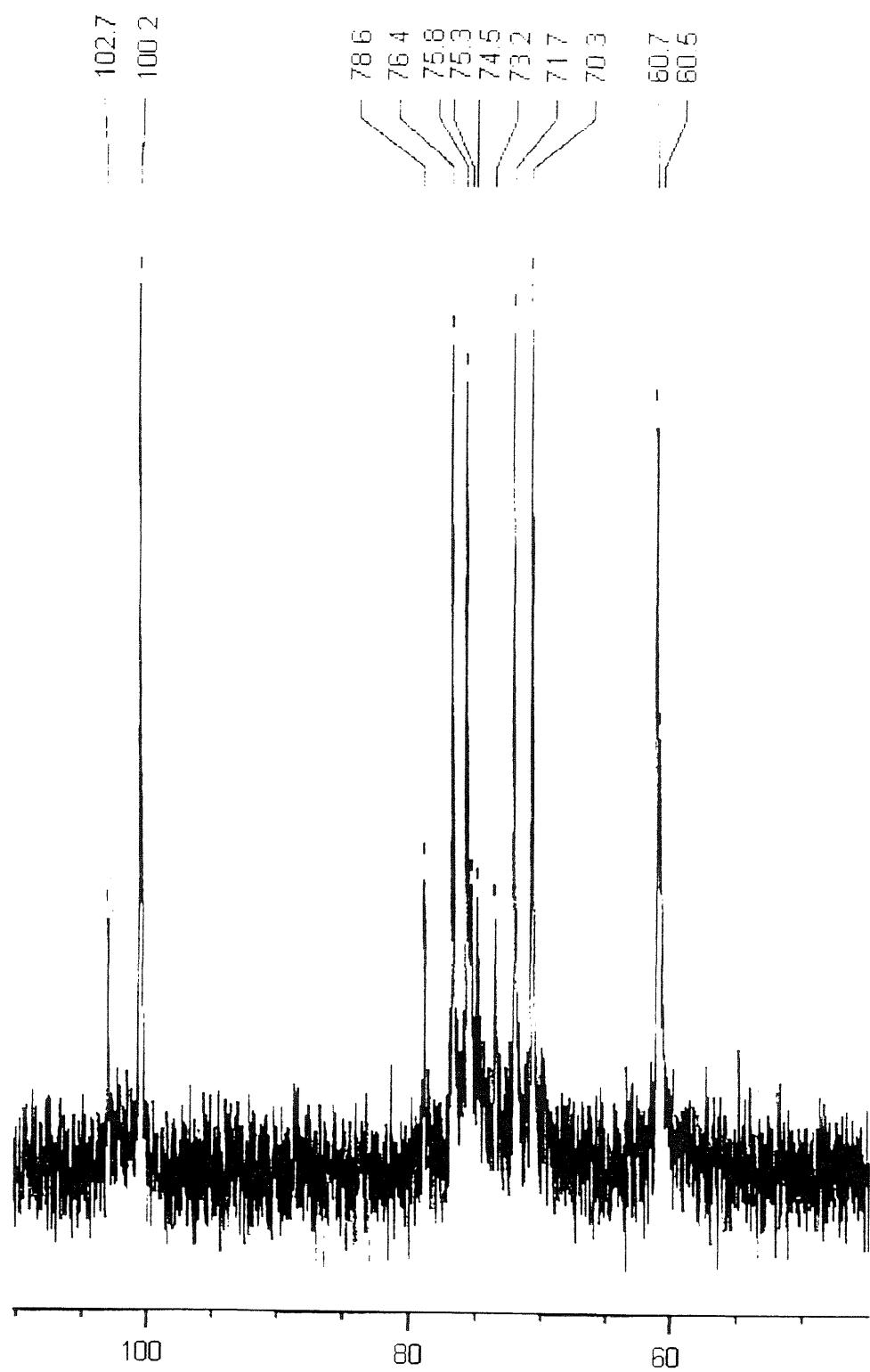
apresenta 2,3% de galactose, presumivelmente um fator limitante no que se refere à resolução dos picos. A uniformidade dos sinais de C-1 de glucose e manose reforçam a possibilidade de que a molécula seja constituída de grau reduzido de ramificações de unidades de galactose, dado que foi demonstrado nas análises de metilação.

Os sinais dos carbonos anoméricos confirmam a existência de uma glucomanana com anomericidade do tipo  $\beta$ . A estrutura atribuída a fração NaOH-a, por análises de  $^{13}\text{C}$ -RMN trata-se uma glucomanana linear, com ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ .

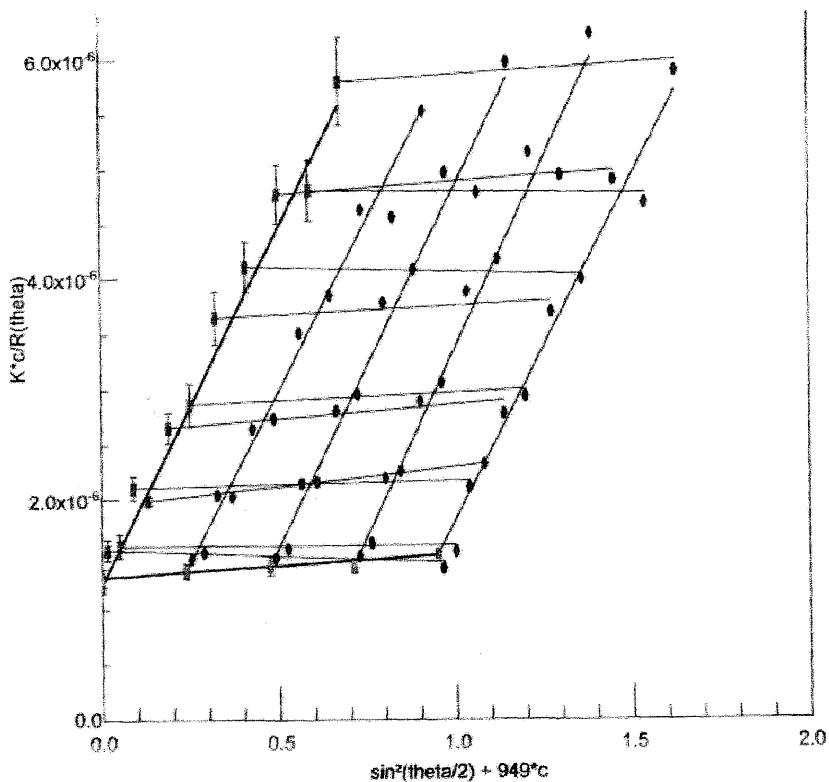
Todos os sinais atribuídos aos carbonos de manose e glucose foram interpretados a partir dos trabalhos descritos por GOLDBERG *et al.* (1987); GORIN & MAZUREK (1975); HAZENDONK *et al.* (1996); KUBACKOVA *et al.* (1992); USUI *et al.* (1979).

A massa molecular da fração **NaOH-a** foi preliminarmente avaliada pelas análises de metilação, por intermédio da determinação de seu GP médio. Estudos mais sofisticados, utilizando técnicas de difusão de luz, foram capazes de fornecer resultados a serem confrontados com aqueles obtidos preliminarmente.

A baixa solubilidade em água, apresentada pela fração **NaOH-a**, impossibilitou as análises de massa molecular utilizando cromatografia de gel permeação. Assim, esta determinação foi obtida através de método de espalhamento de luz ("light scattering"), que forneceu valor de massa molecular média de  $8 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$ , avaliado a partir da construção de um "plot de Zimm", conforme apresentado na Figura 12.



**Figura 11.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração NaOH-a, em NaOD 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm

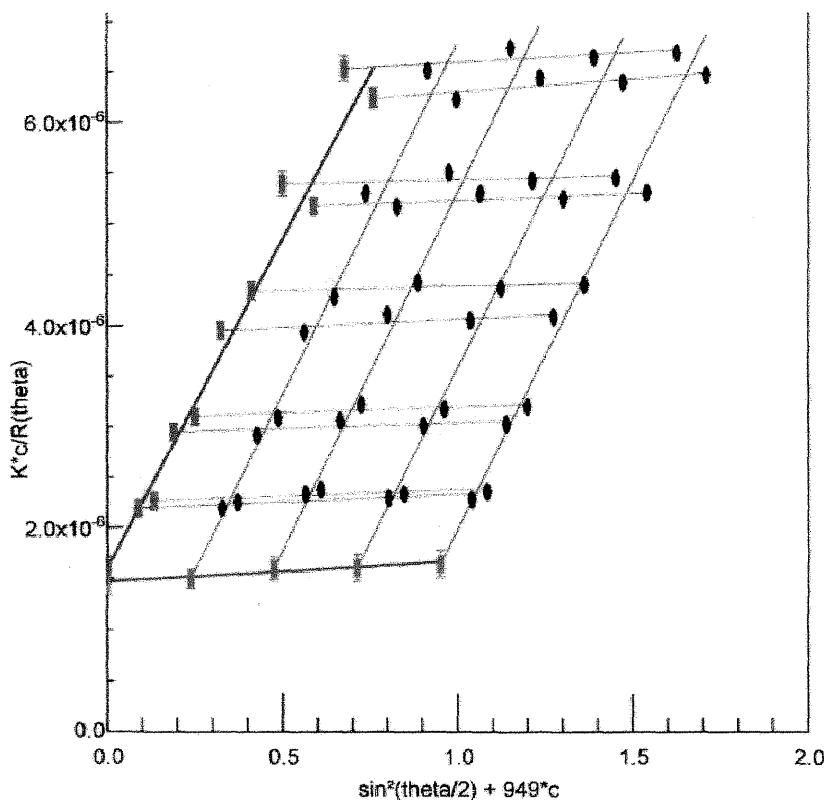


**Figura 12.** Plot de Zimm da fração NaOH-a.

A massa molecular foi satisfatoriamente determinada utilizando-se onze diferentes ângulos de laser e cinco concentrações distintas da mesma fração.

A filtração da solução polissacarídica em filtro de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  não impede por completo a passagem de agregados moleculares, prováveis responsáveis pela superestimação dos resultados, como as que ocorrem com arabinoxilanas ácidas (GRUPPEN *et al.*, 1992a; IZIDORCZYK & BILIADERIS, 1995).

A fração NaOH-b, extraída com NaOH 4N (Tabela IX), condição mais drástica que aquela realizada para NaOH-a, foi submetida à análise de massa molecular, nas mesmas condições oferecidas a fração NaOH-a (Figura 13).



**Figura 13.** Plot de Zimm da fração NaOH-b.

A construção do Plot de Zimm, utilizando um  $\text{dn/dc}$  de 0,172, resultou em uma massa molecular média de  $7,5 \times 10^5 \pm 0,48 \times 10^5$ , similar ao encontrado para NaOH-a. Este confirma o anterior e sugere que as condições de extração utilizadas não afetaram de forma significativa a integridade molecular das glucomananas.

#### 4.5. Análise das frações H1aT e KOH1a (arabino 4-O-metilglucuronoxilana) de xilema de *Podocarpus lambertii*.

As frações selecionadas para análise das estruturas moleculares de seus componentes, basearam-se em variáveis como alto rendimento, teores elevados

de xilose, arabinose e ácidos urônicos, assim como a solubilidade em água. Desta maneira, as frações **H1aT** (Tabela VI : Fluxograma II) e **KOH1a** (Tabela X; Fluxograma III) foram submetidas à elucidação estrutural por métodos químicos e espectroscópicos, inicialmente com as subfrações geradas a partir de purificação por solubilidade em água (frações **H1aT(água sol)**; **KOH1a(água ins)** e **KOH1a-água(sol)**; **KOH1a-água(ins)**), seguida por subfrações originadas pelos processos de purificação por CETAVLON (**H1aTcetavlon**) e hidróxido de bário (**KOH1a-bálio(sol)**) e coluna (**KOH1acol**).

A fração **H1aT** foi inicialmente submetida ao processo de fracionamento por solubilidade em água, uma vez que as glucomanananas são insolúveis (componente de 17,6 mol % da fração) e as arabinoxilananas ácidas, solúveis. A Tabela XV apresenta a purificação das arabinoxilananas a partir da subfração solúvel em água **H1at(água sol)** e insolúvel em água **H1at(água ins)**.

**Tabela XV.** Composição monossacarídica da fração **H1aT** e subfrações resultantes do fracionamento por solubilidade em água, **H1aTágua(sol)** e **H1aTágua(ins)**.

Fração	Monossacarídeos neutros (mol %)						
	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu
<b>H1aT</b>	1,6	0,5	11,2	63,1	8,3	7,2	8,1
<b>H1aT(água sol)</b>	1,0	0,5	11,0	71,5	7,5	4,1	4,4
<b>H1aT(água ins)</b>	4,0	0,5	13,7	31,5	7,3	11,6	32,4

A purificação da fração solúvel em água foi atribuída principalmente à redução dos teores de glucose e galactose.

A estrutura molecular da subfração **H1aT(água sol)** foi determinada quimicamente pela técnica de metilação descrita por CIUCANU & KEREK (1984). O material solúvel em DMSO foi submetido a duas repetições do mesmo método até verificação da ausência de banda de absorção na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  (característica do grupamento hidroxílico), por espectroscopia de infravermelho.

A subfração **H1aT(água sol) permetilada** foi submetida a duas condições de hidrólise, uma utilizando prévia metanolise seguida de hidrólise ácida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 N durante 6 horas e outra utilizando hidrólise diretamente com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 N por 6 horas. Os resultados estão apresentados na Tabela XVI.

**Tabela XVI.** Análise dos derivados parcialmente metilados da arabinoxilana ácida  
(subfração H1aT(água sol)) de *Podocarpus lambertii*.

<b>Derivado</b>	<b>Fragmentos (m/z)</b>	<b>Mol %</b>	
		<b>com metanolise<sup>a</sup></b>	<b>sem metanolise<sup>b</sup></b>
<b>2,3,5-Me<sub>3</sub>-Ara</b>	87, 101, 117, 129, 145, 161	12,1	17,4
<b>2,3-Me<sub>2</sub>-Ara</b>	87, 101, 117, 129, 189	3,2	6,3
<b>6-deoxi-2 Me-Hex</b>	87, 99, 117, 129, 159, 173, 201	1,2	--
<b>2,3,4-Me<sub>3</sub>-Xil</b>	87, 101, 117, 129, 145, 161	3,2	5,0
<b>2,3-Me<sub>2</sub>-Xil</b>	87, 101, 117, 129, 161, 189	59,6	48,1
<b>6-deoxi-3-Me-Hex</b>	87, 101, 117, 129, 143, 189, 203	1,3	--
<b>3-Me-Xil</b>	87, 99, 129, 145, 189	9,0	6,5
<b>2-Me-Xil</b>	85, 87, 99, 113, 117, 145, 159	10,0	15,0

a. Metanolise seguida de pré-hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 N

b. Pré-hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% p/v em gelo, seguida de diluição a 8% p/v em banho fervente.

A observação das proporções dos derivados metilados indica uma diminuição do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Xil na fração não-metanolizada. Os outros derivados apresentam relativa similaridade em suas proporções molares. Os derivados metilados obtidos apontam algumas dificuldades de interpretação, intimamente relacionadas ao tipo de molécula estudada. Primeiramente, polissacarídeos constituídos por pentoses, como as arabinoxilananas, são lâbeis

quando tratados quimicamente, como pelo emprego das técnicas de metilação. Em trabalho descrito por CROON *et al.* (1960), os autores citam que a metilação de xilanas, submetidos a prévia metanolise (HCl 2% em metanol) a 100°C durante 13 horas, provoca cerca de 1 a 3 % de degradação de derivados 2,3-Me<sub>2</sub>-Xil (derivado da cadeia principal de xilana ligada (1→4)), enquanto a metilação seguida de hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 N durante 14 horas promove cerca de 20 % de degradação do mesmo derivado. LINDBERG (1972), também cita a importância da execução de metanolise, na eliminação de erros provocados pela degradação dos polissacarídeos.

Os derivados 2-Me-Xil e 3-Me-Xil são detectados, em coluna OV-225, em tempos de retenção muito próximos, com parcial sobreposição dos picos (DUPONT & SELVENDRAN, 1987). A coluna DB-225, utilizada para identificação dos metilados de **H1aT(água sol)**, apresentou os mesmas resultados que a coluna anterior, para as análises dos derivados 2-Me-Xil e 3-Me-Xil. Desta maneira, a análise quantitativa destes derivados não foi realizada com uso de integrador automático e sim, por cálculo manual de área.

O derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara, identificado no material metilado de **H1aT(água sol)**, pode participar de ligações tipo éter na posição cinco da arabinose com resíduos fenólicos de lignina, como sugerido em recente trabalho sobre complexo lignina-carboidrato de parede celular de gramíneas (WALLACE *et al.*, 1995). A possibilidade deste derivado fazer parte de unidades de arabinose intermediárias entre unidades de xilose da cadeia principal e unidades terminais de arabinose presentes nas ramificações também pode ser aventada. Neste aspecto, apenas algumas unidades de xilose seriam substituídas por duas unidades consecutivas

de arabinose, permanecendo a maior parte das substituições ocorrendo como unidades simples. IZYDORCZYK & BILIADERIS (1994), estudando hemiceluloses de parede celular de trigo, também identificaram a presença deste derivado, sugerindo que a pequena presença do 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara indica que cadeias curtas de arabinose estejam presentes nas ramificações do polissacarídeo.

Alguns autores apresentam derivados de deoxi hexoses (ramnose) em estruturas de arabinoxilananas de paredes celulares de vegetais (COIMBRA *et al.*, 1994; DU PONT & SELVENDRAN, 1987). Trabalhando com polissacarídeos de feijão, SELVENDRAN & KING (1989), identificaram cinco derivados metilados de rhamnose, atribuindo sua presença a provável contaminação de material péctico, rico em deoxi hexoses. A identificação dos derivados 6-deoxi-2 Me-Hex e 6-deoxi-3-Me-Hex na fração **H1aT(água sol)** pode, eventualmente, levantar a mesma possibilidade.

Exceto pela presença do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara, todos os outros derivados encontrados indicam uma estrutura polissacáridica muito similar a outras já encontradas para coníferas.

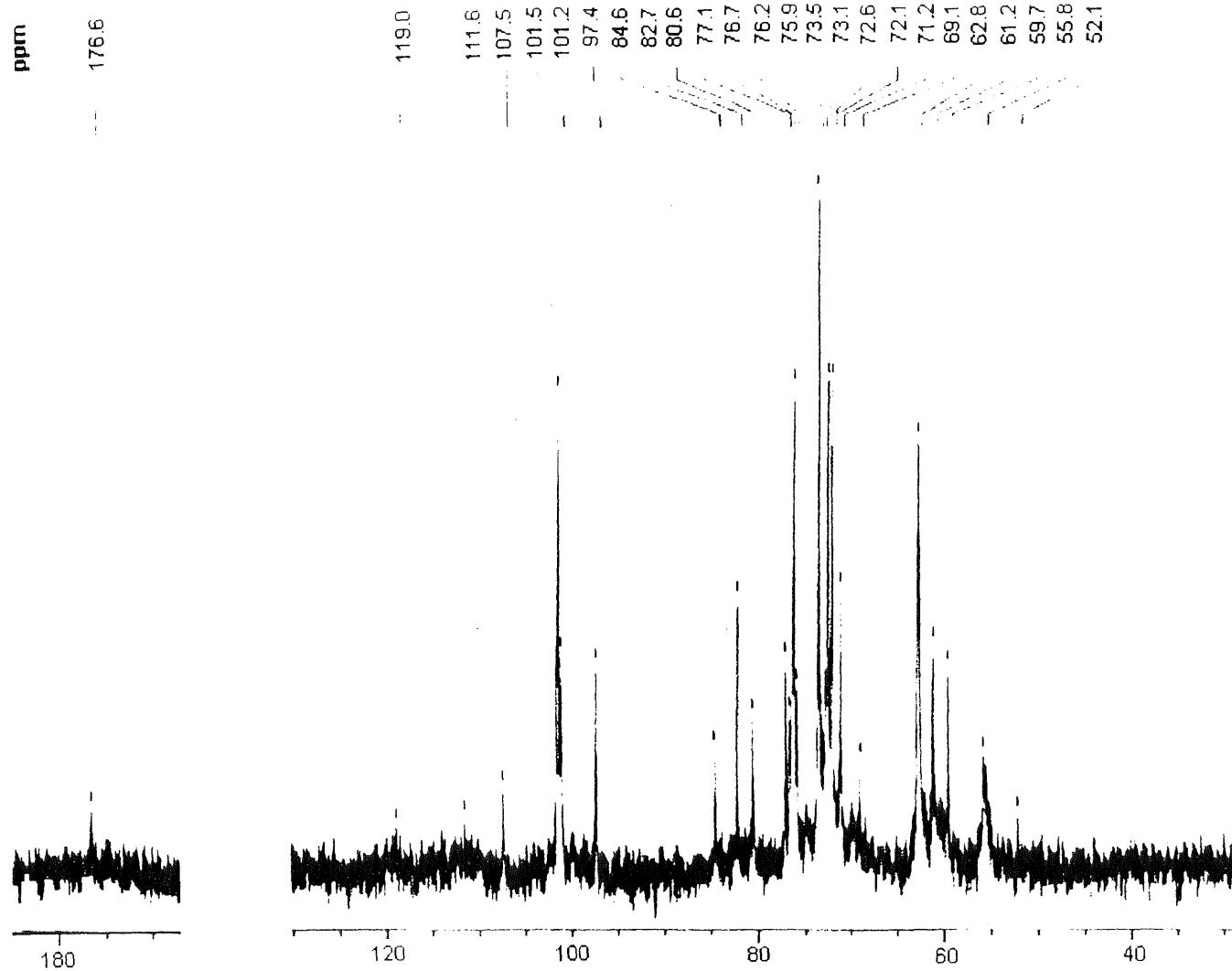
A anomericidade da fração **H1aT(água sol)** foi determinada por análise polarimétrica, resultando em  $[\alpha]^{25}_D = -25$ , sugerindo ligações predominantes do tipo  $\beta$ . A presença de  $\alpha$ -arabinose ligadas possivelmente diminuiu o valor da rotação óptica encontrada. A Tabela XVII apresenta as rotações ópticas de diversas espécies de coníferas.

**Tabela XVII.** Rotação ótica específica e razão entre os monossacarídeos de arabino-4-O-metilglucuronoxilananas de diversas espécies de coníferas.

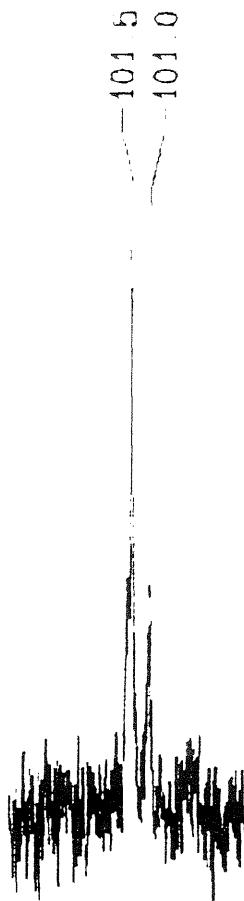
Espécie	Xil:Ara:MeGluA	$[\alpha]_{D_{25}}$
<i>Ginkgo biloba</i>	9:1:1,5	-35
<i>Larix gmelinnii</i>	10:1:3,7	-38
<i>Larix leptolepsis</i>	4:1:0,4	-24
<i>Picea engelmannii</i>	7:1:1,2	-35
<i>Pinus cembra</i>	10:1:0	-34
<i>Pinus banksiana</i>	3:1:0,1	-26
<i>Pinus sylvestris</i>	12:1:3,7	-36

Fonte: FENGEL & WEGENER (1989).

A análise espectroscópica, por  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 14), da subfração H1aT(água sol), revelou dois sinais principais na região de C-1 de xilose ( $\delta$  101,5 e  $\delta$  101,7) que foram atribuídos, conforme dados publicados para arabinoxilananas purificadas (COIMBRA et al., 1994; BAZUS et al., 1993; GORIN & MAZUREK, 1975; IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995; KOVAC et al., 1980; PINTO et al., 1994). O sinal de  $\delta$  101,5 foi atribuído ao C-1 de xilopiranose ligada glicosidicamente  $\beta(1\rightarrow4)$ , enquanto o sinal de  $\delta$  101,7 foi atribuído ao C-1 de xilopiranose  $\beta(1\rightarrow4)$  ligada e substituídas nas posições O-2 e/ou O-3 (Tabela XVIII; Figura 15).



**Figura 14.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração H1aTágua(sol), em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos são expressos em ppm.



**Figura 15.** Região de C-1 de Xilp, em espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, da subfração H1aT(água sol).

A presença de unidades ácidas na arabinoxilana foi identificada pela presença de sinal característico de carboxila na região de  $\delta$  176,6 e confirmada como ácido 4-O-metilglucurônico, pela atribuição de um significativo sinal em  $\delta$  59,7 para grupamento metil, também identificado em outros trabalhos (BAZUS *et al.*, 1993; COIMBRA *et al.*, 1994; PINTO *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1996; WENDE & FRY, 1997).

**Tabela XVIII.** Dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN para a subfração H1aT(água sol) de *Podocarpus lambertii*.

	Deslocamento químico (ppm)			
	C-1	C-5	O-Me	C-6
$\rightarrow$ 4)-Xilp-(1-	101,5	62,8		
$\rightarrow$ 4)-Xilp-(1- substituída	101,2			
$\rightarrow$ 3)-Araf-(1-	107,5	61,2		
$\rightarrow$ 2)-4-OMeGlup-(1-	97,4		59,6	176,6

A intensidade e distribuição dos sinais de C-1 e C-5, além dos sinais de ácido 4-O-metilglucurônico, são similares àqueles encontrados nos espectros de arabinoxilanás purificadas em trabalhos anteriores.

Os sinais possíveis de atribuição estão apresentados na Tabela XVIII. IZYDORCZYK & BILIADERIS (1995), citam que muitos dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de arabinoxilanás podem ser totalmente identificados, exceto na região entre 73 - 75 ppm.

O sinal proeminente em  $\delta$  55,8 pode ser atribuído a grupamentos metoxil, adivindos da lignina. WALLACE *et al.* (1995), apresentam uma série de produtos lignínicos, identificados por  $^{13}\text{C}$ -RMN, dos quais os grupos metoxil apresentam um sinal na mesma região do espectro. Este dado reitera a possibilidade do derivado metilado 2,3- $\text{Me}_2$  Ara fazer parte de complexo com a lignina. O espectro

de  $^{13}\text{C}$ -DEPT, no entanto, apresenta sinais característicos de C-5 de xilose ( $\delta$  62,8) e C-5 de arabinose ( $\delta$  61,3) livres e ausência de sinais de C-5 ligados (Figura 16). Esta ausência pode ser explicada pelo baixo nível de substituição de C-5 da arabinose, evidenciado pelo derivado metilado 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara (6,3 mol %), impossibilitando a resolução do pico característico.

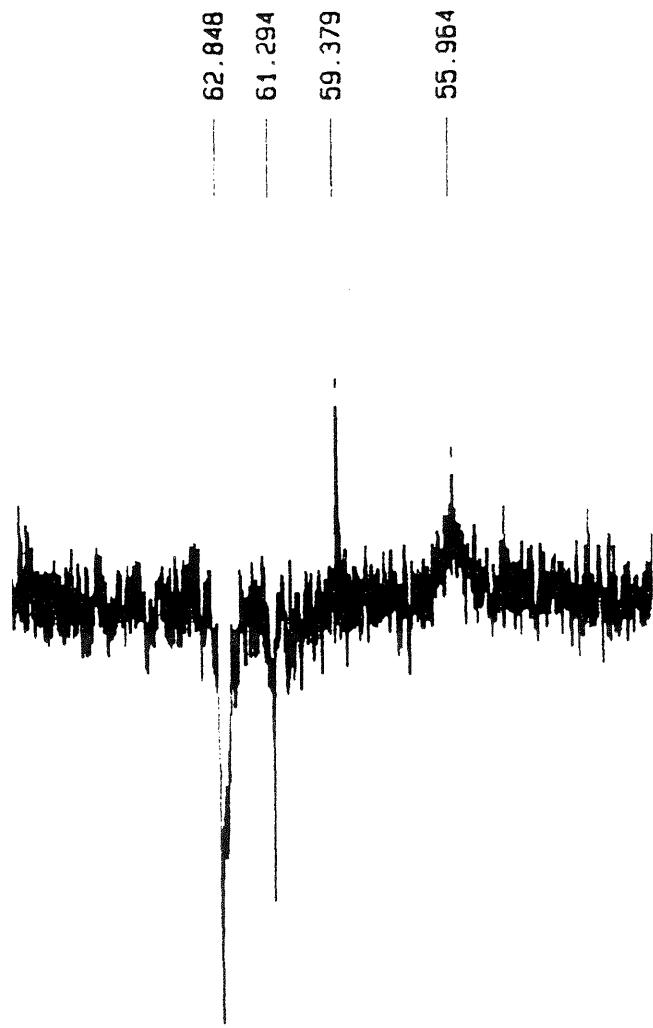
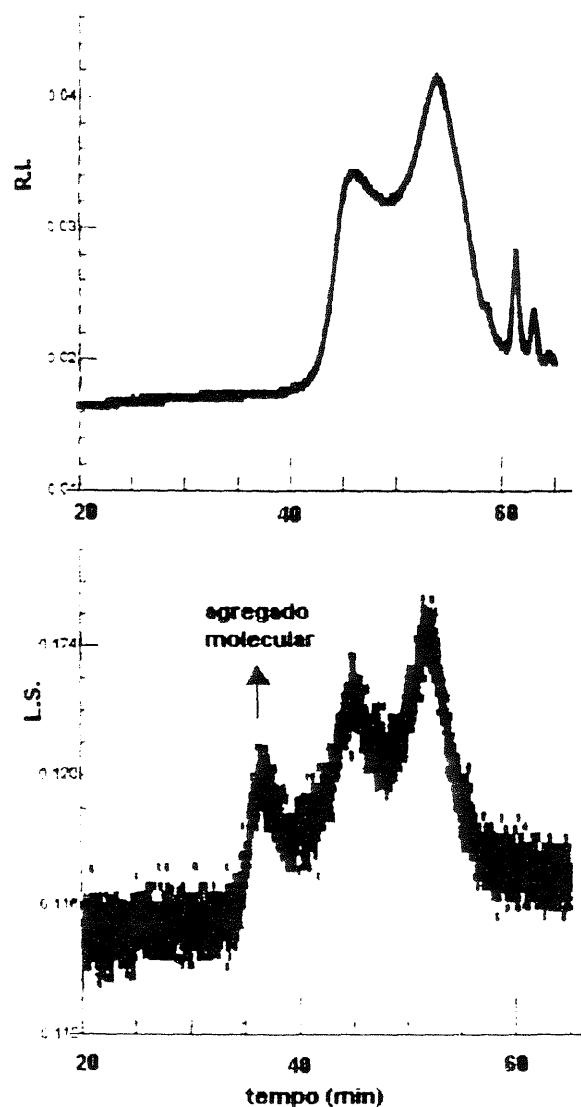


Figura 16. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -DEPT da fração **H1aT(água sol)** em D<sub>2</sub>O 1%. Os deslocamentos são expressos em ppm

A fim de verificar a possível homogeneidade do polissacarídeo estudado, a fração foi submetida a cromatografia analítica por gel permeação, utilizando técnica de GPC (HPLC acoplado a espalhamento de luz), resultando em um perfil heterogêneo, conforme apresentado na Figura 17.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz, da subfração H1aT(água sol).

A solução aquosa da subfração, previamente filtrada em filtro 0,22 µm, apresentou intensa formação de agregados moleculares, identificado pelo detector de difusão de luz (L.S.). A formação de agregados moleculares em polissacarídeos ácidos é discutido por RINAUDO (1993), onde verificou significativa redução de agregados após filtração em poro de 0,05 µm e consequente redução das massas moleculares médias, já que agregados moleculares superestimam esta determinação (EBRINGERROVA *et al.*, 1994b; GRUPPEN *et al.*, 1992a; IZYDORCZYK & BILIADERIS 1995).

Observa-se claramente a existência de dois picos, com massas moleculares distintas. Esta fração (**H1aT**), originada de uma extração com KOH 4 N, possivelmente apresenta modificações químicas decorrentes do drástico tratamento para solubilização das hemiceluloses. Por conta disso, as análises químicas e espectroscópicas das subfrações de **H1aT** serão comparadas com as subfrações de **KOH1a** (originada de uma extração mais suave com KOH 1N), a fim de se avaliar o efeito dos tratamentos com relação à integridade molecular destas hemiceluloses.

A fração **H1aT(água sol)** foi submetida a tratamento com sal de amônio quaternário (CETAVLON), que precipita os polissacarídeos ácidos presentes em solução. A quantidade de agente precipitante adicionado ao sistema é diretamente proporcional a quantidade de cargas existente no polissacarídeo. A adição exagerada de CETAVLON proporciona uma ressolubilização da porção precipitada, possivelmente devido a redução do complexo precipitante-polissacarídeo e maior interação do complexo precipitante-precipitante.

A proporção resultante de máxima formação de precipitado foi CETAVON : polissacarídeo foi de 3:5, quantidade bem mais baixa de CETAVLON que aquela citada por SCOTT, 1965, que relata uma relação CETAVON : polissacarídeo de 3:1.

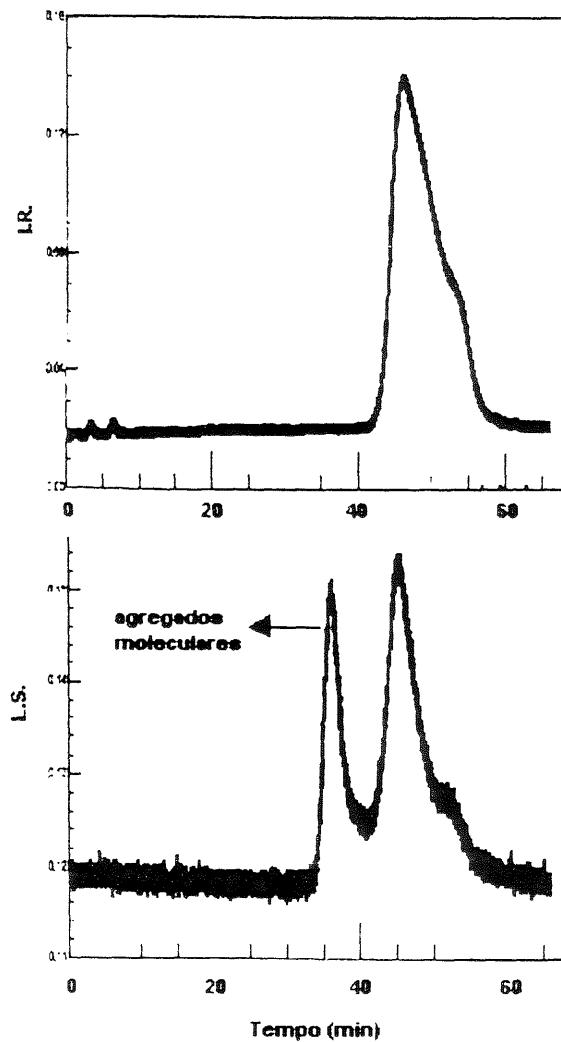
A subfração resultante da precipitação (**H1aTcetavlon**) foi analisada em sua composição monossacarídica (Tabela XIX), a partir da hidrólise, derivatização a acetatos de alditóis e análise por g.l.c.

**Tabela XIX.** Composição monossacarídica da fração **H1aT(água sol)** e a subfração resultante de precipitação com **CETAVLON**, **H1aTcetavlon**.

<b>Fração</b>	<b>Composição monossacarídica (mol %)</b>						
	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glu</b>
<b>H1aT(água sol)</b>	1,0	0,5	11,0	71,5	7,5	4,1	4,4
<b>H1aTcetavlon</b>	1,5	0,5	13,4	67,0	3,5	7,2	6,9

O conteúdo de açúcar total em torno de 25% indica que uma parte residual do sal quaternário ainda encontrou-se presente na fração, apesar do processo de diálise ter se prolongado durante três dias. Desta maneira, os métodos colorimétricos de dosagens de ácidos urônicos e fenólicos não foram procedidos.

A subfração **H1aTcetavlon**, solúvel em água, foi submetida ao teste de homogeneidade, utilizando-se técnica de GPC. A Figura 18 mostra o padrão de distribuição de massas moleculares nos detectores por índice de refração e difusão de luz.

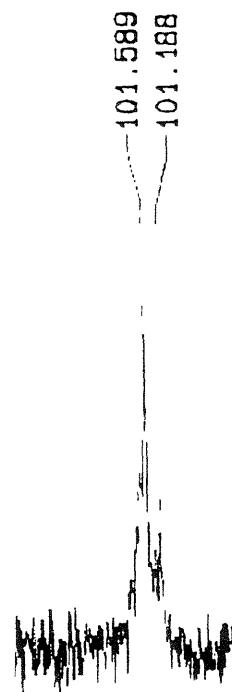


**Figura 18.** Perfil cromatográfico cromatográfico, realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz, da subfração **H1aTcetavlon**.

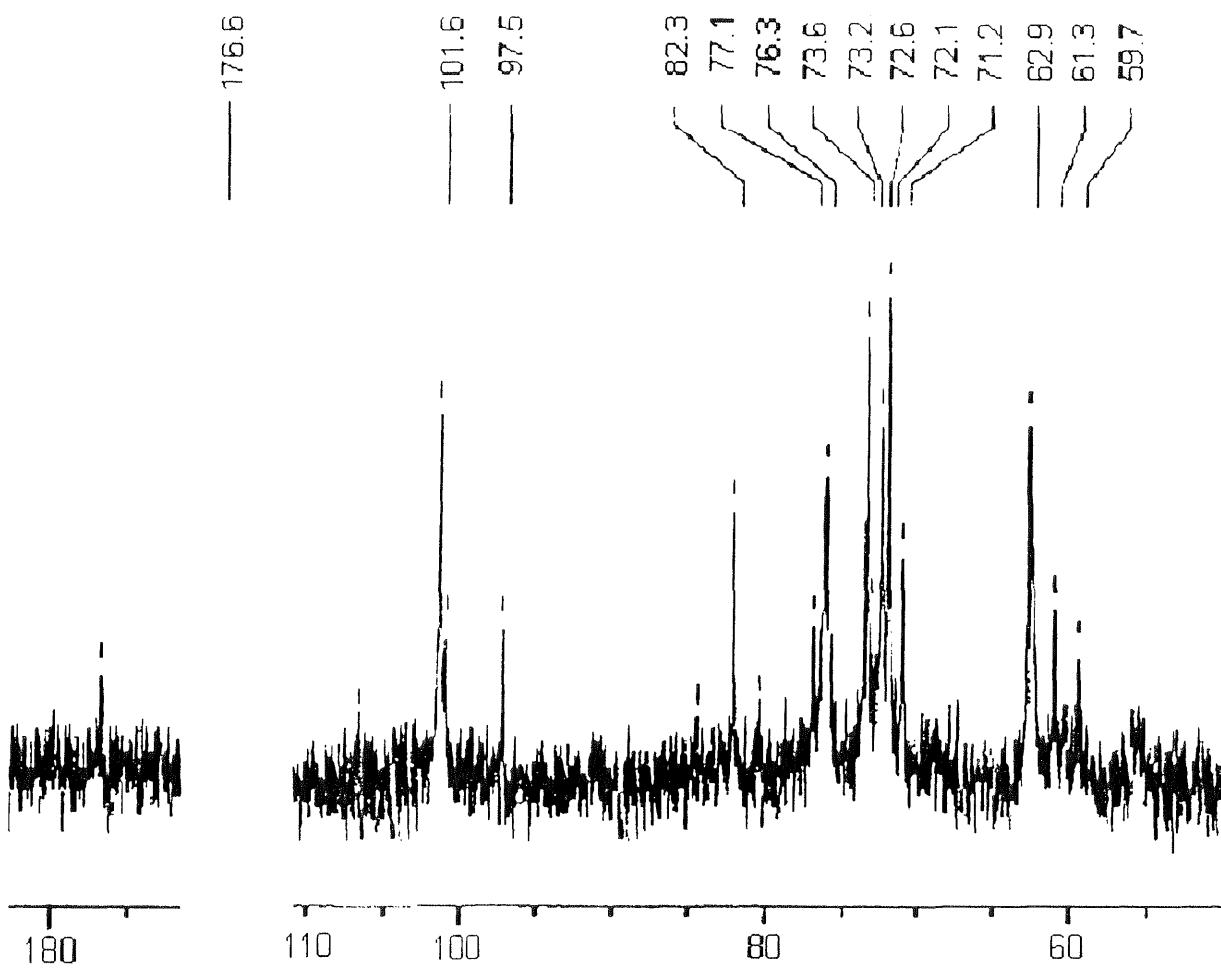
Conforme mostrado no gráfico por difusão de luz (L.S.), a fração apresenta grande quantidade de agregados moleculares, como ocorrido na fração

**H1aT(água sol).** Entretanto, a fração apresenta-se praticamente homogênea, indicando que o sal quaternário foi capaz de precipitar, nas quantidades utilizadas, aquela arabinoxilana de maior massa molecular, como pode ser evidenciado pelos tempos relativos de detecção dos picos, nas frações **H1aT(água sol)** e **H1aTcetavlon** (Figura 17; Figura 18).

A fração **H1aTcetavlon** foi analisada por  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 19). Os sinais de todos os carbonos da fração **H1aTcetavlon** são similares àqueles encontrados para a fração **H1aT(água sol)**, tanto na distribuição quanto na intensidade, reforçando a hipótese que a arabinoxilana de *P. lambertii* seja constituída por uma única estrutura molecular, diferindo apenas na distribuição das massas moleculares. A similaridade em torno da estrutura pode ser melhor explicada através da região de C-1 da xilose (Figura 20).



**Figura 20.** Região de C-1 de Xilp, em espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da subfração **H1aTcetavlon**.



**Figura 19.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração H1aTcetavlon, em  $\text{D}_2\text{O}$  1%. Os deslocamentos são expressos em ppm.

Um sinal em  $\delta$  55,6, sugerido na fração anterior como grupamento metoxil, novamente está presente, mesmo após o processo de fracionamento com CETAVALON, indicando que este grupamento, atribuído como parte integrante da lignina, também esteja quimicamente ligado ao polissacarídeo.

As análises até então realizadas, a partir da fração **H1aT** (Fluxograma II) podem suscitar uma discussão em torno da integridade dos polissacarídeos estudados, já que a fração foi originada por extração alcalina 4N, ambiente químico que pode levar a degradação das cadeias polissacarídicas. Desta forma, foi procedida a análise estrutural da fração **KOH1a** (Fluxograma IV; Tabela IX), originada de extração com **KOH 1N**, condição mais suave e amplamente utilizada na remoção de hemiceluloses. Além disso, apresenta um conteúdo bastante significativo de arabinose e alto rendimento em peso seco.

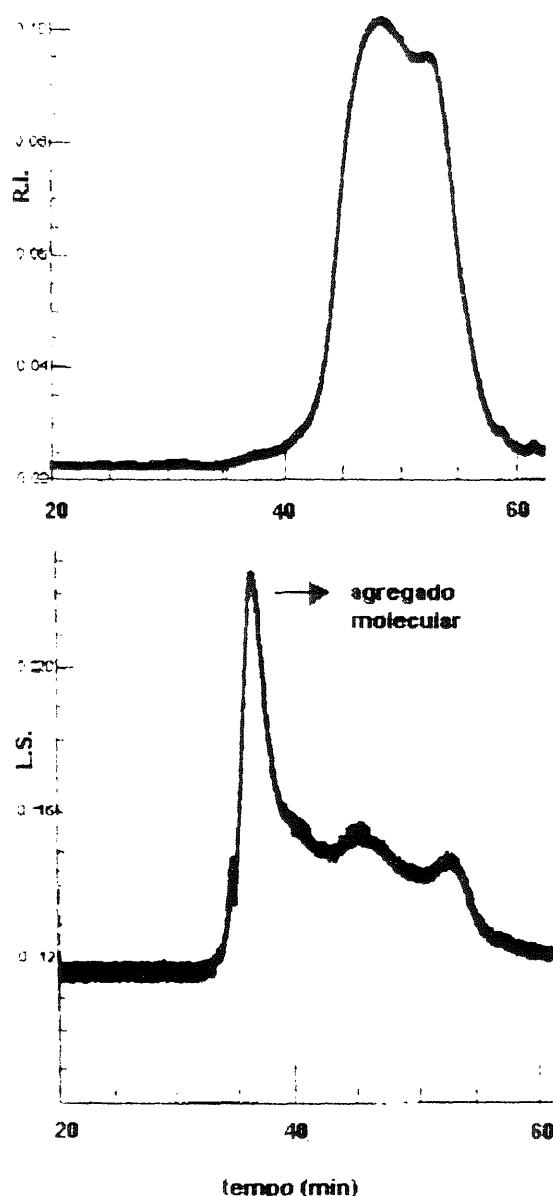
A fração **KOH1a** foi submetida ao fracionamento por solubilidade, a fim de reduzir o conteúdo de hexoses da fração, componentes de 30,6 mol %. As arabinoxilanás ácidas, solúveis em água, permaneceram no extrato, gerando após precipitação com etanol, a fração **KOH1a-água(sol)**; o resíduo insolúvel em água gerou a fração **KOH1a-água(ins)**. A composição monossacarídica das frações estão apresentadas na Tabela XX.

**Tabela XX.** Composição monossacarídica da fração **KOH1a** e subfrações resultantes do fracionamento por solubilidade em água, **KOH1a-água(sol)** e **KOH1a-água (ins)**.

<b>Fração</b>	<b>Monossacarídeos neutros (mol %)</b>						
	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glu</b>
<b>KOH1a</b>	2,6	0,6	22,6	40,2	13,8	15,2	5,6
<b>KOH1a-água(sol)</b>	1,0	0,8	28,2	45,3	10,4	11,7	2,6
<b>KOH1a-água (ins)</b>	0,2	--	8,9	30,6	10,8	18,8	30,7

O fracionamento por solubilidade em água não mostrou-se significativamente eficiente, levando a subfração **KOH1a-água(sol)** a novas etapas de purificação. A subfração insolúvel em água **KOH1a-água(ins)**, mostrou-se similar à subfração **H1aTágua(ins)**, agregando a maior parte dos polissacarídeos contendo manose, galactose e, principalmente, glucose.

A subfração **KOH1a-(água sol)** foi submetida a cromatografia analítica por gel permeação, utilizando técnica de GPC (HPLC acoplado a difusão de luz), resultando em um perfil heterogêneo, conforme apresentado na Figura 21.



**Figura 21.** Perfil cromatográfico da subfração KOH1a-água(sol).

O perfil cromatográfico indica a presença de um pronunciado pico referente a agregados moleculares, como apresentado para as outras frações de arabinoxilananas estudadas (Figuras 17 e 18). Nota-se claramente a sobreposição de dois picos similares no espectro por índice de refração (R.I.), também caracterizado na fração H1aTágua(sol) (Figura 17).

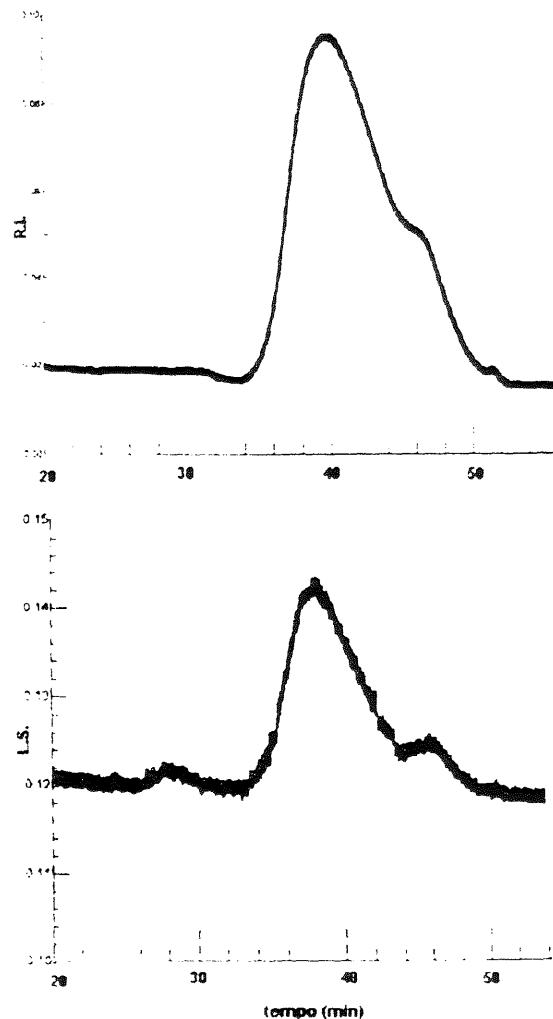
O baixo rendimento obtido no fracionamento com CETAVLON motivou a utilização de outra técnica de purificação das arabinoxilananas de **KOH1a-água(sol)**, desta vez utilizando uma solução saturada de Ba(OH)<sub>2</sub>, capaz de precipitar apenas polissacarídeos contendo manose (MEIER, 1965). A fração solúvel gerou a fração **KOH1a-bálio(sol)** e a fração precipitada, **KOH1a-bálio(ppt)**. A composição monossacarídica das frações está apresentada na Tabela XXI.

**Tabela XXI.** Composição monossacarídica da fração **KOH1a-água(sol)** e subfrações resultantes do fracionamento por solubilidade em água **KOH1a-bálio(sol)** e **KOH1a-bálio(ppt)**.

Fração	Composição monossacarídica (mol %) *							Xil:Ara
	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	
<b>KOH1a-água(sol)</b>	2,6	0,6	22,6	40,2	13,8	15,2	5,6	1,8:1
<b>KOH1a-bálio(sol)</b>	1,6	0,6	13,4	81,8	0,8	4,2	0,2	6,1:1
<b>KOH1a-bálio(ppt)</b>	-	-	-	5,5	50,8	6,2	37,5	-

O expressivo incremento nos teores de xilose, após tratamento com Ba(OH)<sub>2</sub>, levaram a fração **KOH1a-bálio(sol)** ao prosseguimento do estudo. A redução significativa do conteúdo de arabinose sugere a degradação do polissacarídeo nativo pelo álcali. Além disso, o rendimento foi baixo, assim como ocorrido para o fracionamento com CETAVLON.

A subfração **KOH1a-bário(sol)** foi submetida a cromatografia analítica por gel permeação, utilizando técnica de GPC (HPLC acoplado a difusão de luz), resultando em um perfil heterogêneo, conforme apresentado na Figura 22.



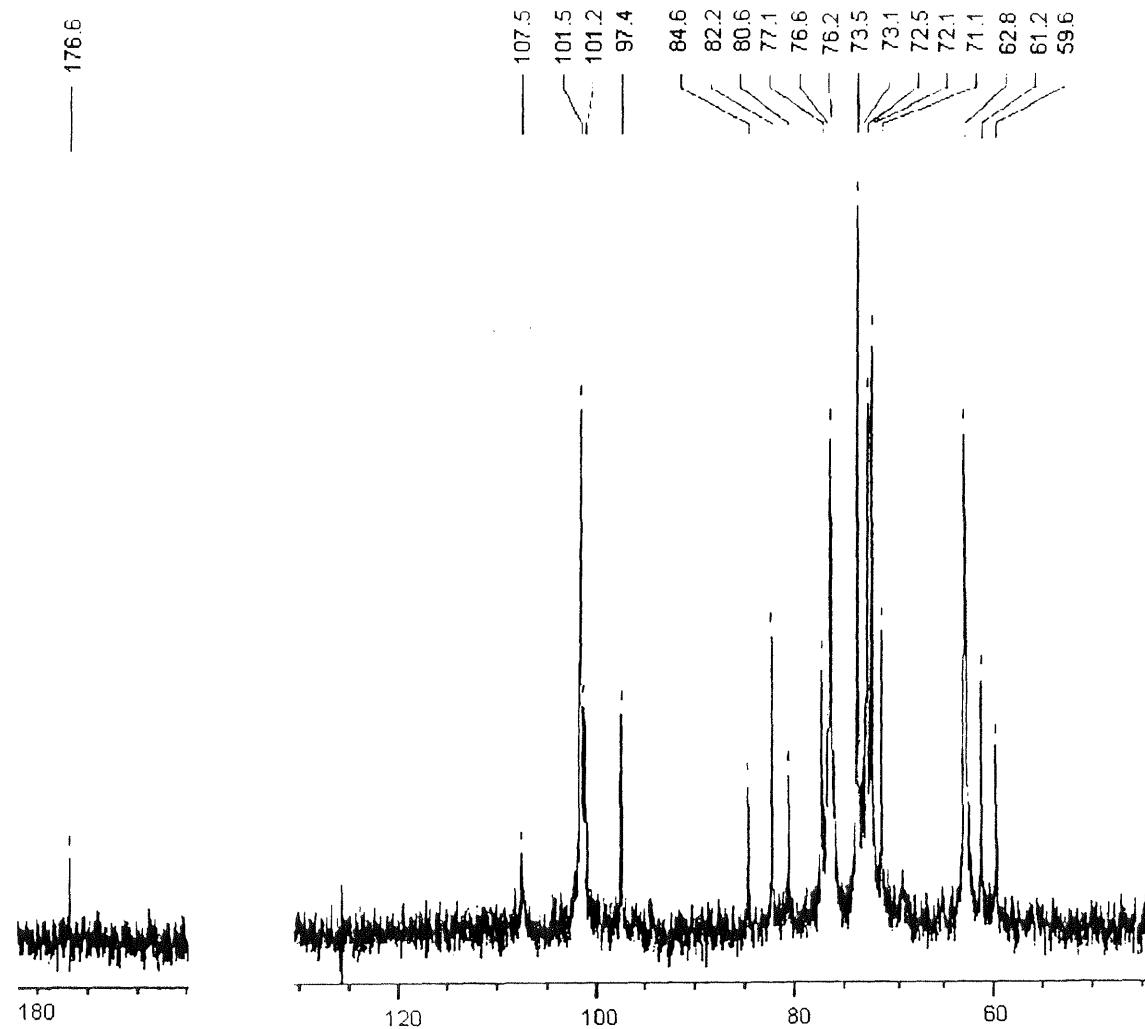
**Figura 22.** Perfil cromatográfico, realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento de luz, da subfração **KOH1a-bário(sol)**.

Pode-se notar que o perfil cromatográfico apresenta um pico, principal de massa molecular maior. A ausência de formação de agregados também foi observada para a subfração **KOH1a-bário(sol)**.

O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN desta subfração (Figura 23) apresenta-se similar aos apresentados pelas frações anteriores (Figuras 15 e 19), onde a região de C-1 de xilose indica apenas dois sinais ( $\delta$  101,5 e  $\delta$  101,1), o primeiro relativo às ligações de xilopiranose  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) ligadas e o segundo relativo ao deslocamento de C-1 de xilose (Figura 24), proveniente das substituições na posição 3 por unidades de arabinose e na posição 2 por unidades de ácido 4-O-metilglucurônico (sinal de metil em  $\delta$  59,6 e carboxila em  $\delta$  176,6).



**Figura 24.** Região de C-1 de Xilp, em espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da subfração KOH1a-bário(sol).



**Figura 23.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração KOH1a-báário(sol), em  $\text{D}_2\text{O}$  1%. Os deslocamentos são expressos em ppm

A fração KOH1a-água(sol)foi também submetida a separação por gel filtração, utilizando Sephadex S-200. A fração eluída com maior rendimento (23 mg), denominada KOH1a(col) foi submetida a análise por GPC. A Figura 25 mostra um perfil cromatográfico heterogêneo. A dificuldade de separação de arabinoxilanas deve-se, provavelmente, a similaridade de massas moleculares existente entre os polímeros.

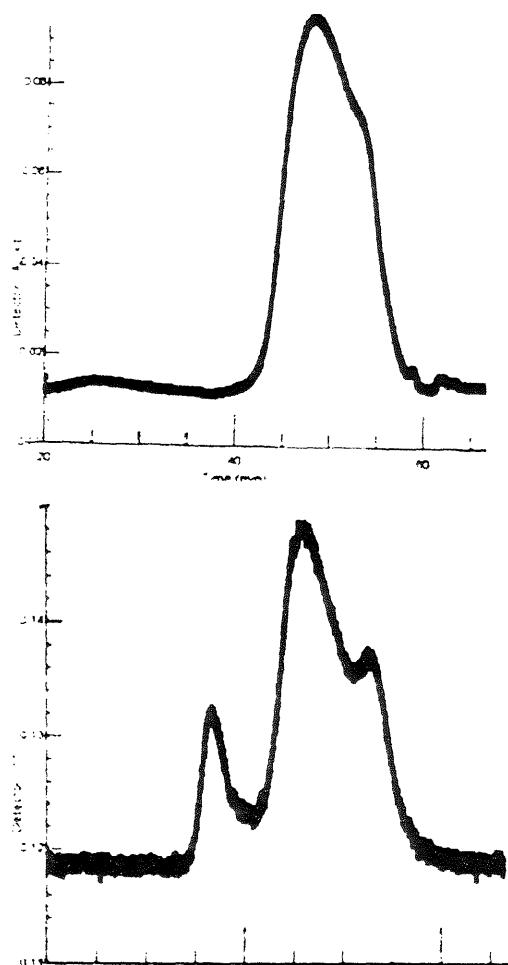


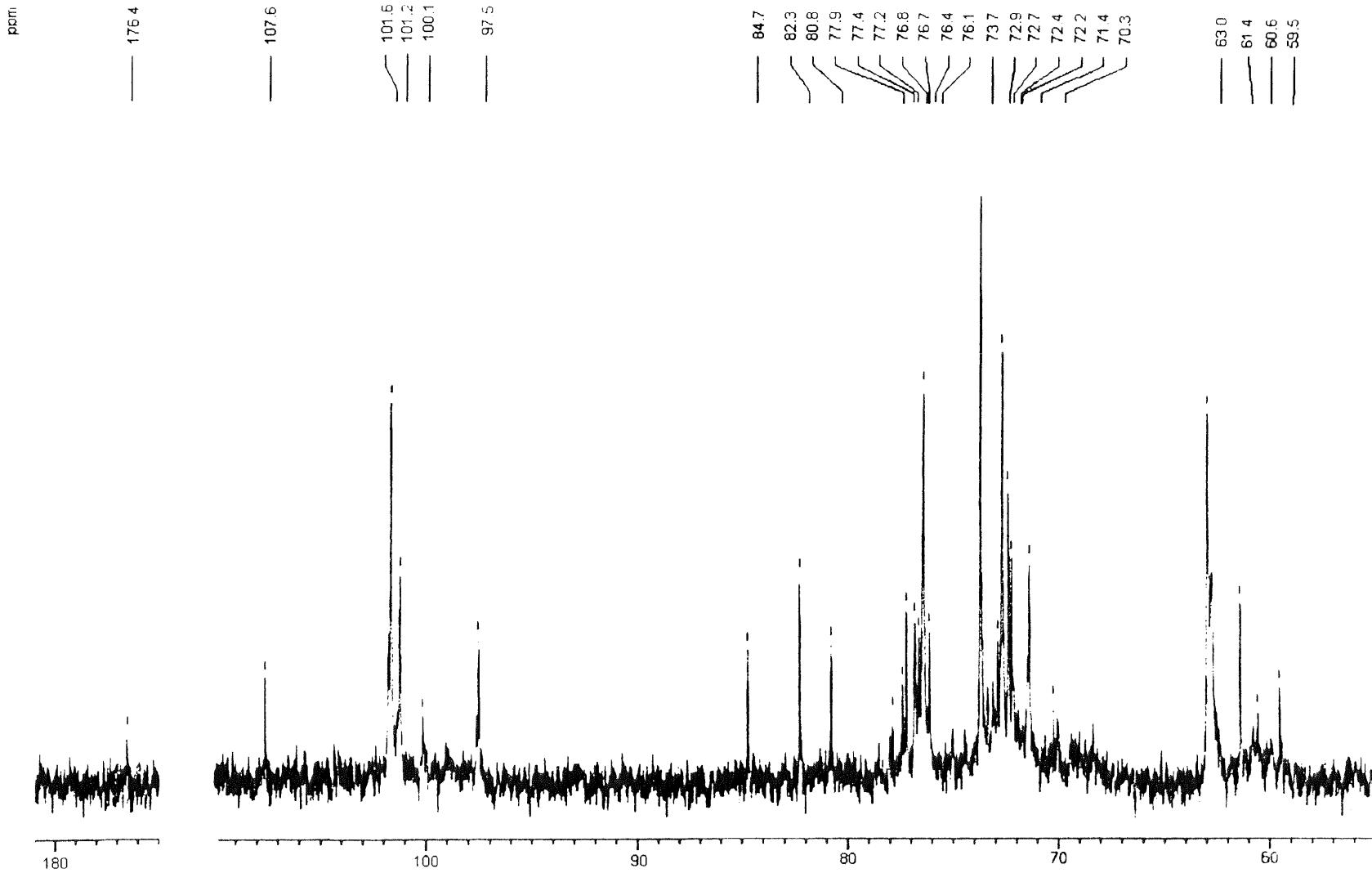
Figura 25. Perfil cromatográfico, realizado por GPC acoplado a detector de espalhamento, de luz da subfração KOH1a(col)

A fração foi submetida a análise por  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 26), apresentando similaridade com os outros espectros de arabinoxilananas já mostrados.

Apesar da presença de algumas características macromorfológicas comuns às angiospermas, as análises realizadas revelam estruturas químicas de galactoglucomanananas e arabinoxilananas típicas de outras gimnospermas, (Introdução, item 1.6.). Sabe-se, no entanto, que as coníferas possuem teores significativamente mais elevados de (galacto)glucomanananas do que arabinoxilananas. A hidrólise de Saeman (SAEMAN *et al.*, 1954) do xilema original indicou quantidades equivalentes de manose e xilose, conforme mostrado na Tabela XXII.

Tabela XXII. Composição monossacarídica de xilema de *Podocarpus lambertii*, obtida por hidrólise de Saeman em diversos tempos de pré-hidrólise.

Tempo de pré-hidrólise	Composição monossacarídica (mol%)						
	Fuc	Ram	Ara	Xil	Man	Gal	Xil:Man
½ hora	0,5	3,7	12,1	32,5	36,6	15,2	0,9:1
1 hora	0,5	2,9	11,3	35,8	34,5	15,4	1,0:1
1,5 horas	0,3	1,9	10,4	34,0	40,4	13,3	0,8:1
2 horas	0,2	1,6	12,0	34,9	40,3	11,3	0,9:1



**Figura 26.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração **KOH1a-col**, em  $\text{D}_2\text{O}$  1%. Os deslocamentos são expressos em ppm.

Assim, os teores equivalentes de arabinoxilananas e glucomanananas podem sugerir uma possível substituição gradativa dos polissacarídeos estruturais da parede secundária durante o processo evolutivo dos vegetais. Não se pode, entretanto, atribuir um grupo taxonômico à espécie a partir das proporções de polissacarídeos. STACE (1996), comenta que não é possível predizer qual o valor real da quimiotaxonomia, pois não se conhece limites específicos para cada grupo vegetal.

## **5. Conclusões**

---

- A obtenção de hemiceluloses do xilema de *Podocarpus lambertii* tornou-se mais efetiva com a prévia remoção da lignina, utilizando clorito de sódio.
- A deslignificação que utiliza maior concentração de reagentes (2x) foi capaz de solubilizar uma quantidade maior de lignina que aquela utilizando condições mais brandas. No entanto, ambas as condições foram suficientes para permitir a extração de quantidades similares de hemiceluloses.
- Os métodos colorimétricos de dosagem de proteínas, Bradford e Hartree, apresentaram resultados superestimados para hemiceluloses de xilema de *P. lambertii* e *P. selowii*, , sendo atribuídos à contaminação de compostos fenólicos, advindos da lignina. O método de Peterson, que elimina a presença destes compostos, produziu resultados compatíveis.
- As extrações de hemiceluloses com hidróxido de potássio foi capaz de soubilizar, de maneira seletiva, quantidades maiores de xilan. Já hidróxido de sódio não apresentou seletividade, extraindo tanto xilan quanto glucomanan.
- As hemiceluloses de *Podocarpus lambertii* são constituídas por galactoglucomanan, com cadeia principal formada por unidades de D-manopiranose e D-glucopiranose ligadas glicosidicamente  $\beta(1 \rightarrow 4)$  e substituições simples de D-galactopiranose ligadas  $(1 \rightarrow 6)$ , além de arabino-4-O-metilglucuronoxilana, com

cadeia principal de unidade de D-xilopiranose ligadas glicosidicamente  $\beta(1\rightarrow4)$  e ramificações simples de L-arabinofuranose substituída em O-3 e ácido 4-O-metilglucurônico substituído em O-2.

- As proporções similares de arabinoxilanás ácidas e galactoglucomananás podem evidenciar uma gradual substituição de polissacarídeos da parede celular de xilema, já que coníferas típicas apresentam teores majoritários de galactoglucomananás.

## **6. Referências Bibliográficas**

---

ADAMS, G.A. Lignin determination. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.5, p. 185-187, 1965a.

\_\_\_\_\_. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.5, p. 269-276, 1965b.

ANDREWARTHA, K.A.; PHILLIPS, D.R.; STONE, B.A. Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 77, p. 191-204, 1979.

ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York v. 14, p. 429-468, 1959.

ASPINALL, G.O. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In: **Polysaccharides**. v.2, Academic Press, New York, 1982.

AZUMA, J.I.; TAKAHASHI, N.; KOSHIJIMA, T. Isolation and characterization of lignin-carbohydrate complex from the milled-wood lignin fraction of *Pinus densiflora* Sieb et Zucc. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, Amsterdam, v. 93, p. 91-104. 1981.

BAZUS, A.; RIGAL, L.; GASET, A.; FONTAINE, T.; WIERUSZESKI, J.M.; FOURNET, B. Isolation and characterisation of hemicelluloses from sunflower hulls. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 243, p. 323-332, 1993.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 54, p. 484-489, 1973.

BOUVENG, H.O.; LINDBERG, B. Native acetylated wood polysaccharides. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 147-150, 1965.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHALA, A.J.; WILKIE, K.C.B. Total hemicelluloses from *Hordeum vulgare* plants at different stages of maturity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 13, p. 1347-1351, 1974.

BURGER, R.; RICHTER, H. **Anatomia da Madeira**. Ed. FUPEF, Curitiba, 1992.

CARPITA, N.C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 47, p. 445-476, 1996.

CARPITA, N.C.; WHITTERN; D. A highly substituted glucuronoarabinoxylan from developing maize coleoptiles. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 146, p. 129-140, 1986.

CARVALHO, P.E.R. **Especies Florestais Brasileiras. Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. EMBRAPA-SPI, Colombo, Paraná, 1994.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, 131, 209-217, 1984.

COIMBRA, M.A.; WALDRON, K.W.; SELVENDRAN, R. R. Isolation and characterisation of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europaea* L) **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, 252:245-262, 1994.

CORRÊA, J. B. C.; ROMANOWSKI, S. M. M.; SIERAKOWSKI M. R.; FONTANA, J. D.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F. Ester-type lignin xylan linkages in cell wall of stem of *Mimosa scabrella*. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, 59(3): 179-184, 1987.

CROON, I.; LINDBERG, B.O. Studies on glucomannan from norwegian spruce. **Acta. Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 12, p. 453-456, 1958.

CROON, I.; HERRSTRÖM, G; KULL, G.; LINDBERG, B. Demethylation and degradation of sugars in acid hydrolysis. **Acta. Chem. Scand.**, Copenhagen v.14, p. 1338-1342, 1960.

DAS, N.N.; DAS, S.C.; DUTT, A.S.; ROY, A. Lignin-xylan linkage in jute fiber (*Corchorus capsularis*). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 94, p. 73-82, 1981.

DAS, N.N.; DAS, S.C.; MUKHERJEE, K. On the ester linkage between lignin and 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan in jute fiber (*Corchorus capsularis*). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 127, p. 345-348, 1984a.

DAS, N.N.; DAS, S.C.; SARKAR, A.K.; MUKHERJEE, K. Lignin-xylan ester linkage in mesta fiber (*Hibiscus cannabinus*). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 129, p. 197-207, 1984b.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

DU PONT, M.S.; SELVENDRAN, R.R. Hemicellulosic polymers from the cell walls of breswing wheat bran: part I, polymers solubilised by alcali at 2°. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.165, p. 99-113, 1987.

DUTTON, G.G.S.; HUNT, K.; The constitution of the hemicelluloses of sitka spruce (*Picea sitchensis*). I. Composition of the hemicellulose and identification of 2-O-(4-O-methyl-D-glucopyranosiduronic acid)-D-xylose. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 80, p. 4420-4424, 1960a.

\_\_\_\_\_. The constitution of the hemicelluloses of sitka spruce (*Picea sitchensis*). III. Structure of na arabomethoxyglucuronoxylan. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 82, p. 1682-1686, 1960b.

EDA, S.; AKIYAMA, Y.; KATO, K. Structural investigation of a galactoglucomannan from cell walls of tobacco (*Nicotiana tabacum*) Midrib. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam,v. 131, p. 105-118, 1984.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMADKOVÁ, Z.; BERTH, G. Structural and molecular properties of a water-soluble arabinoxylan-protein complex isolated from rye bran. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 264, p. 97-109, 1994a.

EBRINGEREROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; BURCHARD, W.; DOLEGA, R.; VORWERG, W. Solution properties of water-insoluble rye-bran arabinoxylan. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 24, p. 161-169, 1994b.

FEIN, J.E.; TALLIM, S.R., LAWFORD, G.R. Evaluation of D-xylose fermenting yeasts for utilization of a wood-derived hemicellulose hydrolysate. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 30, n. 5, p. 682-690, 1984.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Polyoses (hemicelluloses). In: **Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions.** Walter de Gruyter, New York, 1989.

FILIPPOV, M.P.; Practical infrared spectroscopy of pectics substances. **Food Hydrocolloids**, v.6, p. 115-124, 1992.

FOSKET, D.E. Characteristics of plant cells that are important in development. In: **Plant Growth and Development. A molecular Approach.** Ed: Academic Press. San Diego, 1994.

GABRIELLI, I.; GATENHOLM, P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 69, n.8, p.1661-1667, 1998.

GOLDBERG, R.; GILLOU, L.; PRAT, R.; DU PENHOAT, C.H.; MICHON, V. Structural features of the cell-wall polysaccharides of *Asparagus officinalis* seeds. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 166, p. 71-74, 1987.

GOLDSTEIN, I. L.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, J. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.5, p. 361-370, 1980.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 53, p. 1212-1223, 1975.

GORIN, P.A.J.; SPENCER, F.T. Proton magnetic resonance spectroscopy - an aid in determination and chemotaxonomy of yeasts. **Adv. Appl. Microbiol.**, San Diego, v. 13, p. 25-87, 1970.

GRAHAN, W; RUSSELL, W.L.; LOMAX, J.A; JARVIS, M.C.; LAPIERRE, C.; CHESSON, A. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 272, p. 41-53, 1995.

GREEN, J.W. Wood cellulose. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 3, p. 9-21, 1963.

GRUPPEN, H.; HAMER, R.J. VORAGEN, A.G.J. Barium hydroxide as a tool to extract pure arabinoxylan from water-insoluble cell wall material of wheat flour. **J. Cereal Sci.**, London, v.13, p. 275-290, 1991.

GRUPPEN, H.; HAMER, R.J. VORAGEN, A.G.J. Water-insoluble cell wall material from wheat flour.2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. **J. Cereal Sci.**, London, v.16, p. 53-67, 1992 a.

GRUPPEN, H.; HOFFMAN, R.A.; KORMELINK, F.J.M.; VORAGEN, A.G.J.; KAMERLING, J.P. VLIEGENTHART, J.F.G. Characterisation by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of enzymatically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 233, p.45-64, 1992 b.

GUTHRIE, R.D. Periodate oxidation. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 1, p. 432-435, 1962.

HÄGGLUND, E.; LINDBERG, B.; McPHERSON, J. Dimethylsulphoxide, a solvent for hemicelluloses. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 10, p. 1160-1164, 1956.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. Chem. Soc.**, v.107, 8-16, 1915.

HAZENDONK, J.M.; REINERINK, E.J.M.; WAARD, P.; DAM, J.E.G. Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharide from fibre flax (*Linum unitatissimum* L.). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 291, p. 141-154, 1996.

HIRST, E.L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 287-298, 1960.

HOFFMANN, R.A., LEEFLANG, B.R.; DE BARSE, M.M.J.; KAMERLING, J.P.; VLIEGENTHART, J.F.G. Characterisation by  $^1\text{H}$ -n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides, derived from arabinoxylans of white endosperm of wheat, that contains the elements  $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3)]-\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow \text{or}\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 2)][\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3]-\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$ . **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 221, p. 63-81, 1991.

HOFFMAN, R.A.; KAMERLING, J.P; VLIEGENTHART, J.F.G. Structural features of a water-soluble arabinoxylan form the endosperm of wheat. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 181, p. 303-311, 1992.

IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C.L. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer Moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 142, p. 237-251, 1985.

INOUE, M. T.; RODERJAN, C. V.; KUNIYOSHI, Y. S. **Projeto Madeira do Paraná**. FUPEF, p. 91- 97. Curitiba, 1984.

IZYDORCZYK, M.S.; BILIADERIS, C.G. Studies on the structure of wheat-endosperm arabinoxylans. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 24, p. 61-71, 1994.

\_\_\_\_\_. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physiochemical properties. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 28, p. 33-48, 1995.

JOLY, A.B. **Botânica. Introdução à taxonomia vegetal.** Companhia Editora Nacional, São Paulo, 1991.

JONES, J.K.N.; STOODLEY, R.J. Fractionation using cooper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p.36-38, 1965.

JOSELEAU, J.P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure and their interaction in the plant cell walls. In: **Xylans and xylanases.** Elsevier, Amsterdã, p. 1-15, 1993.

KABAT, E. A.; MAYER, M. M. Kjeldahl nitrogen determination. In: **Experimental Immunochem.** Thomas, C.C. (Ed). Bannerstone house, Springfield, Illinois, 476-483, 1964.

KATO, Y.; NEVINS, D. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-xylopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylopiranose as a component of Zea shoot cell-walls. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 138, p. 131-134, 1985.

KEEGSTRA, K; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 51, p. 188-196, 1973.

KELCH, D.G. Phylogeny of Podocarpaceae: comparison of evidence from morphology and 18S rDNA. **Am. J. Bot.**, Columbus, v. 85, n. 7, p.986-996, 1998.

KOOIMAN, P.; ADAMS, G.A. Constitution of a glucomannan from tamarack (*Larix laricina*) **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 39, p. 889-896, 1961.

KOVAC, P.; HIRSCH, J. <sup>13</sup>C-N.M.R. spectra of xylo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 85, p. 177-185, 1980.

KUBACKOVA, M.; KARACSONYI, S. BILISICS, L. Structure of galactoglucomannan from *Populus molinifera* H. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 19, p. 125-129, 1992.

LASTICK, S.M.; MOHAGHEGHI, A.; TUCKER, M.P.; GROHMAN, K. Simultaneous fermentation and isomerization of xylose to ethanol at high xylose concentration. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v. 24-25, p. 431-440, 1990.

LINDBERG, B.O. The lignin-carbohydrate complex. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.12, p. 447-452, 1958.

LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. **Methods Enzimol.**, San Diego, v.XXVIII B, p. 178-195, 1972.

LINDBERG, B.; LÖNNGBERG, J.; SVENSSON, S. Specific degradation of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, Washington, v. 31, p. 185-239, 1975.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Plantarum Ltda., São Paulo, p.319, 1992.

MAEDA YY. TAKAHAMA S. YONEKAWA H. Four dominant loci for the vascular responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. **Immunogenetic**, v.47, p. 159-165, 1998.

MAINIERI, C.; PIRES, J.M. **O Gênero *Podocarpus* no Brasil**. Silvicultura em São Paulo, vol. 8, São Paulo, 1973.

McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K. Enzymic analysis of polysaccharide structure. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, Washington, v. 44, p. 147-160, 1986.

MEIER, H. Studies on hemicelluloses from pine (*Pinus sylvestris* L.). **Acta. Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 12, p. 1911-1918, 1958.

MEIER, H. Isolation and characterisation of an acetylated glucomannan from pine (*Pinus sylvestris* L.). **Acta. Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 15, p. 1381-1385, 1961.

MEIER, H. Studies on a galactan from tension wood of beech (*Fagus sylvatica* L.)

**Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 16, p. 2275-2283, 1962.

MEIER, H. Fractionation by precipitation with barium hydroxide. **Methods**

**Carbohydr. Chem.**, New York, v.5, p. 45-46, 1965.

MICHNIEWICZ, J.; BILIADERIS, C. G.; BUSHUK W. Water-Insoluble Pentosans of Wheat: Composition and Some Physical Properties. **Cereal Chem.**, St. Paul, v. 67, p. 434-439, 1990.

MILLIS, A.R.; TIMELL, T.E. Constitution of three hemicelluloses from the wood of engelmann spruce (*Picea engelmanni*). **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 41, p. 1398-1395.

MORRISON, I.M. Structural investigation on the lignin-carbohydrate complexes of *Lolium perenne*. **Biochem. J.**, Great Britain, v. 139, p. 197-204, 1974.

NEEDS, P.W.; SELVENDRAN, R.R. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxyde/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulphoxide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 245, p. 1-10, 1993.

OHKOSHI, M.; KATO, A.; HAYASHI, N. <sup>13</sup>C-NMR analysis of acetyl groups in acetylated wood. Acetyl groups in cellulose and hemicellulose. **Mokuzai Gakkaishi**, Tokyo, v. 43, p. 327-336, 1997.

O'NEIL, M.A. SELVENDRAM, R.R. Hemicellulosic complexes from the cell walls of runner bean (*Phaseolus coccineus*). **Biochem.**, J., Great Britain, v. 227, p. 475-481, 1985.

Pesquisas em Recursos Florestais do Paraná. **Qualidade da madeira de *Pinus elliottii*, *Pinus taeda* e *Araucaria angustifolia* e sua correlação com as propriedades do papel**. Convênio FINEP/UFPR, 1979.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 83, p. 346-356, 1977.

PETKOWICZ, C.L.O.; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Galactomanannans and arabinans from seeds Caesalpiniaceae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 737-743, 1998.

PINTO, G.L.; MARTÍNEZ, M.; RIVAS, C. Chemical and spectroscopy studies of *Cercidium praeox* gum exudate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 260, p. 17-25, 1994.

POPA, V.I. Hemicelluloses. In: **Polysaccharides in medical applications**. Severian Dumitriu, Ed. Marcel Dekker, p.107-123, New York, 1996.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: **Hemicelluloses and Hemicellulases**. Portland Press, Londres, 1993

RAIDARU, G.; MOTTUS, E.; ILOMETS, T.; MOTTUS, A.; MASER, M.; Isolation of polysaccharides with antitumour activity from *Bamboo grass sasa kurilensis* (fr. et sar.) **Eksp. onkol.**, Kiev, v. 19, p. 353-357, 1997.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C. Lignin-hemicellulose complexes from the stem of *Mimosa bracatinga*, Hoehne. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, v. 54, p. 579-584, 1982.

REICHER, F. Estudos sobre a localização de grupos O-acetílicos e de complexo lignina-xilana em hemicelulose nativa de *Mimosa scabrella*. **Tese de Doutorado**, UFPR, Curitiba, 1984.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C.; GORIN, P. A. J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of O-acetyl group migration. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 135, p. 129-140, 1984.

REICHER, G.; GANTER, J.L.M.S.; RECHIA, C.V.G.; SIERAKOWSKI, M.R.; GORIN, P.J.A. Uneven O-acetyl distribution in a lightly acetylated D-xylan from sugar cane. **Glycobiol. Res.**, Oxford, v. 46, p. 283-285, 1994.

REID, J.S.G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochem.**, London. Ed: Academic Press, p. 205-236, 1997.

RINAUDO, M. Polysaccharide characterization in relation with some original properties. **J. Appl. Pol. Sci.**, v. 52, p. 11-17, 1993.

ROMANOWSKI, S.M.M. Estudo dos Substituintes em xilana de *Mimosa scabrella* (bracatinga) em diferentes estágios de crescimento. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 1986.

RYBKA, K.; SITARSKI, J.; BOJANOWSKA, K.R. Ferulic acid in rye and wheat grain and grain dietary fiber. **Cereal Chem.**, St. Paul, v. 70, p. 55-59, 1993.

SAEMAN, J. F. et al. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.** 37(8): 336-343, 1954.

SARKANEN, K.V.; HERGERT, H.L. Classification and distribution. In: **Lignins**. Wiley-Interscience, p. 43-89, Toronto, 1971.

SCHWARZ, E.C.A.; TIMELL, T.E. Characterization of three hemicelluloses from the wood of amabilis fir (*Abies amabilis*). **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 41, p. 1381-1388, 1963.

SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.5, p. 38-44, 1965.

SELVENDRAN, R.R.; KING, S.E. Structural features of the cell-wall polysaccharides of the parchment layers of the pods of mature runner beans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 195, p. 87-89, 1989.

SHIIBA, K.; YAMADA, H.; HARA, H.; OKADA, K.; NAGAO, S. **Cereal Chem.**, St. Paul, v. 70, p. 209-214, 1993.

SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 9-23, 1993.

SIMKOVIC, I.; ALFORDI, J.; MATULOVA, M. A <sup>13</sup>C-N.M.R. study of the alkaline degradation products of polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 152, p. 137-141, 1986.

SIMS, I.M.; CRAIK, D.J.; BACIC, A. Structural characterization of galactoglucomanan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 303, p. 79-92, 1997.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry. Fundamentals and Applications.** 2ed, Academic Press, Inc., San Diego, 1993.

STACE, C.A. Source of Taxonomic Information. In: **Plant Taxonomy and Biosystematics.** Ed: Cambridge University Press. Cambridge, 1996.

STERK, H.; SATTLER, W.; ESTERBAUER, H. Investigations of lignocellulosic materials by the carbon-13 N.M.R. C.P.-M.A.S. method. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 164, p. 85-95, 1987.

STOFFBERG, E. Morphological and ontogenetic studies on southern African Podocarps: Initiation of the seed scale complex and early development of integument, nucellus and epimatium. **Bot. J. Linnean Soc.**, v. 105, p. 21-35, 1991.

SUN, R.; LAWATHER, J.M.; BANKS, W.B. Fractional and characterization of wheat straw hemicelluloses. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 29, p. 325-331, 1996.

SUN, R.; FANG, J.M.; GOODWIN, A.; LAWATHER, J.M.; BOLTON, A.J. Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 37, p. 351-359, 1998.

SWAMY, N.R.; SALIMATH, P.V. Structural features of acidic xylans isolated from red gram (*Cajanus cajan*) husk. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 197, p. 327-337, 1990.

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.**, Washington, v. 82, p. 5211-5215, 1960.

TIMELL, T.E. Wood hemicelluloses. Part I. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 19, p. 247-302, 1964.

TIMELL, T.E. Galactoglucomannans. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 134- 137, 1965a.

TIMELL, T.E. Glucomannans. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 137-142, 1965b.

TIMELL, T.E. Wood hemicelluloses. Part II. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 20, p. 409-483, 1965c.

TIMINSKI, A. TIMELL, T.E. The constitution of a glucomannan from white spruce (*Picea glauca*). **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 82, p. 2823-2827, 1960.

TOMLINSON, P.B. Aspects of cone morphology and development in Podocarpaceae (Coniferales). **Int. J. Plant. Sci.**, Chicago, v. 153, n. 4, p. 572-588, 1992.

TORGET, R.; HATZIS, C.; HAYWARD, T.K.; HSU,T.A.; PHILIPPIDIS, G.P. Optimization of reverse-flow, two-temperature, dilute-acid pretreatment to enhance biomass conversion to ethanol. **Proceedings of the Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, p. 7-11, 1995.

USUI, T.; MIZUNO, T.; KATO, K.; TOMODA, M.; MIYAJIMA, G.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of gluco-manno-oligosaccharides and structurally related glucomannan. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 43 (4), p. 863-865, 1979.

UTILLE, J.P. N.m.r. spectra of aldobiaronic and aldotoriuronic acid derivatives related to 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 154, p. 251-258, 1986.

VARNER, J.E.; LIN, L.S. Plant cell wall arquiteture. **Cell**, Cambridge, v. 56, p. 231-239, 1989.

VINZANT, T.B.; EHRMAN, C.I.; ADNEY, W.S.; THOMAS, S.R.; HIMMEL, M.E. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated hardwoods. Effect of native lignin content. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, Part-A, v. 62, p. 99-104, 1997.

WADE, A.; WELLER, P.J. Xylitol. In: **Hand. Pharm. Excip.**, Ed. Pharmaceutical Press, London, 1994.

WALLACE, G.; RUSSELL, W.R.; LOMAX, J.A.; JARVIS, M.C.; LAPIERRE, C.; CHESSON, A. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 272, p. 41-53, 1995.

WANG H.B.; ZHENG Q.Y.; Effects of *Phytolacca actinosa* polysaccharides I with different schedules on its antitumor efficiency in tumor bearing mice and production of il-1, il-2, il-6, tnf, csf activity in normal mice. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, New York, v. 19, p.197-213, 1997.

WENDE, G; FRY, S.C. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. **Phytochemistry**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 1011-1018, 1997.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *J. Ferment. Bioeng.*, Osaka, v. 86, p. 1-14, 1998.

WILKIE, K.C.B. The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Washington, v. 36, p. 215-264, 1979.

WILKIE, K.C.B. Hemicellulose. When the world has  $10^{12}$  tons of an organic, renewable substance produced at the rate of  $10^{10}$  tons per year, don't you think you should know about it? *Chemtech*, Washington, p. 306-319, 1983.

WHITMORE, F.W. Phenolic acids in wheat coleoptile cell walls. *Plant Physiol.*, Rockville, v. 53, p. 728-731, 1974.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v.2, p. 211-215, 1963a.

\_\_\_\_\_. Reduction with sodium borohydride. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v.2, p. 65-68, 1963b.

WORANOWICZ, S.M.; GORIN, P.A.J.; MARCELLI, M.P.; TORRI, G.; IACOMINI, M. Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. *Lichenologist*, London, v. 29, n. 5, p. 471-481, 1997.

WORANOWICZ, S.M.; PINTO, B.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. *Phytochemistry*, Oxford, v. 51, n. 3, p. 395-402, 1999.

ZANUTTINI, M.; CITRONI, M.; MARTINEZ, M.J. Application of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy to the quantitative determination of acetyl groups in wood. **Holzforschung**, Berlin, v. 52, n.2, p.263-267, 1998.