

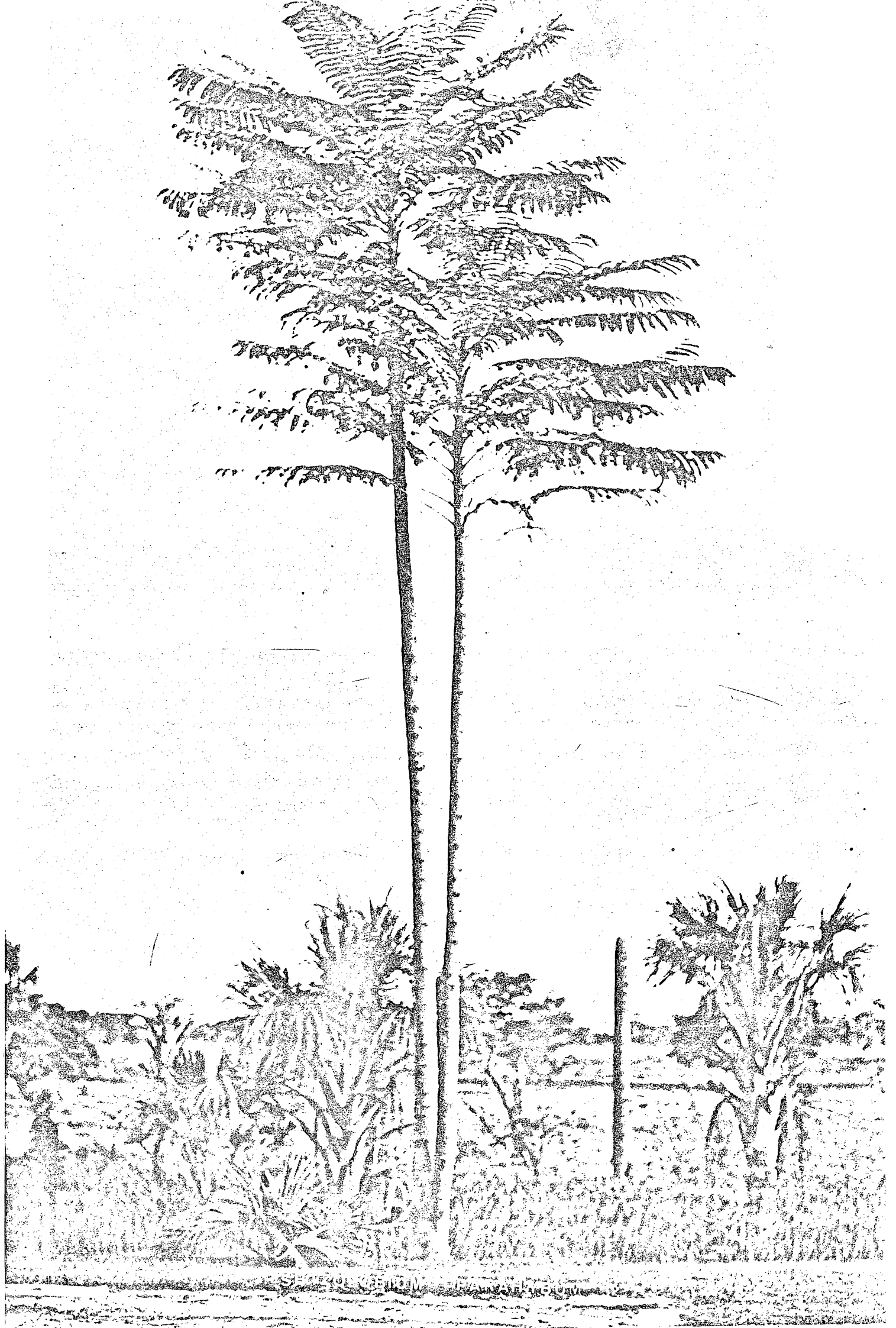
Izilda Angélica de Assis Devincenzi

ASPECTOS SOBRE ALGUNS COMPONENTES DO CAULE DE  
Schizolobium parahybum (Vell) Blake

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

C u r i t i b a

1985



Trabalho orientado pelo  
Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. João Batista C. Corrêa

Prof. Dr. Marcello Iacomini

Prof. Dr. Marco Aurélio L. Feijó

Ao Alexandre, companheiro dedicado e amigo, pelo amor, incentivo e sacrifício da ausência.

A Andreza, justificando as horas que não lhe dispensei, empenhada na realização deste trabalho, dedico o mesmo, na esperança que ele possa, um dia, servir-lhe de estímulo para suas realizações.

Aos meus pais, cujo amor, dedicação e trabalho constante, foram a base e o estímulo para mais esta conquista. A Ne e Ana, pelo carinho, amizade e ajuda.

## AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa, pela orientação segura e apoio necessários à execução deste trabalho, bem como pela maneira gentil e atenciosa com que me recebeu em seu laboratório.
- . A Prof<sup>a</sup>. Neli K. Honda, a quem devo minha iniciação à pesquisa científica.
- . A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fany Reicher, pelas valiosas sugestões e amizade.
- . Ao Prof. Philip A. J. Gorin, pelas análises de g.l.c.-m.s realizadas.
- . Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelas sugestões, colaboração e amizade recebidas.
- . Aos companheiros do Curso de Pós-Graduação, pelo carinho, estímulo e amizade.
- . A Prof<sup>a</sup> Ceila Maria Puia Ferreira da UFMS pela correção deste trabalho.
- . A Sr<sup>a</sup> Vera Lúcia Oliveira Pael, pelo trabalho datilográfico.
- . A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa Institucional de Capacitação Docente (PICD), pela oportunidade e suporte financeiro concedidos.
- . A tantos outros que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

## INDICE

RESUMO .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - A célula vegetal .....	4
1.1.1 - A parede celular - Estrutura e com posição química.....	4
1.1.2 - A parede celular e o desenvolvimen to do vegetal .....	8
1.1.3 - Extrativos - Taninos .....	13
1.2 - Hemiceluloses de angiospermas: composição e características estruturais .....	18
1.2.1 - Xilanas .....	18
1.2.1.1 - Xilanas de angiospermas monocotiledôneas .....	20
1.2.1.2 - Xilanas de angiospermas dicotiledôneas .....	24
1.2.2 - Glucomananas .....	30
1.3 - <u>Schizolobium parahybum</u> .....	32
1.4 - Objetivos .....	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
2.1 - Métodos gerais .....	34
2.1.1 - Reagentes .....	34
2.1.2 - Análises cromatográficas .....	34
2.1.3 - Hidrólises ácidas .....	36
2.1.4 - Redução a alditóis .....	37
2.1.5 - Acetilação de alditóis .....	37
2.1.6 - Eletroforese .....	37
2.1.7 - Espectrofotometria .....	37
2.2 - Métodos específicos .....	38
2.2.1 - Coleta e processamento do material	38
2.2.2 - Extração e determinação de taninos	39
2.2.3 - Extração e determinação dos princi pais componentes do caule do guapu ruvu .....	41

2.2.3.1 - Extração das hemiceluloses .....	41
2.2.4 - Fracionamento das hemiceluloses ..	42
2.2.5 - Determinação de ácidos urônicos ..	43
2.2.6 - Análise estrutural da fração GA <sub>8</sub> ..	46
2.2.6.1 - Acetilação da fração hemicelulósica GA <sub>8</sub> .....	46
2.2.6.2 - Metilação da fração GA <sub>8</sub> .	46
2.2.6.3 - Hidrólise, redução e acetilação do polissacarídeo metilado .....	47
2.2.6.4 - Oxidação com m-periodato de sódio .....	47
2.2.6.5 - Degradação tipo SMITH ..	49
2.2.6.6 - Determinação do grau de polimerização .....	49
2.2.6.7 - Análise do ácido aldobiurônico isolado por hidrólise ácida parcial da fração GA <sub>8</sub> .....	50
2.2.7 - Análise estrutural da fração GB <sub>8</sub> ..	51
2.2.7.1 - Filtração molecular.....	51
2.2.7.2 - Fracionamento em DEAE - Celulose .....	52
2.2.7.3 - Filtração em gel das frações PSN e PSX <sub>1</sub> .....	53
2.2.7.4 - Fracionamento da fração PSN.....	53
2.2.7.5 - Metilação das frações PSG, PSGM e PSX <sub>1</sub> .....	54
2.2.7.6 - Grau de polimerização das frações GB <sub>8</sub> e PSX <sub>1</sub> ..	54
2.2.7.7 - Oxidação com m-periodato de sódio .....	54
2.2.7.8 - Degradação tipo SMITH ..	55
2.2.8 - Isolamento de oligossacarídeos ácidos do caule de <u>S. parahybum</u> .....	55

3. RESULTADOS E DISCUSSAO .....	57
3.1 - Extração e determinação de taninos .....	57
3.2 - Extração e determinação dos principais co' constituintes de <i>S. parahybum</i> .....	59
3.3 - Extração das hemiceluloses .....	61
3.4 - Fracionamento das hemiceluloses .....	64
3.5 - Determinação de ácidos urônicos .....	68
3.6 - Análise da fração GA <sub>8</sub> .....	71
3.6.1 - Análise do polissacarídeo metilado .....	73
3.6.2 - Oxidação com periodato de sódio e degradação tipo SMITH .....	76
3.6.3 - Identificação do ácido aldobiurôni co .....	82
3.7 - Análise da fração GB <sub>8</sub> .....	84
3.7.1 - Fracionamento da hemicelulose GB <sub>8</sub> .....	84
3.7.2 - Filtração em gel e fracionamento ' do polissacarídeo PSN .....	89
3.7.3 - Análise das frações PSG, PSGM e PSX <sub>1</sub> .....	93
3.7.3.1 - Fração PSG .....	95
3.7.3.2 - Fração PSGM .....	96
3.7.3.3 - Fração PSX <sub>1</sub> .....	98
3.8 - Análise dos oligossacarídeos ácidos obti - dos por hidrólise parcial da madeira .....	104
4. CONCLUSOES .....	112
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	114

## INDICE DAS TABELAS

Tabela I	- Determinação quantitativa de taninos na casca do caule de <u>S. parahybum</u> .....	59
Tabela II	- Principais constituintes determinados no caule de <u>S. parahybum</u> .....	60
Tabela III	- Rendimento das frações hemicelulósicas do caule de guapuruvu .....	64
Tabela IV	- Composição em monossacarídeos das hemiceluloses isoladas do caule de <u>S. parahybum</u> .....	66
Tabela V	- Absorbâncias de xilose e ácido glucurônico determinadas a 480 nm e 525 nm .....	70
Tabela VI	- Absorbância a 525 nm de misturas de xilose e ácido glucurônico .....	70
Tabela VII	- Análise por metilação da fração hemicelulósica GA <sub>8</sub> .....	74
Tabela VIII	- Composição das frações obtidas pelo fracionamento em coluna de DEAE-Celulose da fração hemicelulósica GB <sub>8</sub> .....	88
Tabela IX	- Composição do hidrolisado obtido das frações PSG, PSGM e PSX <sub>1</sub> permetiladas.....	94

## INDICE DAS FIGURAS

Figura I	- Análise cromatográfica por g.l.c. da fração hemicelulósica GA <sub>8</sub> .....	72
Figura II	- Espectros de massa de: 1,5-di- <u>0</u> -acetil-2,3,4-tri- <u>0</u> -metil-xilitol e 1,4,5-tri- <u>0</u> -acetil-2,3-di- <u>0</u> -metil-xilitol.....	77
Figura III	- Espectros de massa de: 1,2,4,5-tetra- <u>0</u> -acetil-3- <u>0</u> -metil-xilitol e xilitol penta-acetato .....	78
Figura IV	- Espectros de massa de: 1,4,6-tri- <u>0</u> -acetil-2,3,6-tri- <u>0</u> -metil-hexitol e 1,3,4,5-tetra- <u>0</u> -metil-2,6-di- <u>0</u> -metil-hexitol .....	79
Figura V	- Determinação do consumo de período de sódio pela fração hemicelulósica GA <sub>8</sub> do caule de <u>S. parahybum</u> ..	80
Figura VI	- Análise cromatográfica (g.l.c.) do ácido aldobiurônico isolado da fração hemicelulósica GA <sub>8</sub> .....	83
Figura VII	- Filtração em Gel da fração GB <sub>8</sub> .....	85
Figura VIII	- Diagrama de eluição da fração GB <sub>8</sub> em DEAE-Celulose.....	87
Figura IX	- Filtração em Gel das frações polisacarídicas PSN e PSX <sub>1</sub> .....	90
Figura X	- Fracionamento do polissacarídeo PSN	91
Figura XI	- Análise cromatográfica por g.l.c. da fração PSN .....	92
Figura XII	- Cromatografia por g.l.c. da fração PSN, após fracionamento em coluna de Bio-Gel P-100 .....	92
Figura XIII	- Cromatogramas em g.l.c. da fração PSGM parcialmente metilada .....	99
Figura XIV	- Espectros de massa de: 1,5-di- <u>0</u> -acetil-2,3,4,6-tetra- <u>0</u> -metil-hexitol e 1,4,5-tri- <u>0</u> -acetil-2,3,6-tri- <u>0</u> -acetil-manitol.....	100
Figura XV	- Espectros de massa de: 1,4,5-tri- <u>0</u> -acetil-2,3,6-tri- <u>0</u> -me-	

	- til-glucitol e 1,4,5,6-tetra- <u>0</u> -acetil -2,3-di- <u>0</u> -metil-glucitol .....	101
Figura XVI	- Determinação do consumo de periodato de sódio das Frações GB <sub>8</sub> e PSX <sub>1</sub> .....	102
Figura XVII	- Estrutura proposta para a fração polissacarídica PSX <sub>1</sub> .....	104
Figura XVIII	- Análise por cromatografia em papel das frações ácidas isoladas do caule de <u>S. parahybum</u> .....	107
Figura XIX	- Análise cromatográfica das frações hemicelulósicas e frações ácidas isoladas do caule de <u>S. parahybum</u> ...	107
Figura XX	- Relação linear entre estrutura e mo- bilidade cromatográfica .....	108
Figura XXI	- Análise cromatográfica da fração áci- da Fa <sub>3</sub> .....	109
Figura XXII	- Análise cromatográfica por g.l.c. da fração ácida Fa <sub>3</sub> .....	110
Figura XXIII	- Análise cromatográfica por g.l.c. da fração ácida Fa <sub>2</sub> .....	111

## SIMBOLOS E ABREVIATURAS

DMSO	- Dimetil sulfóxido
NMNO	- N-óxido de N-metilmorfolina
$\overline{Dp_n}$	- Grau de polimerização
g.l.c.	- Cromatografia gás-líquido
CP	- Cromatografia em papel
CCD	- Cromatografia em camada delgada
c.f.	- Concentração final
AcO <sup>-</sup>	- Acetato
T	- Tempo de retenção relativo
R <sub>xil</sub>	- Movimento relativo a um padrão de <u>D</u> -xilose
EDTA	- Etilenodiaminotetracetato ácido
TFA	- Ácido trifluoroacético
d.i.	- Diâmetro interno
GA <sub>8</sub>	- Fração hemicelulósica, insolúvel em água, extraída do caule de <u>Schizolobium parahybum</u> com KOH a 8%
GA <sub>24</sub>	- Fração hemicelulósica, insolúvel em água, extraída do caule de <u>Schizolobium parahybum</u> com KOH a 24%, contendo tetraborato de sódio a 4%.
GB <sub>8</sub>	- Fração hemicelulósica, solúvel em água, extraída do caule de <u>Schizolobium parahybum</u> com KOH a 8%.
GB <sub>24</sub>	- Fração hemicelulósica, solúvel em água, extraída do caule de <u>Schizolobium parahybum</u> com KOH a 24%, contendo tetraborato de sódio a 4%
GC <sub>8</sub>	- Fração hemicelulósica, solúvel em água e que permanece em solução após a separação das hemiceluloses GA <sub>8</sub> e GB <sub>8</sub> .
GC <sub>24</sub>	- Fração hemicelulósica, solúvel em água e que permanece em solução após a remoção das hemiceluloses GA <sub>24</sub> e GB <sub>24</sub> .
GA <sub>8</sub> -A	- Fração hemicelulósica GA <sub>8</sub> , purificada por acetilação.
GA <sub>8</sub> -I	- Fração hemicelulósica GA <sub>8</sub> purificada por acetilação e metilada pelos procedimentos de HAWORTH e KHUN.

- PSN - Fração neutra obtida pelo fracionamento da hemicelulose GB<sub>8</sub> em DEAE-Celulose.
- PSX<sub>1</sub> - Fração polissacarídica obtida após fracionamento da hemicelulose GB<sub>8</sub> em DEAE-Celulose, através da eluição com NaCl 0,1M.
- PSG - Glucana isolada pelo fracionamento de hemicelulose GB<sub>8</sub>.
- PSGM - Glucomanana isolada pelo fracionamento da hemicelulose GB<sub>8</sub>.
- Fa<sub>1</sub> - Ácido aldotetraurônico, isolado do caule de S. parahybum.
- Fa<sub>2</sub> - Ácido aldotriurônico obtido por hidrólise ácida parcial do caule de S. parahybum.
- Fa<sub>3</sub> - Ácido aldobiurônico isolado por hidrólise ácida parcial do caule de S. parahybum.

## R E S U M O

Foram isoladas do caule de Schizolobium parahybum, através de extração alcalina, seis frações hemicelulósicas ( $GA_8$ ,  $GB_8$ ,  $GC_8$ ,  $GA_{24}$ ,  $GB_{24}$  e  $GC_{24}$ ) representam do 18,88% do caule do vegetal. A hemicelulose  $GA_8$ , cujo rendimento foi de 6,45%, é representada por uma xilana constituída por unidades de (1→4) xilopirranose, com  $\overline{Dpn} \approx 140$ . Algumas unidades de xilose podem apresentar pontos de ramificação na posição C-2, provavelmente por lignina, além das ramificações por ácidos urônicos, como ocorre nas demais hemiceluloses.

O ácido aldobiurônico isolado desta fração mostrou-se constituído por xilose e ácido 4-O-metilglucurônico, na proporção de 1,0:1,0.

A presença de glucose nesta fração foi atribuída a uma glucana não celulósica.

A fração hemicelulósica  $GB_8$ , cujo rendimento foi de 5,54%, foi fracionada em coluna contendo DEAE-Celulose e seis frações polissacarídicas foram obtidas. A fração neutra, denominada PSN, é composta por manose e glucose na proporção de 1,0:5,2. Ao ser fracionada em coluna contendo Bio-Gel P-30 e Bio-Gel P-100, esta fração apresentou dois picos que, quando analisados indicaram a presença de uma glucana (PSG) e uma glucomanana (PSGM).

Os dados encontrados através da metilação destes polissacarídeos, sugerem que a glucana é linear, constituída por aproximadamente 24 unidades de glucose interligadas por enlaces glicosídicos (1→4). Análises realizadas posteriormente por CORREA (55) indicaram que a glucana presente no caule de S. parahybum possui ligações do tipo  $\alpha$ , sugerindo a presença de amido.

As análises por g.l.c. e g.l.c-m.s., indicaram que a glucomanana (PSGM) apresenta estrutura linear e é constituída por unidades de glucose e manose, unidas por ligações (1→4).

Através da eluição com solução de NaCl, com concentrações crescentes (stepwise), foram obtidas três frações, representadas por xilanas e designadas

PSX<sub>1</sub>, PSX<sub>2</sub> e PSX<sub>3</sub>. As xilanas PSX<sub>4</sub> e PSX<sub>5</sub> foram obtidas por eluição da coluna de DEAE-Celulose com NaOH.

A fração PSX<sub>1</sub> representou 41,95% da hemicelulose GB<sub>8</sub> bruta. A partir das análises realizadas, esta xilana, com  $\overline{Dpn} = 82$ , apresenta-se constituída por unidades de (1 → 4)-xilopiranoses, com pelo menos dois pontos de ramificação por D-xilose, além de ramificações por outros grupos.

O conteúdo em substâncias tânicas na casca do caule de S. parahybum, determinado através de vários métodos, foi de 17,05%, podendo representar mais uma opção para a indústria tanífera.

"When the world has  $10^{12}$  tons of an organic, renewable substance, produced at the rate of  $10^{12}$  tons per year, don't you think you should know about it?"

K. C. B. WILKIE

## 1. INTRODUÇÃO

Hemiceluloses e celulose, carboidratos que aparecem em proporções comparáveis em todas as plantas terrestres superiores, constituem a maior fonte de matéria orgânica renovável da natureza. A quantidade de hemicelulose na natureza é estimada em  $6 \times 10^{11}$  toneladas métricas, sendo que cerca de  $3 \times 10^{10}$  toneladas métricas são fotossintetizadas anualmente.

Destes dois componentes, apenas a celulose é largamente utilizada. Em sua forma nativa é empregada na produção de têxteis e de papel, sendo seus derivados utilizados nas indústrias de adesivos, plásticos, filmes, explosivos, tecidos e outros.

Apesar de sua solubilidade e composição química variável, as hemiceluloses são pouco empregadas. Quando em uso como polímeros, estas modificam as propriedades da água, sendo usadas como estabilizante de espuma na fabricação de cerveja, nos processos de gelificação e flotação de minerais, em lubrificantes e como agentes emulsificantes, desempenhando funções reservadas às gomas e às mucilagens.

A hemicelulose isolada do gênero *Larix*, por exemplo, é utilizada como aditivo de impressão, processos fotográficos, cosméticos, produtos farmacêuticos e estabilizantes. Na forma de malha (cross-linked) é empregada em processos de purificação de lectinas.

Os compostos obtidos por hidrólise química ou enzimática destes polímeros constituem matéria prima para a obtenção de produtos químicos primários, como o furfural, xilitol, metanol, ácido levulínico, ácido fórmico, glicóis e ácidos glicônicos (180). A preparação de derivados hemicelulósicos poderá ampliar sua utilização e, estudos neste sentido se fazem necessários, tendo em vista a grande quantidade e diversidade destes polímeros na natureza.

Atualmente, considerável atenção tem sido dispensada ao aproveitamento de resíduos agrícolas e agro-industriais, principalmente por sua disponibilidade, quantidade e

características. Significantes quantidades destes resíduos são produzidas anualmente e só nos Estados Unidos perfazem um total de 500 milhões de toneladas/ano (base-seca). Na agricultura são produzidos em quantidades iguais ou superiores ao de grãos e na maioria das vezes, são queimados, deixados no solo ou levados à coleções de água, ocasionando danos ecológicos.

Estes resíduos contêm 40 a 70% de carboidratos (celulose, hemicelulose, amido), 15% de lignina e 3 a 25% de proteínas. A indústria açucareira, por exemplo, produz anualmente, 100 milhões de toneladas/ano de bagaço de cana, o qual contém cerca de 15% de lignina e 75% de celulose. A casca de café, obtida durante seu processamento industrial e normalmente queimada, é constituída de 50% de celulose e 38% de hemiceluloses. O "Spent sulphite liquor" produzido durante a obtenção de papel contém aproximadamente 43% de ácido lignosulfônico, 30% de carboidratos (monossacarídeos e hemiceluloses) além de ácidos urônicos, aldônicos e acético. A partir destes resíduos é possível obter-se furfural, óleos, vitaminas, álcoois, proteína unicelular (SCP), ração animal, combustíveis e muitos outros compostos (58).

Devido a estas características, o desenvolvimento de novas tecnologias e pesquisas sobre modelos de bio-conversão visando ao aproveitamento destes subprodutos, devem ser considerados.

Com a crise energética mundial, pesquisas sobre o desenvolvimento de combustíveis alternativos têm levado à investigação uma grande variedade de materiais, facilmente renováveis, como a biomassa.

O Brasil, pioneiro na utilização do etanol como combustível automotor, dá mais um passo no sentido de substituir outros combustíveis derivados do petróleo. A partir do bagaço da cana-de-açúcar, oriundo da produção de etanol, irá produzir também o álcool aditivado, o qual substitui o óleo diesel. Neste sentido, encontra-se em fase de implantação no Estado do Acre, o ALCOOLACRE, um complexo industrial, cuja finalidade é a produção de álcool e álcool aditivado para atender a região. Com a tecnologia desenvolvida pela ASSETEC - Assessoria Técnica e Comércio Ltda e IQT - Indústrias Químicas Taubaté, a indústria utilizará parte do bagaço produzido para obtenção de furfural, cujo rendimento varia de 10 a 12% em relação ao bagaço seco. Após digestão e separação do furfural, o resíduo do bagaço poderá ain

da, ser aproveitado para queima na fornalha. A partir do furfural, será obtido o derivado NTHF (nitrato de tetrahydro-furfurila). Este composto adicionado ao álcool na proporção de 7% dará origem ao álcool aditivado, o qual substitui o óleo diesel, com a vantagem de não exigir modificações nos motores.

Além desta, encontram-se atualmente, em implantação cinco fábricas de aditivos para o álcool. Uma que produzirá NTHF e as outras o DNTEG (nitrato de trietileno glicol). O uso do álcool aditivado deverá representar uma economia de 10.400.000 de barris/ano de petróleo (7).

Além da conversão química, a biomassa vegetal pode ser transformada através de processos biológicos. Um outro campo de grande desenvolvimento e perspectivas é o da conversão biológica da fitobiomassa, visando à produção de produtos químicos primários, biopolímeros, proteínas, combustíveis e outros.

Muitos são os microorganismos capazes de processar a biomassa produzindo biogás, proteínas, açúcares e álcoois. No caso específico de pentosanas, muitos microorganismos são capazes de utilizá-las, produzindo xilooligossacarídeos e D-xilose, por ação de enzimas conhecidas como xilanasas. Outros, fermentam a D-xilose produzindo álcool. Espécies do gênero Candida, Fusarium e Pachysolen, produzem etanol a partir de D-xilose e algumas espécies de Clostridium produzem butanol, a partir do mesmo açúcar (157, 180).

Estudos envolvendo a conversão de hemiceluloses de madeira, com vistas à produção de etanol e proteínas unicelular, estão sendo desenvolvidos por Fontaná e colaboradores (66).

Apesar destes estudos estarem ainda em fase inicial, a utilização da biomassa deve ser considerada com otimismo, já que grandes quantidades destes materiais estão disponíveis, sendo necessária a melhor utilização dos recursos humanos e tecnológicos já existentes.

É neste particular que a composição, quantificação e aspectos estruturais de carboidratos passam a ter importância, pois contribuem não só para a especulação a respeito da arquitetura molecular da parede vegetal, como também para sua aplicação industrial e econômica.

A análise química estrutural dos principais constituintes do vegetal fornece informação a respeito das espécies moleculares, sua distribuição relativa e a natureza das ligações entre elas, o que permite um entendimento não só das variações químicas, físicas e bioquímicas durante o processo de diferenciação celular, como também permite o estudo dos processos biológicos de microorganismos.

Da mesma forma que a estrutura de um polissacarídeo pode levar ao conhecimento do mecanismo da ação de uma enzima produzida por um microorganismo, estas podem ser utilizadas para a determinação da estrutura fina destes polímeros.

O conhecimento de determinadas características estruturais do polissacarídeo e do bioquimismo de microorganismos que os utilizam, acoplados a estudos genéticos (144), podem conduzir à otimização de processos biológicos, os quais poderão tornar a bioconversão um procedimento simples e pouco dispendioso, refletindo positivamente nos aspectos sócio-econômicos, tecnológicos e ecológicos do país.

## 1.1 - A CELULA VEGETAL

A morfologia e a constituição química das células variam entre os diferentes vegetais e tecidos do mesmo vegetal, sendo responsável pelas características e distintas funções dos tecidos que constituem. A maioria das células vegetais apresenta um envoltório rígido - a parede celular - que inclui os componentes que conferem à madeira sua rigidez e resistência.

### 1.1.1 - A parede celular - Estrutura e composição química.

Basicamente, a parede celular compreende duas camadas com composição química e estruturas distintas, as quais são formadas sequencialmente pelas células à medida que estas se desenvolvem. É composta principalmente por polissacarídeos, representados pela celulose, hemiceluloses, pecti

nas, gomas e mucilagens, por lignina, por proteína estrutural, por substâncias graxas, como cutina e suberina, por ceras, minerais e por outras substâncias.

A composição e proporção destes constituintes variam dentro do mesmo vegetal, com o estágio de desenvolvimento e com as várias partes morfológicas, conforme foi observado por NEVINS e outros (8, 121).

A parede celular primária é formada por células jovens não diferenciadas, e é constituída de pequenas quantidades de celulose e proteínas, além de substâncias pecticas e hemiceluloses. Estes polissacarídeos encontram-se associados de tal maneira que conferem à parede primária uma estrutura flexível, permitindo mudanças consideráveis na forma quando as células crescem. O material proteico da parede primária inclui proteínas com atividade enzimática, além de uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (8, 107, 164).

A parede secundária rígida e trabalhada, é sintetizada depois que a célula parou de crescer, sendo constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Sua ultra-estrutura e composição variam consideravelmente de célula para célula e pode conter distintas camadas com propriedades físicas e químicas diferentes.

Em algumas células, a parede celular secundária apresenta-se em três camadas: uma externa ( $S_1$ ) sob a parede celular primária; a intermediária ( $S_2$ ) mais longa; e uma camada interna ( $S_3$ ) às vezes ausente.

As camadas  $S_1$  e  $S_2$  apresentam maior quantidade de celulose que a camada  $S_3$ , que é rica em arabinoglucuroxilana (150).

Em cada camada, as microfibrilas de celulose possuem orientação paralela, mas nas diferentes camadas, as microfibrilas orientam-se de maneira oblíqua em relação às outras. Esta disposição orientada das cadeias moleculares de celulose contribuem consideravelmente para a resistência da parede celular.

Uma camada formada entre duas paredes celulares adjacentes, a lamela média, é composta basicamente por lignina, pectinas e pentosanas, em associação com pequenas quantidades de celulose (170).

Os principais Componentes Estruturais da parede celular são:

### Celulose

A celulose é um polissacarídeo relativamente hidrófilo, formada por uma cadeia linear de unidades de D-glucopiranoses unidas através de ligações glicosídicas  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4), resultando num polímero de elevado peso molecular (300.000 a 500.000). As cadeias de celulose na parede celular são mantidas juntas através de ligações de hidrogênio e arranjadas compactamente, de modo que suas fibras apresentam regiões nitidamente cristalinas (133, 170).

### Hemiceluloses

Muitas são as definições e controvérsias a respeito do real significado do termo hemicelulose, o qual foi proposto por SCHULZE, em 1891. Alguns autores consideram, com exceção da celulose, todos os demais polissacarídeos presentes na parede celular como hemiceluloses. As várias definições propostas para este grupo de polissacarídeos, bem como os problemas semânticos do termo, foram revisadas por WENZEL, em 1975 (177). Recentemente, WILKIE (180) abordou os problemas concernentes às definições de hemiceluloses. Segundo este autor, devido às variações em relação à compreensão e ao uso do termo hemicelulose, o mesmo é empregado por pessoas que conceituam diferentemente este grupo de polissacarídeos e, pessoas com praticamente a mesma conceituação, referem-se a eles com diferentes palavras. O autor referiu-se à hemicelulose, como um termo coletivo e geral, que engloba as várias populações de polissacarídeos presentes nas plantas superiores, exceto celulose, amido e frutanas.

Entretanto, vários autores consideram hemiceluloses os produtos que, após delignificação, podem ser extraídas com água, álcalis e solventes orgânicos como o DMSO, e que, dependendo do vegetal fornecem por hidrólise D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-glucose, D-galactose, ácido D-glucurônico ou seu 4-O-metil éter, ácido D-galacturônico e em menor proporção, L-ramnose, L-fucose e monossacarídeos neutros O-metilados. Em função da sua composição, são agrupa-

das como xilanas, mananas, galactanas, arabinogalactanas, gluco e galactomananas (133, 170).

Em madeiras duras (angiospermas) a hemicelulose que ocorre em maior proporção é uma xilana acídica, seguida de glucomanana e uma arabinogalactana. Nas gimnospermas, o principal componente hemicelulósico é uma galactoglucomanana e uma arabinoglucuronoxilana, em menor proporção. A distribuição e conteúdo de ácidos urônicos são diferentes nas xilanas de angiospermas e gimnospermas, onde ocorrem em maior proporção (155,170,171). O conteúdo em hemiceluloses é bastante variado, podendo atingir 35% do peso da madeira.

Os principais grupos acílicos associados às hemiceluloses correspondem aos grupos acetílicos, que se encontram ligados à xilose, ocupando as posições C-2, C-3 ou ambas. Em madeiras duras seu conteúdo varia de 3 a 5% em peso, e em madeiras moles, ocorre na proporção de apenas 1 a 2%, os quais normalmente estão associados a unidades de glucose e manose das glucomananas (41, 170).

### Substâncias Pécnicas

São polissacarídeos solúveis em água e soluções quelantes, onde o ácido D-galacturônico é o principal constituinte, podendo apresentar diferentes proporções de D-galactose, L-ramnose, D-xilose, L-fucose e pequenas quantidades de açúcares neutros metilados. Alguns ocorrem na natureza sob a forma de sais de cálcio (ácidos pectínicos).

Devido à grande capacidade das pectinas em formar géis, torna-se um produto de importância industrial.

Por serem substâncias extremamente hidrófilas e estarem presentes em grandes quantidades nos tecidos jovens (cerca de 35%) compondo a parede celular primária e a lamela média, alguns autores atribuem a este grupo de polissacarídeos a responsabilidade de hidratação da parede celular. As substâncias pécnicas também são encontradas em tecidos lenhosos, mas em pequena proporção (17, 112).

## Lignina

A lignina representa um dos grupos de substâncias mais importantes que compõem a parede celular e a lamela média de todas as plantas fibrosas. Suas principais funções são a de ligante e a de endurecedor, além de constituir uma barreira à degradação enzimática da parede celular.

Este componente difere em composição nas angiospermas e gimnospermas e, geralmente, o seu conteúdo aumenta com a idade do vegetal. Em gimnospermas, o conteúdo de lignina é maior, chegando a 35% (170).

Sua estrutura química até hoje não está completamente elucidada e a estrutura proposta por FREUDENBERG é considerada como modelo.

Trata-se de um composto aromático, constituído de unidades do tipo fenil-propano ( $C_6, C_3$ ) combinadas das mais variadas formas.

Aparentemente, a lignina forma uma rede tridimensional ao redor das fibras de celulose, tornando-as menos suscetíveis à degradação enzimática (155). Existem ligações entre os carboidratos e a lignina, porém a natureza destes complexos é ainda motivo de debates. Os tipos de ligações e interações prováveis entre estas macromoléculas foi recentemente abordado por REICHER (139).

### 1.1.2 - A parede celular e o desenvolvimento do vegetal.

A parede celular primária desempenha papel ativo no processo de alongação celular durante o crescimento do vegetal. Para compreender as variações e funções de parede celular vegetal, a qual constitui uma barreira física para as modificações morfológicas e crescimento, requeridas no processo de diferenciação celular, é necessário conhecer a estrutura de seus constituintes químicos, bem como suas interações.

Nestes anos, através do avanço científico e de técnicas que permitem cultivar células de coleóptiles, hipocótilos, caules e raízes jovens e tecido cambial

de árvore "in vitro", acopladas a métodos analíticos aperfeiçoados, levaram à obtenção de dados estruturais que permitiram a construção de modelos de organização molecular da parede celular primária. (8, 102).

Através destes modelos, é possível compreender as inter-relações entre os componentes da parede, suas modificações com o desenvolvimento do vegetal, bem como inferir suas funções fisiológicas e bioquímicas. Numa tentativa de elucidar o mecanismo de alongação da célula vegetal, estudos detalhados sobre a relação entre a estrutura dos componentes da parede celular, o desenvolvimento e função metabólica da mesma tem sido desenvolvidos. (50, 106, 107, 115, 124, 134).

BURKE e colaboradores (44) verificaram que a parede celular primária de monocotiledôneas, para a qual ainda não há um modelo estrutural detalhado disponível, difere consideravelmente das dicotiledôneas. Os constituintes hemicelulósicos de parede celular de monocotiledôneas incluem principalmente glucanas não celulósicas e arabinoxilanas. A parede celular de dicotiledôneas inclui as xiloglucanas, arabinogalactanas, substâncias pécticas, como principais constituintes hemicelulósicos.

A presença de grandes concentrações de glucose não celulósica em parede celular de tecidos jovens foi verificada por BISHOP (27) e RAY (136). O estudo destas glucanas encontradas na parede celular de células jovens tem recebido atenção, pois parece estar relacionado ao processo de alongação celular. Vários pesquisadores atribuíram à glucana não celulósica um papel fisiológico de interesse, pois foi observado um declínio acentuado em sua concentração quando o crescimento de coleóptiles é induzido por auxina (104, 109, 122). Outra observação realizada foi com respeito à razão entre as diferentes ligações glicosídicas que constituem a  $\beta$ -glucana, a qual é alterada com a maturação do tecido (179).

A  $\beta$ -glucana não celulósica isolada de parede celular primária de gramíneas apresenta-se como uma cadeia linear, onde as unidades de glucose encontram-se in-

terligadas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), semelhante ao isolado de endosperma de cereais (179).

As  $\beta$ -glucanas não endospérmicas foram isoladas de folhas de aveia. O polissacarídeo isolado, representando 3,3% da hemicelulose total, contém ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) na proporção de 1:1,65 (68). LABAVITCH e RAY (105), analisando os polissacarídeos que ocorrem em parede celular de coleóptiles de Avena sativa, isolaram uma  $\beta$ -glucana, na qual a proporção entre as ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3):  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) é de 1:2. NEVINS e colaboradores (123), utilizando glucanases de B. subtilis e Rhizopus, verificaram que as  $\beta$ -glucanas isoladas das cinco espécies de gramíneas analisadas, contém aproximadamente 30% de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3), ou seja, uma proporção de 1,0:3,3. Resultados semelhantes foram obtidos por KATO e colaboradores (99, 100), no estudo de polissacarídeos de parede celular de Hordeum distichum e de "bamboo-shoot". Foram isolados do endosperma da semente e de coleóptiles de Oriza sativa respectivamente (101, 153), uma  $\beta$ -glucana contendo 80% de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e uma  $\beta$ -glucana, contendo apenas 30% das mesmas ligações. Foi observado que a razão entre as ligações (1 $\rightarrow$ 3) : (1 $\rightarrow$ 4) em glucanas de folhas, caules e outros órgãos diminuem com a maturação dos tecidos. WILKIE e WOO (178) isolaram  $\beta$ -glucanas de folhas e de caules jovens e maduros de duas espécies de "bamboo". A proporção entre ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4):  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) em folhas jovens e maduras foi de 2,6:1,0 e 2,4:1,0, enquanto que no caule, a proporção observada foi de 15,6:1,0 e 19,5:1,0, respectivamente. Segundo os autores, a razão entre as ligações dependem das espécies, dos métodos de extração e da quantificação.

Recentemente, CARPITA (45) isolou da parede celular de coleóptiles de Zea mays uma fração contendo 60% de uma  $\beta$ -glucana, com 33% de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) e verificou que este polissacarídeo liga-se à celulose "in vitro".

A arabinoxilana encontrada em parede celular de monocotiledôneas é formada por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), com cadeias laterais simples de arabinofuranose, em maior proporção, ocupando as posições C-2, C-3 ou ambas das unidades de xilose, e em

menor proporção, unidades de ácido 4-O-metil glucurônico na posição C-2. Algumas unidades de xilose podem carregar mais de uma unidade de arabinose (44, 105). Glucuronoarabinoxilanas altamente ramificadas foram isoladas de parede celular de *en* dosperma de arroz (153) e de parede celular de coléoptiles de milho (45).

As xiloglucanas representam o principal polissacarídeo hemicelulósico isolado de parede celular primária de dicotiledôneas, estando presentes em pequena proporção na monocotiledôneas. Este tipo de polissacarídeo é encontrado na parede celular primária de plantas superiores e em sementes de leguminosas, onde é referido como "amilóide". As xiloglucanas de sementes e de outras origens apresentam características estruturais comuns (8, 112). Estudos realizados por BAUER e outros (23) em oligossacarídeos, obtidos por fragmentação enzimática da xiloglucana isolada de parede celular de células cultivadas de *Acer pseudoplatanus*, evidenciaram que estes polímeros são constituídos basicamente por uma cadeia principal de unidades de glucopirranose, interligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . As unidades de D-xilose ligam-se à cadeia principal através da posição C-6 da glucose. Oligossacarídeos contendo cadeias laterais de fucose e galactose [fucosil (1  $\rightarrow$  2) galactosil (1  $\rightarrow$  2) xilose] também foram isolados. Uma hemicelulose similar foi caracterizada por McNEIL (112). KATO e colaboradores (95) isolaram de hipocótilis de *P. aureus* uma xiloglucana altamente ramificada, constituída por glucose, xilose, galactose e fucose na proporção de 10,0: 9,0:2,5:1,0. A xiloglucana isolada de hipocótilis de *G. max* e *V. sesquipedalis* apresentou estrutura semelhante, com pequenas variações nas proporções relativas destes açúcares. A estrutura proposta para estes polissacarídeos foi a seguinte (97):

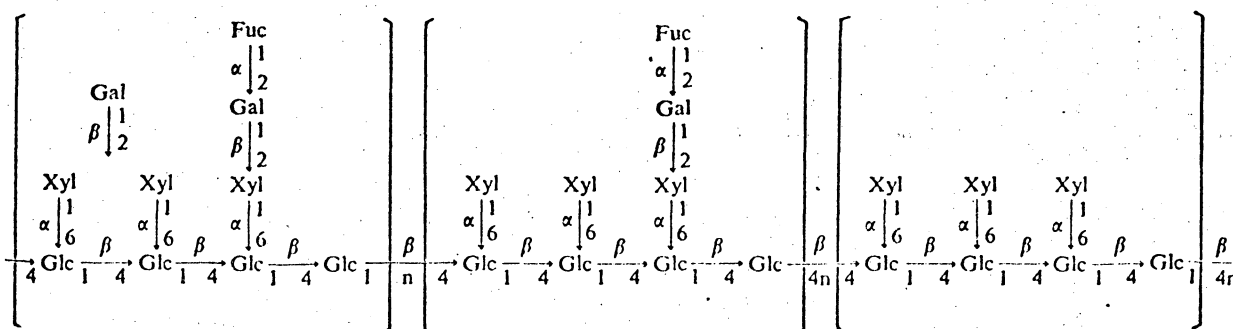


FIG. 5. Proposed Structure of MBXG.

Foram isoladas da parede celular de monocotiledôneas (98, 100, 101, 105, 153), xiloglucanas apresentando cadeia principal constituída por unidades de  $\beta(1 \rightarrow 4)$ -D-glucose, onde 30-40% destas unidades encontram-se substituídas na posição C-6 por unidades de D-xilose.

Após serem isoladas na parede celular e separadas dos outros polissacarídeos, as xiloglucanas de monocotiledôneas são insolúveis em água e solúveis em álcalis e as de dicotiledôneas são solúveis em ambos solventes. Este comportamento está, possivelmente, relacionado ao maior grau de substituição na xiloglucana de dicotiledôneas.

Foi sugerido que estas xiloglucanas ligam-se às microfibrilas de celulose e à outras moléculas de xiloglucanas por fortes pontes de hidrogênio intermoleculares e aos polissacarídeos pécticos através de ligações covalentes (23, 102, 112, 141, 164).

Recentemente, CHAMBAT e colaboradores (47) verificaram os tipos de interações que ocorrem entre os polissacarídeos que constituem a parede celular primária de células cultivadas de Rosa glauca. Utilizando dois tipos de fracionamento sequencial, um incluindo tratamento com agentes quelantes,  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{NaOH}$  e o outro, a solubilização completa da parede celular com uma mistura de  $\text{NMNO-DMSO}$ , eles delimitaram dois blocos de polissacarídeos, os quais são mantidos juntos na parede celular por interações que não envolvem ligações covalentes. O bloco não celulósico é constituído de polissacarídeos associados por ligações álcali-lábeis (ligações éster ou pontes de hidrogênio) e por glicoproteínas da parede celular. A partir da análise dos resíduos celulósicos obtidos nos distintos procedimentos, eles identificaram que três tipos de polissacarídeos encontram-se firmemente associados à celulose: uma galactouronana acídica, uma arabinogalactana e uma xiloglucana, onde esta xiloglucana liga-se à celulose por fortes pontes de hidrogênio e os polissacarídeos pécticos ligam-se à xiloglucana por enlaces glicosídicos, os quais não envolvem formas furanosídicas.

Posteriormente estes autores demonstraram a heterogeneidade das xiloglucanas em parede celular primária do

mesmo vegetal e determinaram, por  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. a configuração das ligações glicosídicas na cadeia principal e substituintes, (94) confirmando o que foi encontrado por KATO (97).

Como a maior parte da glicoproteína da parede celular está localizada no bloco não celulósico (173) os autores sugerem que é pouco provável que estas estejam unidas às microfibrilas de celulose por ligações covalentes.

### 1.1.3 - Extrativos

Os taninos são encontrados em vacúolos de células especiais do parênquima ou córtex de um grande número de plantas e são considerados como produtos de excreção do vegetal.

#### Taninos

O termo tanino foi introduzido por SEQUIN em 1796, para designar substâncias com a capacidade de transformar a pele em couro. Os taninos vegetais são misturas complexas de compostos fenólicos, variando de simples fenóis, como o ácido gálico e a catequina com pouca ou nenhuma atividade tanante, a tipos macromoleculares complexos. Tem sido sugerido que a ação tanante dos extratos vegetais se deve à presença de componentes com pesos moleculares variando de 500 a 3000 (82, 86, 162). Estas substâncias, contendo grande número de hidroxilas fenólicas formam uma malha com as proteínas e outros polímeros da pele, inibindo a ação de enzimas, tornando a pele imputrescível. Muitos pesquisadores acreditam que este processo envolve o empacotamento da região amorfa da estrutura fibrilar do colágeno com os taninos. Inicialmente, os grupos hidroxilas presentes nos taninos reagem com os "sítios ativos" expostos na região amorfa, ou seja a região contendo alta concentração de aminoácidos polares, com longas cadeias laterais. Posteriormente, outras moléculas de taninos são ligadas à molécula previamente fixada, até que todos os espaços entre as fibras do colágeno sejam preenchidos.

Polifenóis com peso molecular entre 500 e 3000 atuam como taninos, pois podem penetrar nas regiões interfibrilares das fibras do colágeno e ligar as cadeias em mais de um ponto.

A região cristalina do colágeno não requer taninos, pois a organização de suas cadeias moleculares oferecem proteção à penetração de água e de microorganismos. Estudos realizados sugeriram que os sítios ativos são as ligações peptídicas que não estejam internamente ligadas, capazes de formar pontes de hidrogênio com os grupos fenólicos dos taninos vegetais. É provável que outros grupos, como resíduos amido e amino, presentes na cadeia lateral de aminoácidos polares (82) podem fixar taninos, porém, em escala limitada.

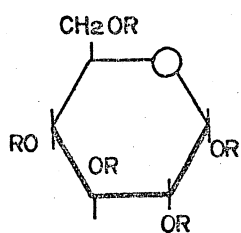
Segundo SWAIN (162), os taninos ligam-se às proteínas e a outros polímeros, como a celulose e pectinas, por três tipos de ligações:

01. pontes de hidrogênio entre o grupo hidroxila do tanino a grupos amino e amido das proteínas, ou grupos hidroxílicos e carboxílicos de outros polímeros.
02. ligações iônicas entre grupos aniônicos do tanino e catiônicos da proteína, ou, no caso de polímeros, através de metais como o cálcio.
03. ligações covalentes, a partir da interação de grupos quinona ou semiquinona do tanino e grupos apropriados das proteínas e outros polímeros. Este tipo de ligação é provavelmente o de maior importância no processo de curtimento, já que a estabilidade das duas primeiras é afetada por vários fatores.

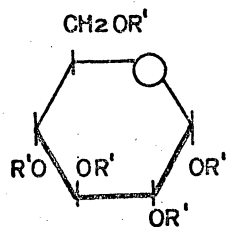
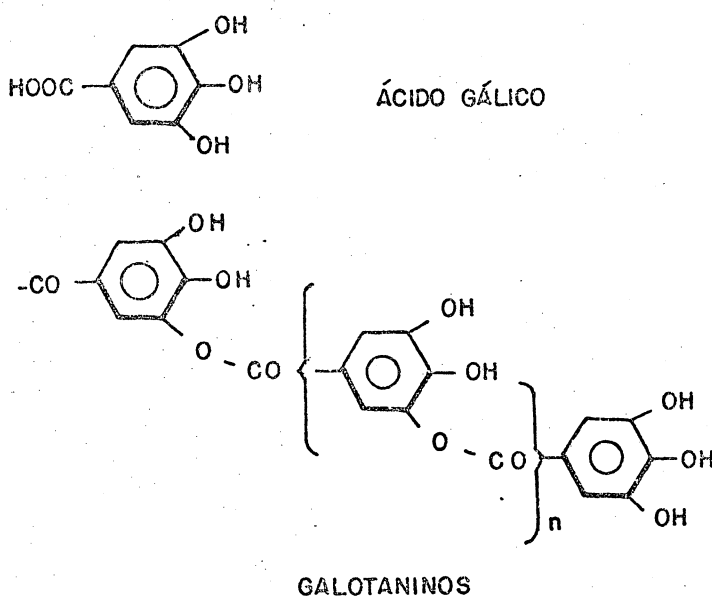
Além da aplicação em curtumes, os taninos são utilizados na manufatura de tinta para escrita, plásticos, medicamentos (devido as suas propriedades adstringentes), na prevenção de corrosão de metais, como mordente e também para estudos relacionados à biogênese de lignina.

Em 1920, PERKIN & EVEREST e FREUDENBERG (86) classificaram os taninos em dois grupos: taninos hidrolisáveis ou pirogálicos e taninos não hidrolisáveis, catéquicos ou condensados.

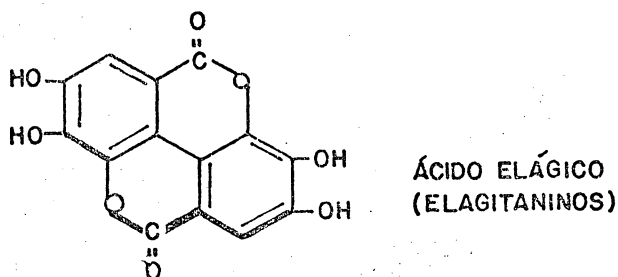
Os taninos hidrolisáveis são ésteres facilmente hidrolisáveis por ácidos, bases ou enzimas. São caracterizados por possuírem um açúcar, como a glucose, ou outro álcool polihídrico no qual os grupos hidroxílicos encontram-se esterificados por ácido gálico (galotaninos), ácido elágico (elagitaninos) ou, ainda por outros estruturalmente relacionados ao ácido gálico. A estrutura geral destes taninos pode ser assim representada:



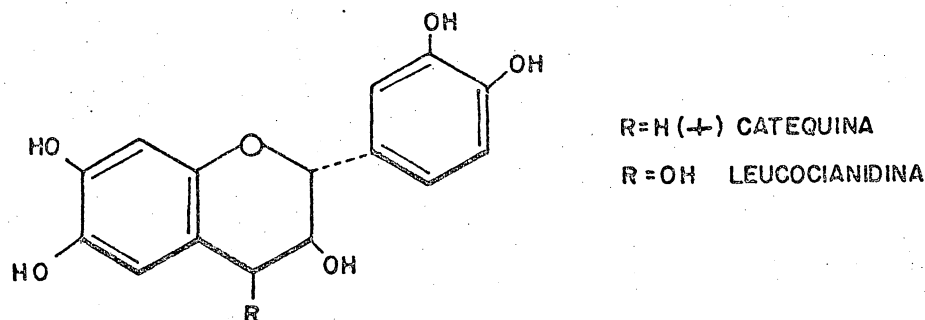
R =



R' =



Os taninos condensados ou não hidrolisáveis contêm apenas um núcleo fenólico, e que em meio ácido, tendem a se polimerizar, formando um produto amorfo insolúvel, conhecido como flobafenos. Estes taninos são, possivelmente, formados pela condensação de duas ou mais moléculas de flavan-3-óis, como a catequina ou flavan-3,4-dióis, como as leucocianidinas, ou mistura dos dois. A estrutura geral pode ser representada como segue:



Estes compostos encontram-se largamente distribuídos em folhas, caules, frutos e raízes dos vegetais, sendo que o tipo e o conteúdo variam de planta para planta, entre as suas diversas partes e com a idade do vegetal.

Por exemplo, em espécies do gênero *Schinopsis*, as folhas contêm apenas taninos hidrolisáveis. A parte central da madeira contêm apenas taninos condensados enquanto que a parte externa contêm os dois tipos. As folhas de *R. coriarium* apresentam 27% de taninos, a casca do caule 6% e a madeira apenas 0,4% (162).

KURSHAKOVA (104) verificou que o melhor rendimento em taninos de raízes de *Polygonum coriarium* foi obtido no outono do terceiro ano de crescimento.

Os taninos hidrolisáveis são encontrados principalmente em vagens das leguminosas *Caesalpinia brevifolia* e *C. coriaria* (44%), casca do caule das fagáceas dos gêneros *Quercus* e *Castanea* (13 a 25%), frutos de *Terminalia chebula* (34%) e em folhas das anacardeáceas *Rhus coriaria*, *R. typhina* e *R. semialata* (25%). O maior conteúdo em taninos é obtido das galhas de folhas de *R. semialata* e galhas de ramos de *Q. infectoria*, chegando a 64%.

Os taninos condensados ocorrem em grande proporção na casca e caule de espécies de *Eucalyptus* (40-50%),

casca das leguminosas Acacia mollissima (35 a 40%), Acacia catechu (15%) e Robinia pseudacacia (7%), anacardeáceas Schinopsis lorentzii e S. balansae (16 a 25%) e em Rhizophora mangle e R. candelaria (20 - 30%).

Alguns gêneros das famílias Fagaceae e Pinaceae contêm de 5 a 20% de taninos (82, 162).

No Brasil, a principal fonte tanífera industrial corresponde a Acacia decurrens, cuja casca encerra de 30 a 40% de taninos, seguida de espécies dos gêneros Piptadenia, Stryphonodendron e Schinus. O nordeste utiliza o mangue (R. mangle), um vegetal bastante difundido na região, para suprir seu mercado (142).

A maior concentração de taninos no vegetal parece ocorrer próximo à morte celular. PARTASARATHI e colaboradores (130) determinaram que o nível de composto fenólicos em folhas de sândalo infectadas é maior que em folhas saudáveis.

Devido a sua capacidade de se ligar às proteínas, os taninos inibem muitos sistemas enzimáticos e é provável que aumentem a resistência do vegetal a ataques por fungos e outros patógenos (162).

## 1.2 - HEMICELULOSES DE ANGIOSPERMAS: COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS.

A composição de hemiceluloses é grandemente influenciada pela parte do vegetal utilizado e seu estágio de desenvolvimento, modo de extração, fracionamento e pelo próprio critério de pureza utilizado durante a análise. Segundo ASPINALL, citado por REID & WILKIE (141), a composição de hemiceluloses é afetada por três aspectos: a polimolecularidade, polidiversidade e polidispersidade.

A polimolecularidade representa as proporções e as variações de pesos moleculares em moléculas estruturalmente similares; a polidiversidade diz respeito a tipos moleculares distintos e a polidispersidade envolve moléculas estruturalmente similares, porém, com diferentes proporções e distribuições das unidades de açúcar, bem como variação na frequência dos pontos de ramificação. A polidiversidade pode ser evitada através de um fracionamento adequado do material hemicelulósico, conduzindo, desta forma, ao isolamento de hemicelulose pura, com polimolecularidade e polidispersidade limitadas.

Muitos são os autores que chamam a atenção para tais fatores, os quais podem explicar diferentes resultados obtidos na análise do mesmo material hemicelulósico por diferentes pesquisadores.

As hemiceluloses são classificadas segundo os tipos de unidades de açúcar que contêm. ASPINALL (16) propôs uma classificação geral, na qual as hemiceluloses são divididas em três grupos: xilanas, mananas e/ou glucomananas e galactanas.

Como a maioria das hemiceluloses são constituídas por dois ou mais açúcares, a designação anterior é utilizada para os polímeros contendo como componente principal a xilose, manose ou galactose.

### 1.2.1 - Xilanas

O termo xilana é utilizado para designar os polímeros constituídos principalmente por unidades de D-xilose. Em função da presença de outros monossaca-

rídeos, podem ser divididas em: arabinoxilanas (L-arabino D-xilanas); glucuronoxilanas (4-O-metil-D-glucuronoxilanas) e arabinoglucuronoxilanas (L-arabino-4-O-metil-D-glucuronoxilanas).

As xilanas (glucuronoxilanas) representam o principal constituinte hemicelulósico de angiospermas, ocorrendo também nas gimnospermas em menor proporção, na forma de arabino (4-O-metilglucurono)xilanas (16, 170).

A estrutura básica das xilanas isoladas de diversas partes de diferentes vegetais é normalmente a mesma, onde a cadeia principal do polímero é formada por unidades de D-xilopiranoose, interligadas por enlaces glicosídicos do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , conforme apresentadas por HAWORTH e colaboradores (84), um dos pioneiros no estudo sobre a estrutura de xilanas.

Em 1934, HAWORTH e outros (85) isolaram uma xilana da Stipa tenacissima L., contendo 6% de unidades de arabinofuranose, ligados à xilana como cadeias laterais simples a cada 18 unidades de D-xilose.

O'DWYER (126, 127) verificou, em 1937, que a hemicelulose A de caule de carvalho, continha xilose e um ácido monometilhexurônico, na proporção de seis unidades de xilose para um de ácido urônico. Resultados semelhantes foram obtidos também para a fração denominada hemicelulose B da mesma planta (128). Em 1940, ANDERSON e colaboradores (10) analisaram hemiceluloses de caule de várias madeiras duras, verificando que as mesmas representam misturas de polímeros, com vários pesos moleculares, onde a proporção de xilose para ácido urônico varia de 10:1 a 19:1. Analisando hemiceluloses de Populus macdougalii (cotton-wood) (11), foi verificado que a mesma contém unidades de ácido metoxiurônico ligadas à cadeia principal, de cada sete a nove unidades de xilose e sugerido que as hemiceluloses são originadas por descarboxilação de amido e dextrinas, estando unidas a alguma substância na parede celular, possivelmente, através de seus grupamentos carboxílicos.

A partir destes trabalhos iniciais e das diferenças observadas entre as hemiceluloses, muitos estudos foram realizados e as principais características estruturais entre as várias origens de hemiceluloses foram propostas.

## 1.2.1.1 - Xilanas de angiospermas monocotiledôneas

Xilanas de gramíneas são caracterizadas pela presença de unidades de L-arabinofuranose ligadas à xilana como cadeia lateral simples, normalmente através de ligação  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ , além de unidades de ácido glucurônico e seu 4-O-metil éter, em pequenas proporções, por ligações glicosídicas tipo  $\alpha(1 \rightarrow 2)$  (16, 179).

Este tipo de xilana também é encontrada em gimnospermas, porém em pequena proporção. Considera-se que estes polissacarídeos não estejam acetilados "in vivo", o que poderia ser decorrente dos métodos de extração utilizados.

ADAMS ( 2 ), analisando hemiceluloses de palha de trigo, verificou que a xilana isolada era formada por uma cadeia principal contendo trinta e duas unidades de D-xilose, cinco de L-arabinose e três de ácido glucurônico, como ramificações simples, unidades à cadeia principal por ligação  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ . Estrutura similar foi observada para a xilana de folha de trigo ( 3 ).

ASPINALL ( 15 ), isolou do mesmo material, uma xilana contendo 3% de ácido glucurônico ligado a C-3 das unidades de D-xilose da cadeia principal, porém isento de L-arabinose.

BISHOP (24, 26 ), analisando o mesmo vegetal, isolou por hidrólise ácida o oligossacarídeo identificado como 3-O-xilopiranosil- $\alpha$ -D-glucuronopiranosose, indicando que as unidades do açúcar ácido encontram-se ligadas ao C-3 de unidades de xilose, conforme havia sido sugerido por ASPINALL ( 15 ).

Analisando hemiceluloses obtidas da hemicelulose de palha de trigo, linho, centeio, aveia e cevada, BISHOP ( 25 ) verificou que as mesmas eram constituídas por unidades de D-xilose, L-arabinose e ácido D-glucurônico, com grau de polimerização ( $D\bar{p}n$ ) variando de 55 a 185. A partir das hemiceluloses de trigo, cevada e centeio, ele obteve xilanas cristalinas, representando 30, 24 e 85% respectivamente, da fração hemicelulósica.

WHISTLER e HOUGH ( 181 ) isolaram da hemicelulose B de espigas de milho os ácidos 2-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-D-xilose e o 4-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosilu-

rônico)-D-xilose. Um ano depois, utilizando o mesmo material hemicelulósico, foram obtidas treze frações a partir da precipitação fracionada com acetona e sete frações pelo fracionamento com n-pentano da hemicelulose B acetilada. O conteúdo em ácidos urônicos e a relação D-xilose: L-arabinose obtidos para cada "sub-fração" foram diferentes, evidenciando a polidiversidade e a polimolecularidade da hemicelulose. O ácido aldobiurônico isolado foi o ácido 2-O-(4-O-metil- $\alpha$  D-glucuronopiranosil)-D-xilose. (182).

FALCONER & ADAMS (65), em 1956, isolaram oligossacarídeos da hemicelulose B de casca de aveia contendo ácido glucurônico e o ácido 4-O-metilglucurônico, os quais unem-se à cadeia principal de xilose por ligação do tipo  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  2).

REID & WILKIE (140) isolaram de folhas do mesmo vegetal um polissacarídeo com D-galactose, L-arabinose e D-xilose na proporção de 2,8:10,4:18,5, contendo 3 a 4% de ácido urônico (ácido glucurônico e 4-O-metilglucurônico). Isolaram, ainda, um ácido aldotriurônico, constituído por ácido glucurônico, xilose e galactose, na proporção de 1:1:1, com a galactose presente na ponta redutora da molécula.

Foi isolada de folhas de Berberis vulgaris uma  $\beta$ -D-xilana neutra, com grau de polimerização igual a 48 e uma  $\alpha$ -glucana com  $D_{p\bar{n}}$  de 135, além de cinco frações de xiloglucanas ( $D_{p\bar{n}} \approx 129 \triangleq 242$ ), combinadas com proteína. A  $\alpha$ -D-glucana possui ligações (1  $\rightarrow$  4) e algumas unidades apresentam ramificações em C-3 e C-6, nas proporções de 1:6 e 1:29 unidades de glucose, respectivamente (89).

DUTTON & KABIR (64) isolaram arabinoxilanas de caule e folhas de milho, com estruturas similares, diferindo no comprimento médio da cadeia. O oligossacarídeo ácido isolado foi o 2-O-( $\alpha$ -D-glucuronosil)-D-xilose, com pequenas quantidades do derivado do ácido 4-O-metilglucurônico. As frações hemicelulósicas apresentavam-se contaminadas com uma glucana, e tentativas para separá-la não tiveram sucesso.

Na mesma época, CHEETHAM (48) analisando hemiceluloses isoladas de folhas de caule de Cynodon plectostachyus, encontrou D-xilose, L-arabinose, e D-glu

cose na proporção molar de 17:2,2:1. O polímero contém aproximadamente quarenta e sete unidades de D-xilose, e como cadeia lateral, quatro unidades de L-arabinose e duas de ácido 4-O-metilglucurônico.

BUCHALA ( 43 ), em 1973, isolou uma arabinogalacto (4-O-metilglucurônio)xilana de folhas Hordeum vulgare. A xilana apresentou uma cadeia lateral composta de galactopiranosil (1 → 4)-D-xilopiranosil(1 → 2) L-arabinofuranose, ou cadeias terminais simples de L-arabinofuranose ligadas ao C-3 das unidades de D-xilose, além de ácido 4-O-glucurônico, ligado à posição C-2.

MORRISON ( 116 ), analisando hemiceluloses de Lolium perene, verificou que a relação xilose: arabinose é aumentada com a maturidade do vegetal.

WOOLARD e RATHBONE ( 187 ) isolaram uma glucuronoarabinoxilana da casca de grão de sorgo, correspondendo a uma das treze subfrações obtidas da hemicelulose B, pelo fracionamento em DEAE-celulose. O polissacarídeo contém a cadeia principal constituída de unidades de  $\beta$ -D-(1 → 4)xilopiranosose, com ácido glucurônico e 4-O-metilglucurônico ligadas ao C-2 da D-xilose. As unidades terminais não redutoras de L-arabinofuranose encontram-se ligadas ao C-2 e em alguns casos ao C-2 e C-3 das unidades de D-xilose, provavelmente por ligação do tipo  $\alpha$ . Em 1977, ao analisarem três frações da hemicelulose B do mesmo material, as mesmas características acima citadas foram observadas. Estas frações diferem entre si no grau de ramificação e no conteúdo de ácidos urônicos ( 188 ). Na mesma época, utilizando o mesmo vegetal, foram extraídas com DMSO, hemiceluloses contendo de 0,6 a 2,2% de grupos O-acetílicos ( 189 ).

Recentemente, as hemiceluloses de gramináceas foram revisadas por WILKIE ( 184 ).

Em 1981, SHARMA e MUKHERJEE ( 152 ) isolaram de fibras de folhas de Sansevieria trifasciata (fam. Liliaceae) um polissacarídeo contendo D-xilose e ácido 4-O-metilglucurônico. Os oligossacarídeos ácidos, obtidos após hidrólise ácida foram caracterizados como os ácidos 2-O-(4-O-metil-  $\alpha$  -D-glucuronopiranosil)-D-xilose e O-(4-O-metil-  $\alpha$  -D-glucuronopiranosil)-(1 → 2)-O-  $\beta$  - D-

xilopiranosil-(1 → 4)-D-xilose. Estrutura similar foi proposta para a hemicelulose isolada de fibras de fo lhas de Ananas comosus ( 151).

Em 1983, WATANABE e outros (176 ) iso- laram uma arabinoxilana de casca de arroz com KOH 4%. O polissacarídeo contém apenas 1,5% de ácidos urônicos e a proporção xilose: arabinose é de 19:1. A análise dos produ- tos obtidos por fragmentação com xilanase de Streptomices mostrou que o polímero é linear e que as unidades de L-ara binofuranose unem-se à xilose através de ligação  $\alpha$  (1 → 3), diferente, portanto, da arabinoxilana isolada da pare- de celular do endosperma deste vegetal, a qual é altamente ramificado (153).

Recentemente, SHIBUYA e IWASAKI (154) isolaram e fracionaram com sulfato de amônio, a hemicelulo se extraída do farelo de arroz. Foi verificado que os po- lissacarídeos que precipitaram com sulfato de amônio cor- respondiam aos polímeros que continham glucose. As frações obtidas por fracionamento em coluna de DEAE-Sephadex cor- respondiam a uma  $\beta$  (1 → 3): $\beta$  (1 → 4) glucana e uma xilo glucana. A análise da xiloglucana evidenciou que esta é constituída por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$  (1 → 4)-D-glucose onde cerca de 40% dos monômeros possu- em ramificação em C-6, por unidades de xilose ou galactose. A fração polissacarídica solúvel em sulfato de amônio foi ' fracionada em coluna de DEAE-celulose. A análise das fra- ções obtidas mostrou a presença de arabinoxilanas neutras e acídicas. Os resultados da análise do polissacarídeo ácido metilado, mostraram que o mesmo apresenta uma xilana como ca- deia principal, onde 74-79% das unidades de D-xilose apre- sentam ramificações. Parte das unidades de D-xilose apre- sentam ramificações nas posições C-2 e C-3, simultaneamen- te, por unidades terminais não redutoras de xilose, ara- binose ou galactose. O ácido glucurônico liga-se à cadeia principal da xilana através da posição C-2 dos monômeros ' de D-xilose.

## 1.2.1.2 - Xilanas de angiospermas dicotiledôneas

Xilanas de angiospermas, as O-acetil-(4-O-metil-glucuro)xilanas contêm em sua estrutura unidades de ácido 4-O-metilglucurônico ligadas à cadeia principal da xilana por ligações  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  2), cuja distribuição é provavelmente ao acaso, na proporção de um radical de ácido urônico para 10 unidades de xilose. Foi sugerido que os ácidos urônicos encontram-se parcialmente esterificados a lignina (75, 83, 151, 170).

"In vivo", estas xilanas encontram-se parcialmente acetiladas, com os grupos O-acetil ligados às unidades de D-xilose nas posições C-2, C-3 ou em ambas. Estes grupos ocorrem em grande quantidade e previnem o alinhamento das cadeias moleculares, impedindo agregação molecular e devem influenciar a associação destes polímeros com outros polissacarídeos da parede celular.

Um dos trabalhos pioneiros que evidenciaram as características estruturais destes polímeros foi o realizado por JONES e outros (91), em 1952, que analisando os oligossacarídeos obtidos por hidrólise parcial do extrato de caule de Populus tremuloides, isolaram o ácido 2-O-(4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-D-xilopirranose.

Em 1954, ASPINALL, HIRST e MAHOMED (14) isolaram uma xilana por extração alcalina do caule de Fagus sylvatica, sendo um dos primeiros trabalhos realizados para determinar as características estruturais de glucuronoxilanas. As análises realizadas evidenciaram que a xilana contém uma unidade de ácido urônico a cada 10 unidades de D-xilose. A hidrólise do polissacarídeo metilado forneceu o ácido 3-O-metil-2-O-(2,3,4-tri-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico)-D-xilose; 3-O-metil-D-xilose; 2,3-di-O-metil-D-xilose e 2,3,4-tri-O-metil-D-xilose, na proporção molar de 7:7:60:1. Os resultados indicaram que a xilana é linear, constituída de unidades de D-xilose, interligadas por enlaces glicosídicos do tipo  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4), onde algumas unidades de xilose possuem C-2 substituído por unidades de ácido 4-O-metil-glucurônico.

Em 1957, ADAMS (4) isolou de outra espécie de faia (Fagus grandifolia) o mesmo ácido aldobiurônico. A partir dos resultados obtidos por metilação e

oxidação do polissacarídeo com m-periodato de sódio, sugeriu que o polímero contém, aproximadamente, quarenta e cinco unidades de D-xilose, com ramificação em C-2 e que as unidades do ácido 4-O-metilglucurônico (15,5%) estão ligadas à cadeia principal, a cada oito unidades de D-xilose.

Na mesma época, JONES e colaboradores ( 92 ) obtiveram por extração alcalina de caule de álamo ( Populus tremuloides ) uma hemicelulose correspondendo a 19% do material inicial, constituída, predominantemente, por unidades de xilose e pequenas quantidades de hexoses, arabinose e ramnose. Os produtos obtidos por hidrólise do polissacarídeo metilado foram: 2,3,5-tri-O-metil-L-arabinofuranose; 2,3,4-tri-O-metil-D-xilopirranose; 2,3-di-O-metil-D-xilopirranose; 2-O-metil-D-xilopirranose; 3-O-metil-D-xilopirranose e componentes acídicos. Em função destes resultados, foi proposto que esta xilana encontra-se substituída nas posições C-2 e C-3 das unidades de D-xilose por grupos terminais de L-arabinose e cadeias laterais terminadas por unidades de ácido urônico. Foi sugerido ainda, que as cadeias laterais acídicas podem conter glucose e xilose, pois foram obtidas também 2,3,6-tri-O-metil-glucose e 3,4-di-O-metil-D-xilose.

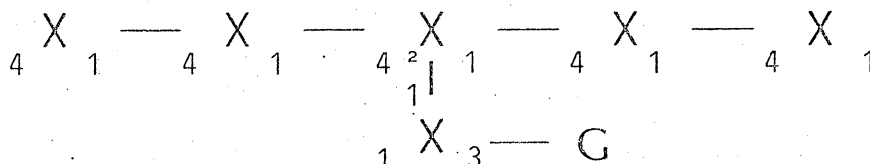
Uma análise mais detalhada desta hemicelulose, realizada em 1961 ( 93 ), mostrou que a xilana é linear, constituída por unidades de  $\beta$ -D-xilopirranose unidas através de ligação (1 $\rightarrow$ 4) com grau de polimerização de 212. Em média, cerca de nove unidades de xilose carregam uma unidade do ácido 4-O-metilglucurônico, unido ao C-2 da xilose por ligação  $\alpha$ . A presença de arabinose e de hexoses encontradas anteriormente, foram consideradas contaminantes, pois foram eliminadas pela complexação da fração hemicelulósica com cobre.

Estrutura semelhante foi proposta para a principal fração hemicelulósica de Acer saccharum (156).

NEUBAUER e PURVES (118) extraíram com água quente, a partir do pó de madeira de Acer saccharum previamente tratado com amônia, uma hemicelulose que representava apenas 1,9% do pó total.

A hemicelulose foi fracionada com etanol e três frações foram obtidas. Após purificação das mesmas, verificou-se que as frações apresentavam a mesma com-

posição em rotação óptica, diferindo apenas no rendimento das frações isoladas, a proporção de unidades de ácido urônico para D-xilose foi de 1:6. Os resultados obtidos por metilação sugeriram que o polímero apresenta estrutura ramificada e que o ácido urônico presente corresponde ao 3-O-metil-glucopiranosilurônico, conforme o seguinte modelo:



Os polissacarídeos extraídos da raiz do mesmo vegetal consistem numa cadeia de unidade de glucose e xilose, unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), com ramificação no carbono C-2 de certas unidades de D-xilose, por xilose ou ácido 4-O-metilglucurônico diferindo no grau de ramificação e relação entre xilose: glucose e ácido urônico (20).

GLAUDEMANS & TIMELL (75) estudando a hemicelulose extraída do caule de Betula papyrifera, concluíram que a xilana isolada era linear, com um grau de polimerização variando de 110 a 190 unidades de xilose, com unidades de ácido 4-O-metilglucurônico ligadas à posição C-2, a intervalos de dez a onze unidades de xilose. Foi ressaltado que apesar da hemicelulose em análise apresentar-se homogênea, a mesma não é uniforme quanto ao grau de polimerização e que as cadeias laterais dos açúcares ácidos parecem estar distribuídas ao acaso. As xilanas isoladas de Betula lutea apresentaram as mesmas características encontradas na xilana acima descrita (151).

BOUVENG e colaboradores (36) isolaram da holocelulose de Betula verrucosa e Betula pubesceris uma xilana contendo 11,8% de ácidos urônicos e 16,9% de grupos O-acetil ligados às unidades de xilose, nas posições C-3 e em C-2, em menor extensão.

Utilizando DMSO, TIMELL (167) extraiu da hemicelulose de vidoeiro branco (Betula papyrifera), uma xilana acetilada, contendo 3,6 grupos O-acetílicos para cada 10 unidades de D-xilose, provavelmente ligados ao C-3 da xilose.

Em 1962, o mesmo autor isolou por hidrólise enzimática e identificou o ácido aldotetraurônico deste vegetal, o qual, corresponde ao ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosilurônico (1  $\rightarrow$  2)-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-xilossil-(1  $\rightarrow$  4)-D-xilose (169) e um ácido pentaurônico (168), conformando a estrutura geral proposta para as hemiceluloses de angiospermas.

DUTTON & UNRAU (63) demonstraram, através de técnicas de degradação de SMITH, que as xilanas de caule de maçã e cereja são levemente ramificadas. Verificaram, também, que cerca de 20% dos componentes acídicos das xilanas isoladas destes vegetais correspondem ao ácido D-glucurônico, com 6 a 8% dos mesmos ocupando posição não terminal.

GAILLARD (71), comparando hemiceluloses de leguminosas e gramíneas, verificou que a maior diferença entre as duas famílias refere-se aos polímeros ramificados, ou seja à fração hemicelulósica B ramificada. Nas três espécies de leguminosas analisadas, as frações hemicelulósicas eram compostas de D-xilose e ácido 4-O-metil-glucurônico, em proporção que variou de 20:1 a 14:1. As frações hemicelulósicas B lineares eram constituídas de ácidos urônico (1 a 4,3%), L-arabinose (8,3 a 10,8%) e D-xilose (88 a 90%). Além destes açúcares estas frações continham também glucose (4 a 11,6%), cuja presença foi atribuída a uma glucana neutra. As hemiceluloses B continham em sua maior proporção galactose, ácido urônico e arabinose e em menor proporção xilose, glucose e ramnose, enquanto que as frações obtidas de gramíneas apresentaram grande conteúdo de D-xilose.

LINDBERG e colaboradores (108), em 1973, analisando a O-acetilglucuronoxilana de videiro, verificaram que os grupos O-acetílicos encontram-se esterificados nas posições C-2, C-3 e em C-2 e C-3 na proporção de 24:22:10, enquanto BOUVENG (37) encontrou a proporção de 12:24:6 para uma hemicelulose da mesma fonte.

O conteúdo de ácidos urônicos presentes em xilanas de angiospermas varia de 8 a 15%, sendo menor que nas gimnospermas, onde ocorrem na proporção de 15 a 20% (16).

A distribuição destas unidades ao longo da cadeia da xilana é considerada ao acaso, e esta distribuição é diferente nas xilanas de angiospermas e gimnospermas (16, 170).

HAVLICEK & SAMUELSON (83) isolaram de videiro, oligossacarídeos contendo de duas a dezoito unidades de D-xilose e verificaram que as unidades do ácido 4-O-metilglucurônico encontravam-se distribuídas irregularmente na cadeia principal da xilana. Resultados semelhantes foram obtidos em 1975 por ROSSEL & SVENSSON (146) que utilizaram técnicas de degradação específica, envolvendo oxidação sequencial,  $\beta$ -eliminação e hidrólise ácida suave.

Em 1979, KUBACKOVA e colaboradores (103) ao estudarem o modo de ação da xilanase produzida por Trametes hirsuta, verificaram que na xilana de salgueiro (Salix alba), os grupos acídicos encontram-se regularmente distribuídos ao longo da cadeia da xilana, contrastando assim, com os resultados obtidos para o videiro. Esta conclusão foi obtida através da análise dos produtos obtidos após a hidrólise enzimática. A fração ácida era constituída por ácido aldotetraurônico e aldohexaurônico na proporção de 2,9:1, junto a pequenas quantidades de ácido aldopentaurônico, semelhante ao isolado por TIMELL (168).

O polissacarídeo modificado, obtido após a remoção do ácido 4-O-metilglucurônico, quando submetido à hidrólise enzimática, liberou xilotetraose e xilohexose (2:1). Estes resultados, além de fornecerem dados para a mais provável estrutura desta xilana, sugerem o possível mecanismo de ação da endo (1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-xilanase.

COMTAT & JOSELEAU (51), utilizando xilanase de Sporotrichum dimorphosporum, verificaram em 1981, que na L-arabino(4-O-metil-D-glucurono)D-xilana isolada da gimnosperma Sequoia sempervirens, os grupos glucosilurônicos estão irregularmente distribuídos, apresentando regiões altamente substituídas.

Estes resultados estão em acordo com os encontrados em 1978, por SHIMIZU (155), o qual verificou que na xilana da conífera láríco, uma grande proporção dos substituintes ácidos estavam localizados em unidades contíguas de D-xilose.

Recentemente, BASAK e colaboradores (22) analisaram a hemicelulose A isolada de caule de Aegle marmelos. A mesma é composta de D-xilose e ácido 4-O-metilglucurônico na proporção molar de 7,4:1, além de traços de D-glucose, D-galactose, L-ramnose e L-arabinose. A análise estrutural desta xilana evidenciou as mesmas características encontradas para outras angiospermas.

As hemiceluloses de caule de Mimosa scabrella (bracatinga) tem sido extensivamente estudadas. GOMES (76), CORREA e colaboradores (54), OLIVEIRA (129), GEBARA (73) e ZERMIANI (190) analisaram a hemicelulose A desta angiosperma. Este polissacarídeo é constituído de aproximadamente 118 unidades de D-xilose, unidas por ligação do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , com ramificações no C-2 por unidades de ácido 4-O-metilglucurônico. A possibilidade de ramificações por unidades de D-xilose também foi sugerida (73, 76, 190). O conteúdo do ácido urônico encontrado por GOMES (76) na hemicelulose A foi de 11% e por DOROSO (59) de 5,1%.

OLIVEIRA (129) isolou com DMSO uma O-acetilglucuronoxilana com grau médio de polimerização de cento e cinquenta, onde a proporção molar de D-xilose e ácido 4-O-metilglucurônico é de 9:1 e o conteúdo de grupos O-acetílicos variou de 20 a 22%.

ZERMIANI (190), analisando a hemicelulose A de M. bracaatinga sugeriu através da análise dos oligossacarídeos neutros obtidos por hidrólise enzimática, que o polímero pode conter ramificações de D-xilose ou com posto aromático na posição C-2, além de indícios de ligação  $(1 \rightarrow 3)$  na cadeia principal da xilana. A análise dos oligossacarídeos ácidos sugeriu a presença de D-xilofuranose, além de D-xilopiranose terminal não redutora.

DOROSO (59) analisou a hemicelulose B (fração linear) do caule de M. bracaatinga, a qual consiste de unidades de D-xilose unidas por ligação do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$  e, possivelmente, algumas ligações do tipo  $\beta(1 \rightarrow 3)$ . A fração contém cerca de 3,3% de ácido 4-O-metilglucurônico, ligado à cadeia principal através da posição C-2 da unidade de D-xilose.

Utilizando o mesmo vegetal, REICHER & colaboradores (137) estudaram a localização dos grupos acetílicos na xilana nativa obtida por extração com DMSO do pó delignificado. A análise dos resultados obtidos evidenciou que na O-acetil-4-O-metil-D-glucuronoxilana, os grupos acetílicos ligam-se à xilana através das posições C-2 (14%), C-3 (16%) e C-2 e C-3 (5%). As condições em que não ocorre migração dos grupos acetílicos também foram estabelecidas, através de estudos realizados em modelos sintéticos.

Estes aspectos, bem como um estudo sobre os tipos de interações entre os complexos xilana-lignina da hemicelulose de Mimosa scabrella foram recentemente analisados por REICHER (139).

Foi isolada de Acácia mollissima, com DMSO, uma xiloglucana acetilada contendo D-xilose, D-glucose e D-galactose na proporção de 8,8:14,6:1,0 e 3,14% de grupos acetílicos, enquanto que a bracatinga, quando submetida ao mesmo tratamento, fornece uma O-acetil-xilana. Após extração desta hemicelulose (xiloglucana), foi isolada a hemicelulose A, contendo D-xilose (88%), D-glucose (7%) e ácidos urônicos (5%). A cadeia principal da xilana é formada por unidades de D-xilose unidas por ligações do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , com ramificações em C-2 e C-3, provavelmente por unidades de D-xilose e ácido urônico. A análise dos ácidos aldobiurônicos isolados mostrou que os mesmos eram constituídos pelo ácido 4-O-metilglucurônico e pelo ácido glucurônico, unidos aos monômeros de D-xilose (145).

### 1.2.2 - Glucomananas

Glucomananas ocorrem em pequenas quantidades na parede celular de angiospermas e devido ao seu baixo conteúdo, apenas 3 a 5% dos polissacarídeos totais, são pouco estudadas. A razão D-manose: D-glucose é aproximadamente 2,0:1,0, com  $\overline{Dp_n}$  em torno de 70.

Já nas gimnospermas, este grupo de polissacarídeos representa mais da metade das hemiceluloses presentes na parede celular e contém cerca de 1 a 2% de galactose, as quais estão unidas à cadeia principal como unidades terminais, por ligações  $(1 \rightarrow 6)$ . A propor-

ção D-manose: D-glucose é 3,0:1,0, com  $\overline{Dpn}$  superior a 200 (170).

Estes polímeros possuem composição similar à celulose, ou seja, a cadeia possui um eixo de simetria onde cada "passo" corresponde a duas moléculas (two fold screw axis). Devido a variação na orientação do grupo hidroxil no C-2 da manose para a posição axial, a interação entre os átomos contíguos, C-2 e O-2, é desfavorável, o que diminui o empacotamento e organização das cadeias, como ocorre na celulose (124).

JONES e colaboradores (92), foram os primeiros a isolarem uma glucomanana de madeira dura e obtiveram, através da extração com álcali do caule de P. tremuloides, um polissacarídeo contendo manose e glucose na proporção molar de 2,0:1,0. Os resultados obtidos por polarimetria e por hidrólise do heteropolímero metilado sugeriram que os resíduos de açúcar encontram-se unidos por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4).

Resultados semelhantes foram obtidos por ADAMS (5) e MIAN & TIMELL (113) para as glucomanas isoladas de Acer saccharum e Acer rubrum.

A distribuição de D-manose e D-glucose parece ser ao acaso.

Recentemente, MANDAL & DAS (110) isolaram uma  $\beta$ -glucomanana de folhas de Aloe barbadensis, a qual contém D-glucose e D-manose na proporção 1,0:22,0. O polímero metilado forneceu do 2,3,4,6-tetra-O-metil-manose, 2,3,6-tri-O-metil-manose, 2,3-di-O-metil-manose e 2,3,6-tri-O-metil-glucose na proporção molar de 1,3:18,3:1,2:1. O peso molecular determinado foi de  $1,5 \times 10^4$ . Os resultados levaram à conclusão de que as unidades de hexose encontram-se ligadas por ligações (1 $\rightarrow$ 4). A ocorrência de 2,3-di-O-metil-manose indica que o polímero apresenta ramificações, provavelmente, na posição C-6 da unidade de D-manose, já que somente o derivado tetra-O-metil-manose foi encontrado.

Esta glucomanana é significativamente diferente das anteriormente descritas. A glucomanana isolada de folhas de Aloe vahombe consiste de uma cadeia linear,

onde as unidades de  $\underline{D}$ -glucose e  $\underline{D}$ -manose interligam-se por enlaces  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . A proporção de glucose e manose é 1,0:3,0. Os grupos acetílicos ligam-se a cada tres unidades de açúcar e parecem localizar-se, principalmente, nos monômeros de glucose (135).

### 1.3 - Schizolobium parahybum (Vell) BLAKE

S. parahybum Blake (Ceasalpina parahyba Allem; Cassia parahyba Vell; Schizolobium amazonicum Huber; S. excelsum Vog) pertence a Família Leguminosae, Sub-Família Caesalpinoidea. O S. parahybum é conhecido vulgarmente como guapuruvu, guavirovo, bacurubu, guapiruvú, bacuruva, faveira, ficheiro, birosca e pau-de-vintém. Este vegetal encontra-se largamente distribuído nas matas litorâneas da Bahia até o Paraná e planícies aluviais ao longo dos rios.

Botânicos, como RECORD, consideram o gênero monotípico e se tratado desta forma, sua distribuição estende-se desde o México até o sul do Brasil. Outros consideram o S. amazonicum uma espécie distinta, ocorrendo desde o México até a Amazônia. Trata-se de uma árvore de grande porte, podendo atingir 30 metros de altura e caule com mais de um metro de diâmetro. Sua madeira é clara (branco-amarelada e roseo-pálida), lisa, lustrosa, macia, resistente e extremamente leve. O peso específico e a porosidade da madeira foram determinados pela CARBOMAFRA S/A (Curitiba-Pr) e os resultados obtidos foram  $0,4\text{g/cm}^3$  e  $1,384\text{ cm}^3/\text{g}$ , respectivamente.

A casca é lisa, cinza-esverdeada, com marcas transversais leves, em relevo. As folhas são grandes com mais ou menos dois metros de comprimento, com pinas opostas. Produz grandes quantidades de frutos e sementes, com alta porcentagem de germinação e baixa exigência quanto à luminosidade, tornando-se assim, vegetal de fácil manejo para reflorestamento.

Sua casca é tanífera. A madeira é utilizada para os mais variados fins, que vão desde a construção de barcos e aeromodelos até móveis de chapas compensadas. Apesar de sua fibra ser bastante curta, fornece um papel de boa resistência (56, 142).

#### 1.4 - OBJETIVOS

O estudo de essências florestais de potencial econômico é importante, como forma de fornecer subsídios para o melhor aproveitamento destes recursos renováveis. As hemiceluloses ocorrem em todas as plantas superiores correspondendo a, praticamente, 30% dos constituintes totais da madeira. Devido a sua larga distribuição, o estudo destes polímeros é justificável, pois poderá contribuir para um melhor aproveitamento dos mesmos, de acordo com suas características.

A análise estrutural destes polímeros podem vir a fornecer meios para se estabelecer as interações, relações e inter-relações dos componentes da madeira e, assim, sugerir o seu papel fisiológico.

Este trabalho foi realizado, tendo em vista os seguintes objetivos:

1. Determinar a proporção dos constituintes do caule de guapuruvu (taninos, lignina, pectinas, hemiceluloses, celulose, acetil e ácidos urônicos).
2. Determinar alguns aspectos estruturais das hemiceluloses que ocorrem em maior proporção.
3. Comparar as hemiceluloses obtidas deste vegetal com outras previamente isoladas de outras espécies pertencentes à mesma família.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - MÉTODOS GERAIS

#### 2.1.1 - Reagentes

Os reagentes empregados no decorrer do presente trabalho apresentavam especificação PA-ACS. A piridina empregada na acetilação foi seca com pastilhas de hidróxido de sódio e destilada sob pentóxido de fósforo e o DMSO empregado nas reações de metilação foi armazenado com peneira molecular 4Å. A acetona empregada na metilação foi destilada e seca com cloreto de cálcio anidro.

#### 2.1.2.- Análises cromatográficas

Açúcares neutros e ácidos foram analisados por cromatografia em papel, empregando-se técnicas ascendente ou descendente e papel de filtro Whatman nºs 1 e 3. Para propósito preparativo foram utilizados os papéis nºs 3 e 17, previamente lavados. Os sistemas solventes empregados na separação foram:

- I. Benzeno: n-Butanol: Piridina: água  
(1:5:3:3 v/v, fase superior)
- II. n-Butanol: Piridina: Água  
(10:3:3 v/v)
- III. Acetato de etila: Ácido acético: ácido fórmico: Água  
(18:3:1:4 v/v)

Os cromatogramas foram revelados com nitrato de prata alcalino (172), ftalato ácido de anilina (132), verde de bromocresol (42) e mistura de azul de bromofenol: verde de bromocresol: permanganato de potássio. (131).

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica em suporte de alumínio (Merck) ou em placas de vidro, cobertas com sílica gel G. Os sistemas solventes utilizados foram os seguintes:

- IV. n-Butanol: Acetona: Tampão fosfato 0,1 M pH = 5,0  
(4:5:1 v/v, em placa tamponada em pH=5,0)
- V. n-Butanol: Ácido fórmico: Água  
(33:50:17 v/v)
- VI. Acetato de etila: Piridina: Ácido acético: Água  
(5:5:1:3 v/v)

Para a visualização dos cromatogramas foram empregados os reveladores: ácido sulfúrico a 5% em metanol, 1,3-naftaleno-di-ol a 0,2% em ácido sulfúrico a 20% (160).

Os valores de  $R_{xil}$  referem-se ao movimento relativo a um padrão de D-xilose.

As análises por cromatografia em fase gasosa (g.l.c.) dos diferentes derivados de açúcar foram efetuadas em cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste e velocidade de deslocamento de carta de 20 cm/h. As colunas empregadas foram as seguintes:

Coluna A - 3% de ECNSS-M sobre "Gás chrom Q" de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável de 120 x 0,4 cm (d.i.), com detector a 240°C e câmara de injeção a 190°C. Na análise dos produtos de hidrólise, previamente convertidos a acetatos de alditóis, utilizou-se a coluna a 180°C. Para analisar os produtos da degradação de Smith, na forma de acetato de alditóis, a coluna foi operada com temperatura programada de 120 a 180°C com uma variação de 2°C/min. e fluxo de nitrogênio de 40 ml/min. A temperatura de operação da coluna para analisar os derivados metilados (161) foi de 160°C e fluxo de nitrogênio de 37,5 ml/min.

Coluna B - 3% de OV-225 sobre "Gás Chrom W" de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável de 200 x 0,15 cm (d.i.), com detector a 240°C, injetor a 190°C e fluxo de nitrogênio de 40 ml/min. Os produtos de hidrólise, na forma de alditóis acetilados, foram analisados em coluna a 190°C.

Os tempos de retenção (T) relativos dos produtos parcialmente metilados e acetilados foram calculados em relação ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol. A quantificação dos derivados acetilados e metilados foi feita pelo método da triangulação, conforme SWARDEKER (129), utilizando planímetro Tipo K-800, nº 136634, marca MOM.

As análises de cromatografia gasosa - espectrometria de massa conjugados (g.l.c. - m.s.) foram realizadas em aparelho Finnegan, modelo 4000, acoplado a um sistema de dados Inco 2.300. Para a análise dos acetatos de O-metil-xilitóis e O-metil-hexitóis foi empregada coluna capilar de vidro, com 29 metros de comprimento, contendo mistura de OV-17 e OV-225 na proporção de 1:3. Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons a cada dois segundos, desde massa 40 até 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna, a 50° e o aparelho foi programado [50° / min. até 220 (hold)]. O gás de arraste empregado foi hélio, com velocidade linear de 35 cm/segundo.

### 2.1.3 - Hidrólises Ácidas

As hidrólises totais das diferentes frações polissacarídicas foram feitas em tubo de vidro com tampa, utilizando ácido sulfúrico 1N ou ácido trifluoroacético (TFA) 1N (9°), em banho de água fervente por 5 horas. Os polissacarídeos metilados foram pré-hidrolisados com ácido sulfúrico a 72% (m/m) por 1 hora à temperatura ambiente e, após diluição do ácido a 8%, a hidrólise foi prosseguida por 4 horas, em banho de água fervente (38°).

Os hidrolisados com ácido sulfúrico foram neutralizados com carbonato de bário e o precipitado de sulfato de bário formado, foi removido por filtração ou por centrifugação.

A remoção do excesso de TFA, após hidrólise, foi feita por evaporação a vácuo. A completa remoção do ácido foi conseguida após sucessivas adições de pequenas porções de água e evaporação até secura.

#### 2.1.4 - Redução a Alditóis

As reduções dos monossacarídeos obtidos após hidrólise foram feitas com tetraidroborato de sódio à temperatura ambiente por várias horas e, o excesso do mesmo, decomposto pela adição de ácido acético 1M. Após a remoção de íons sódio com resina trocadora de íons (Dowex 50W-X8, 200-400 mesh, forma  $H^+$ ), e o ácido bórico formado foi eliminado por evaporação a vácuo, sob a forma de borato de metila, após adições sucessivas de metanol (186).

#### 2.1.5 - Acetilação de alditóis

A acetilação dos monossacarídeos obtidos por hidrólise e convertidos a alditóis por tratamento com boridreto de sódio, foi feita com mistura de anidrido acético: piridina (1:1, v/v) (185), durante 12 horas e à temperatura ambiente. A extração dos acetatos de alditóis foi feita com clorofórmio, após decomposição do excesso de anidrido acético; e a piridina, foi removida através de lavagens sucessivas da fase clorofórmica com  $H_2SO_4$  0,5M. O extrato clorofórmico foi seco com sulfato de sódio anidro e evaporado sob pressão reduzida, a 40°C.

#### 2.1.6 - Eletroforese

A homogeneidade das frações polissacarídicas foi verificada por eletroforese em tiras de papel acetilado (Cellogel), após coloração das mesmas com azul de Procion M-3G, de acordo com DUDMAN & BISHOP (62). A eletroforese foi realizada em tampão borato 0,1M e pH=9,3, utilizando-se como fonte o aparelho Fanem e cámara de imersão Chemetron, aplicando-se uma diferença de potencial de 250V e intensidade de corrente de 5 mA.

#### 2.1.7 - Espectrofotometria

As determinações espectrofotométricas na região do ultra-violeta foram realizadas em aparelho Varian, modelo 635 e na região do visível, em aparelho Coleman Jr modelo 6A e Perkin-Elmer, modelo 295. A espectro

fotometria na região do infra-vermelho foi efetuada em aparelho Beckman, modelo AccuLab 10. As pastilhas foram obtidas em prensa (Carver Laboratory Press, Modelo C), sob vácuo e pressão de 19000 psi, utilizando-se 3,0 mg do polissacarídeo em 300 mg de brometo de potássio.

As determinações de carboidratos totais foram feitas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (61), com leituras efetuadas a 480 nm para pentoses e 490 nm para hexoses, utilizando-se respectivamente, os fatores 0,88 e 0,90 para correção dos resultados obtidos. As dosagens de açúcares redutores foram realizadas pelo método de SOMOGYI & NELSON (117, 159). Os padrões utilizados foram D-xilose (40 µg/ml) e D-glucose (80 µg/ml). O teor em ácidos urônicos presentes nas frações polissacarídicas foi determinado pelo método do carbazol (28), empregando-se como padrão, solução de ácido glucurônico (14,87 µg/ml). Taninos foram determinados pelos métodos propostos por REICHER e outros (138), AOAC (131) e HAGERMAN & BUTLER (79), utilizando ácido pirogálico (40 µg/ml) e ácido tânico (1mg/ml) como padrões.

A quantificação de grupos O-acetil foi feita pelo método de HESTRIN modificado por DOWNS (60), utilizando galactose penta-acetato (5,0 µmol/ml) como padrão e pelo método da saponificação (129).

Todas as determinações quantitativas efetuadas foram realizadas em triplicatas. Os resultados apresentados neste trabalho representam a média aritmética de 3 determinações.

## 2.2 - MÉTODOS ESPECÍFICOS

### 2.2.1 - Coleta e processamento do material

O material para o presente trabalho foi gentilmente coletado e classificado pelo Departamento de Engenharia e Tecnologia da Madeira da Faculdade de Florestas da UFPR, tendo sido cedido pelo Sr. Saul C. Zugman, na região de Antonina-PR. O material constou de 4 árvores com portes e idades diferentes (6 a 9 anos).

Após a remoção da casca, discos cor respondentes à base, meio e topo de cada caule, cujos diâmetros variavam de 10 a 70 cm, foram cortados em pequenos fragmentos e estabilizados ao ar. A seguir, foram mistura dos e reduzidos a pó em moinho Wiley, utilizando peneira' de 20 mesh.

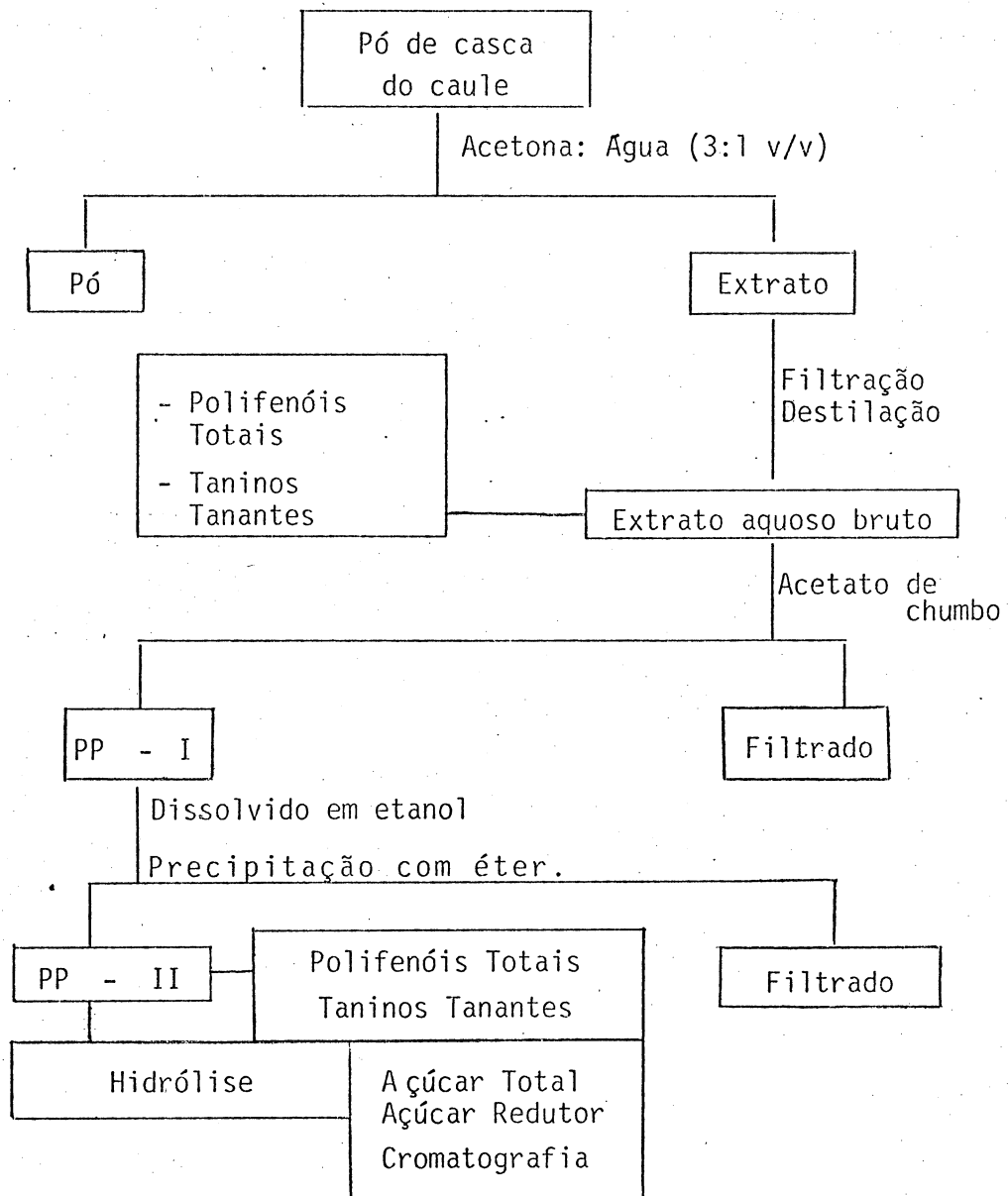
A casca foi cortada em pequenos pedaços e estabilizada em estufa a 60°C por 30 minutos. A seguir, a amostra foi seca ao ar por 24 horas ao abrigo da luz e pulverizada em moinho, utilizando peneira de 60 mesh.

### 2.2.2 - Extração e determinação de taninos

O pó da casca do caule de guapuruvú, (78,15 g) contendo 58,8% de umidade, foi extraído em Soxhlet com uma mistura de acetona: água (3:1 v/v), ao abrigo da luz, por 4 horas. O solvente foi esgotado e a extração re petida com nova porção de solvente por mais 6 horas (57). Os extratos obtidos foram misturados, filtrados a quente, e o resíduo insolúvel foi descartado. Após destilação da acetona, parte do extrato aquoso foi evaporado até secura. Aliquotas do extrato aquoso foram utilizadas para a execu<sup>ção</sup> de testes preliminares ( 57 ) e para dosar polifenóis totais e taninos tanantes, após reação do extrato com pó de pele, pelos métodos anteriormente citados.

As mesmas determinações foram efetuadas em solução de tanino comercial de acácia negra. Ao ex trato aquoso remanescente, foi adicionada solução de acetato de chumbo a 10%, até precipitação completa. O precipitado foi removido por filtração, lavado com água destilada e dissolvido pela adição de etanol e ácido sulfúrico 1M. O precipitado de sulfato de chumbo foi removido ' por centrifugação e a solução etanólica destilada a vácuo. O resíduo obtido foi dissolvido em pequeno volume de etanol e, o precipitado formado após a adição de eter etílico, foi separado e seco.

O tanino purificado (PP-II-20 mg) foi dissolvido em água, filtrado e utilizado para dosar polifenóis totais e taninos tanantes. Parte do tanino purificado foi hidrolisado com ácido sulfúrico 1N por 4 horas e o hidrolisado, após neutralização e deionização, foi analisado por cromatografia em papel no solvente 1. O procedimento encontra-se ilustrado no esquema abaixo (ESQUEMA I).



ESQUEMA 1. - Extração de Taninos

### 2.2.3 - Extração e determinação dos principais componentes do caule de guapuruvu.

O caule moído (100 g), contendo 9,4% de umidade, foi extraído por um período de 12 horas em extrator tipo SOXHLET, com uma mistura de benzeno: etanol (2:1 v/v) para a remoção de lipídios e pigmentos (95). O extrato benzeno: etanol foi evaporado e seco. O pó (R-I) foi seco ao ar e uma pequena parte do mesmo foi reservada para a determinação de cinzas (158), o-acetil (60) e lignina (Klason lignina) (6).

O pó restante foi submetido à extrações sucessivas com solução de oxalato de amônio a 0,5% e de EDTA a 0,5%, sob agitação mecânica, a 70-80°C, para a remoção de substâncias pécticas e lavado com água quente. Os extratos (F-I) foram obtidos por filtração através de pano, a quente.

O teor em açúcar total no extrato, acrescido dos líquidos de lavagem, foi determinado pelo método de DUBOIS (61), após filtração do extrato em placa porosa F. O pó (R-II) foi seco ao ar e utilizado para extração de hemiceluloses.

#### 2.2.3.1 - Extração das hemiceluloses

O pó (R-II) foi submetido à extração exaustiva com solução de hidróxido de potássio a 8%, sob agitação constante, em atmosfera de nitrogênio e temperatura ambiente. Pequenas quantidades de boridreto de sódio foram adicionadas ao material durante o processo de extração. As filtrações foram efetuadas em placa porosa M. O extrato alcalino obtido (F-II), denominado Fração KOH 8%, foi separado para o fracionamento das hemiceluloses e o rendimento foi determinado através de dosagem de açúcar total.

O pó (R-III) foi lavado abundantemente com água destilada e submetido a sucessivas extrações com solução de hidróxido de potássio a 24%, contendo tetraborato de sódio a 4%, nas mesmas condições anteriormente descritas. O extrato alcalino (F-III) foi denomina

do como fração KOH 24%. O resíduo (R-IV) contendo, praticamente, apenas celulose e lignina, foi lavado com água destilada e seco em estufa a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ , até peso constante. O conteúdo de lignina foi determinado pelo método de ADAMS ( 6 ) e o de celulose por diferença. Parte do hidrolisado obtido durante a determinação de lignina, foi concentrado, neutralizado e analisado por C.P. nos solventes I e II e por g.l.c., na coluna A, após a conversão a acetato de alditóis.

#### 2.2.4 - Fracionamento das hemiceluloses

O processo de fracionamento utilizado foi o descrito por O'DWYER ( 28 ).

**Isolamento das hemiceluloses A** - Os extratos alcalinos correspondentes às frações KOH 8% (F-II) e frações KOH 24% (F-III) foram resfriados a  $4^\circ\text{C}$  e o pH da solução levado à 5,0 pela adição de ácido acético glacial. As frações hemicelulósicas precipitadas,  $\text{GA}_8$  e  $\text{GA}_{24}$ , respectivamente, foram removidas por centrifugação a 12.000 r.p.m. a  $4^\circ\text{C}$ , após repouso de 24 horas. Os precipitados foram lavados com água acidulada com ácido acético, redissolvidos em solução de NaOH 1N contendo boróidreto de sódio e as soluções resultantes foram centrifugadas a 15.000 r.p.m. Este tratamento teve por finalidade a remoção de eventual contaminação com o pó da madeira. As frações  $\text{GA}_8$  a  $\text{GA}_{24}$  foram precipitadas pela adição de ácido acético a 50%, lavadas com água destilada (3X), etanol absoluto (3X), acetona (2X) e secas a vácuo à temperatura ambiente.

**Isolamento das hemiceluloses B** - Os sobrenadantes ácidos, acrescidos das águas de lavagem foram concentrados a vácuo e as frações hemicelulósicas B foram precipitadas pela adição de 3 volumes de etanol. Após centrifugação, as frações  $\text{GB}_8$  e  $\text{GB}_{24}$  obtidas foram dissolvidas em água e centrifugadas a 15000 r.p.m. para eliminar vestígios de hemiceluloses A e dialisadas por 24 horas. As frações foram, então, reprecipitadas com etanol, lavadas com porções de etanol (3X) e acetona (3X) e depois secas a vácuo à temperatura ambiente.

Os sobrenadantes alcoólicos, contendo as frações denominadas  $GC_8$  e  $GC_{24}$  foram destilados, dialisados contra água corrente por 24 horas e concentrados por evaporação a vácuo. Durante a diálise da fração  $GC_8$  ocorreu a formação de um resíduo ( $RGC_8$ ), o qual foi separado para posterior análise. As frações  $GC_8$  e  $GC_{24}$  foram obtidas após a adição de 5 volumes de etanol, centrifugação e secagem.

A extração e fracionamento das hemi-celuloses encontram-se no Esquema II.

A homogeneidade das frações  $GA_8$  e  $GB_8$  foram verificadas por eletroforese. As frações obtidas foram hidrolisadas pelo procedimento de SAEMAN(149); parte de hidrolisado foi cromatografado nos solventes I, II e IV e parte foi reduzido, acetilado e analisado por g.l.c. nas colunas A e B.

#### 2.2.5 - Determinação de ácidos urônicos.

Com a finalidade de se estabelecer um fator para corrigir os resultados obtidos na determinação quantitativa de ácidos urônicos pelo método do carbazol, os seguintes experimentos foram realizados:

- a. Determinação quantitativa de xilose pelo carbazol;
- b. Determinação quantitativa de ácido glucurônico pelo método do fenol: ácido sulfúrico;
- c. Determinação quantitativa de misturas ácido glucurônico-xilose pelo método do carbazol.

Inicialmente, foram feitas curvas de calibração de xilose e ácido glucurônico, utilizando os métodos do fenol: ácido sulfúrico e do carbazol, respectivamente. A seguir foram feitas curvas de calibração de xilose, determinadas pelo método de carbazol e do ácido glucurônico, pelo método do fenol: ácido sulfúrico. Misturas de xilose e ácido glucurônico foram preparadas e submetidas a reação com carbazol. Em um sistema, a concentração de xilose foi mantida fixa ( $0,66 \mu\text{mol/ml}$ ) e a



concentração de ácido glucurônico variou de 0,044 a 0,265  $\mu\text{mol/ml}$ . Em outro sistema, a concentração de ácido urônico foi fixada em 0,088  $\mu\text{mol/mol}$  com a concentração de xilose variando de 0,33 a 2,66  $\mu\text{mol/mol}$ .

## 2.2.6 - Análise estrutural da fração GA<sub>8</sub>

### 2.2.6.1 - Acetilação da fração hemicelulósica GA<sub>8</sub>.

A fração hemicelulósica GA<sub>8</sub> foi acetilada pelo seguinte procedimento: 100 mg do polissacarídeo foram solubilizados em 10 ml de formamida, em banho fervente por 16 horas. A seguir, foram adicionados 0,7 ml de piridina e 0,36 ml de anidrido acético (3,7  $\mu$ moles) dissolvidos em 3 ml de formamida. A acetilação foi realizada por um período de 15 horas, à temperatura ambiente. O excesso de anidrido acético foi decomposto pela adição de gelo picado. A seguir, foi adicionado água e o polissacarídeo acetilado precipitado (GA<sub>8</sub>-A), foi removido por centrifugação, lavado com água, acetona e seco.

O polissacarídeo acetilado (10 mg) foi hidrolisado conforme SAEMAN (149) e analisado por g.l.c. na forma de acetato de alditóis, na coluna A.

### 2.2.6.2 - Metilação da fração GA<sub>8</sub>-A.

A hemicelulose acetilada (GA<sub>8</sub>-A) foi inicialmente metilada pelo processo de HAWORTH (53). Foi adicionado a 70 mg do polissacarídeo, 10 ml de NaOH 10M, 30 mg de boroidreto de sódio e 3 ml de acetona. O sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio e agitação vigorosa, durante 4 horas. Devido a formação excessiva de espuma o sistema foi mantido em banho de água a 20°C. A seguir, foi adicionado sulfato de dimetila, gota a gota, durante 6 horas. Após 12 horas de reação, a mistura foi colocada em banho de gelo e neutralizada com ácido sulfúrico 4N, utilizando fenolftaleína como indicador, e dialisada por 24 horas em água corrente. A suspensão aquosa contendo o polissacarídeo parcialmente metilado foi concentrada a vácuo. Tal procedimento foi repetido mais 3 vezes.

O polissacarídeo parcialmente metilado foi submetido à mais quatro metilações pelo método de KUHN (53).

Ao polissacarídeo dissolvido em 3 ml de N,N-dimetilformamida, foram adicionados 3 ml de iodeto de metila e 2 g de óxido de prata seco, distribuídos em quatro adições, durante 24 horas. O sistema foi mantido em reação com agitação constante, por 36 horas. O resíduo de

sais de prata foi removido através de filtração em placa porosa F e lavados com dimetilformamida.

Ao filtrado foi adicionado água e o iodeto de prata formado foi removido por filtração e a solução contendo o polissacarídeo metilado foi dialisada em água corrente por 24 horas. O polissacarídeo foi, então, extraído com clorofórmio em funil de separação. O extrato clorofórmico foi agitado com solução de cianeto de potássio 0,1M, seco com sulfato de sódio anidro e evaporado a vácuo. O polissacarídeo metilado foi denominado GA<sub>8</sub>-I.

Uma pequena parte desta fração polissacarídica (GA<sub>8</sub>-I) foi hidrolisada, reduzida, acetilada e analisada por g.l.c. (coluna A) e por g.l.c.-m.s.

#### 2.2.6.3 - Hidrólise, redução e acetilação do polissacarídeo metilado.

A fração polissacarídica GA<sub>8</sub>-I foi hidrolisada de acordo com o procedimento descrito por BOUVENG & LINDBERG (38). 20 mg do polissacarídeo metilado foram colocadas em banho de gelo e adicionado 0,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% (d = 1,63 g/cm<sup>3</sup>).

Após a pré-hidrólise de 1 hora, o ácido foi diluído a 8%, pela adição de 4 ml de água e a hidrólise prosseguida com aquecimento em banho de água fervente por 4 horas. O hidrolisado foi neutralizado e os monossacarídeos parcialmente metilados foram reduzidos com boroidreto de sódio, acetilados e analisados conforme descrito anteriormente.

#### 2.2.6.4 - Oxidação com m-periodato de sódio

46,0 mg da fração polissacarídica desacetilada com NaOH 0,5N foram oxidados com solução de m-periodato de sódio (c.f. 0,05M, 50 ml) durante 10 dias, na ausência de luz e temperatura de 28°C (78, 87, 120). Como branco, foi utilizada solução de m-periodato de só-

dio 0,05M. Alíquotas de 1,0 ml da solução oxidante foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, para a determinação do consumo de periodato (120) com solução de tiosulfato de sódio (77). Para o cálculo do consumo de periodato por mol de pentose anidra foi utilizada a seguinte relação:

$$X = \frac{(B-A) \cdot N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot V \text{ solução oxidante} \cdot 132}{2 \cdot \text{ml da alíquota titulada} \cdot \text{g do polis} \cdot 1000}$$

onde:

X = moles de  $\text{IO}_4^-$  consumidos por mol de pentose anidra

B = ml de tiosulfato de sódio gastos no Branco

A = ml de tiosulfato de sódio gastos na Amostra

Os dados sobre o consumo  $\text{IO}_4^-$  nos diferentes intervalos de tempo foram lançados em gráfico e o consumo real de íons  $\text{IO}_4^-$  por mol de pentose anidra foi determinado pela extrapolação ao tempo zero.

O ácido fórmico liberado durante a oxidação do polissacarídeo foi determinado por titulação com NaOH 0,01M, em atmosfera de nitrogênio e pelo método colorimétrico descrito por BACKER & SOMERS (18).

A seguinte equação foi utilizada para calcular a concentração de ácido fórmico liberado durante a oxidação:

$$Y = \frac{(A-B) \cdot N \text{ NaOH} \cdot V \text{ solução oxidante} \cdot 132}{\text{ml da amostra titulada} \cdot \text{g do polis} \cdot 1000}$$

onde:

Y = moles de ácido fórmico liberado por mol de pentose anidra.

B = ml de NaOH gastos na titulação do Branco

A = ml de NaOH gastos na titulação da Amostra

## 2.2.6.5 - Degradação tipo SMITH

92 mg da fração hemicelulósica foram submetidos à oxidação com m-periodato de sódio 0,05M, em ausência de luz e temperatura ambiente, durante 96 horas. No final deste período, o excesso de periodato foi decomposto pela adição de etilenoglicol e o polialdeído formado foi submetido à diálise contra água corrente por 24 horas. A amostra foi, então, reduzida com boroidreto de sódio (120mg) por 24 horas e o excesso do mesmo destruído pela adição de ácido acético 1N. O material foi novamente dialisado para eliminar o ácidobórico e o acetato de sódio formados na reação. A seguir, a solução foi concentrada e o poliálcool submetido à hidrólise suave com HCl 0,5 N, por 24 horas e à temperatura ambiente. Após a remoção do ácido clorídrico por evaporação, o material hidrolisado foi dialisado contra água destilada (3 porções de 400 ml), com agitação constante, durante 24 horas (1, 77).

Uma alíquota da fração não dialisável (GA<sub>8</sub>-DS-II) foi hidrolisada com TFA 1N, reduzida com boroidreto de sódio, acetilada e analisada por g.l.c na coluna A. A solução contendo a fração dialisável (GA<sub>8</sub>-DS-I) foi concentrada e analisada por g.l.c.(coluna A), após hidrólise, redução e acetilação como anteriormente descrito.

O procedimento acima foi repetido mais uma vez e a fração obtida durante a 2ª degradação (Fração dialisável) foi designada de GA<sub>8</sub>-DS-III.

## 2.2.6.6 - Determinação do grau de polimerização.

Uma alíquota da fração GA<sub>8</sub> desacetilada, correspondendo a 36,88 mg de açúcar, foi reduzida com boroidreto de sódio (50mg) durante 48 horas. Após decomposição do agente redutor, o poliálcool foi oxidado com m-péridato de sódio (c.f. 0,1M) por 48 horas. Foi utilizado um branco nas mesmas condições e, como padrão, foi utilizada solução de eritritol 0,002M.

Alíquotas de 4 ml da solução contendo o polissacarídeo degradado foram transferidas para tubos de ensaio com tampa e o excesso de íons  $\text{IO}_4^-$ , bem como íons  $\text{IO}_3^-$  produzidos na reação foram precipitados pela adição de 6 ml de solução saturada de acetato de chumbo. Tubos de diálise contendo 10 ml de água deionizada foram introduzidos nos tubos de ensaio e a diálise foi processada por 48 horas. Ao término deste período, alíquotas de 1 ml foram retiradas do interior dos tubos de diálise e o formaldeído liberado foi determinado pelo método do ácido cromotrópico ( 88 ).

O grau médio de polimerização foi determinado pela equação:

$$\overline{\text{DPn}} = \frac{Y(30n)}{132 X}$$

onde:

Y = g de carboidrato total

X = g de formaldeído liberado

n = nº de moles de formaldeído liberado por grupo redutor terminal (n = 1,0)

#### 2.2.6.7 - Análise do ácido aldobiurônico isolado por hidrólise ácida parcial da fração $\text{GA}_8$ .

A fração hemicelulósica  $\text{GA}_8$  (100 mg) foi submetida à hidrólise com ácido sulfúrico 1N, durante 4 horas, em banho de água fervente. Após neutralização, centrifugação e concentração do sobrenadante em evaporador a vácuo, o hidrolisado foi aplicado em uma coluna (15,0 x 2,0 cm d.i.) contendo resina DOWEX 1 X 8 (200-400 mesh), forma  $\text{AcO}^-$ , com a finalidade de separar açúcares ácidos e neutros. Os açúcares neutros foram eluídos com água deionizada e os açúcares ácidos com ácido acético a 30%. O eluato contendo os componentes acídicos foi evaporado a vácuo e a eliminação do ácido acético foi conseguida por evapora -

ções sucessivas com água. Parte da fração neutra ( $GA_8$ -FN), foi concentrada e analisada por C.P. nos solventes I e III e por CCD no solvente IV e por g.l.c., na coluna A, na forma de alditóis acetilados. A fração contendo os açúcares ácidos ( $GA_8$ -FA) foi cromatografada nos solventes III, IV e VI. A análise cromatográfica no solvente III, revelou 4 componentes com valores de  $R_{xil}$  0,27; 0,62; 0,85 e 1,20. O componente com  $R_{xil}$  0,62 apresentou-se em maior proporção que os demais e foi isolado através de cromatografia preparativa em papel Whatman 3MM, previamente lavado com os seguintes solventes, na sequência: carbonato de sódio a 10%, água, ácido acético 2N, água, EDTA 0,01N e água. O ácido aldobiurônico isolado foi seco, e esterificado com metanol anidro, com 3% de cloreto de hidrogênio, durante 6 horas, em banho de água fervente. O catalizador foi removido da solução sob a forma de cloreto de prata, após adição de pequenas quantidades de carbonato de prata. O metanol foi eliminado por evaporação e o metil-éster foi então reduzido com boroidreto de sódio 0,3M em ácido bórico 0,4M, durante 30 minutos, em pH = 7,0. A seguir, o pH da mistura foi elevado a 9,0 pela adição de gotas de solução do redutor. O sistema foi mantido por uma noite e os íons  $Na^+$  foram removidos através de resina catiônica. A solução foi evaporada a vácuo e o ácido bórico presente no resíduo foi removido por evaporações sucessivas com metanol.

O processo de esterificação e carboxi-redução foi repetido mais duas vezes e o dissacarídeo foi hidrolisado com TFA 1N, reduzido, acetilado e analisado por g.l.c. na coluna A e por CCD, no solvente VI, antes da conversão a alditóis acetato.

## 2.2.7 - Análise estrutural da fração $GB_8$

### 2.2.7.1 - Filtração molecular

0,5 ml de solução aquosa da fração  $GB_8$  (5 mg/ml) foi aplicado no topo de uma coluna (41,0 x 1,0 cm d.i.) contendo Bio-Gel A 0,5m (100 - 200 mesh)

previamente calibrada com Blue Dextran T2000. A amostra foi eluída com água deionizada, com velocidade de escoamento de 5,0 ml por hora. Frações de 1,0 ml foram coletadas em coletor automático de frações e as mesmas submetidas à análise em espectrofotômetro Varian, a 280 nm. O teor em açúcar total presente em cada fração foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

#### 2.2.7.2 - Fracionamento em DEAE-celulose

200 mg da fração GB<sub>8</sub>, contendo 78% de açúcar, foram aplicados em uma coluna (35,0 x 2,5 cm d.i.) de DEAE-CELULOSE, forma Cl<sup>-</sup>. A coluna foi preparada com 15 g de resina (capacidade de troca determinada = 0,55 meq/g), a qual foi lavada abundantemente com água até remoção de partículas finas, a seguir com solução de NaOH 0,2N, água deionizada, solução de HCl 0,2N e água deionizada até reação neutra, com filtrações realizadas através de placa porosa. A resina foi suspensa em água e colocada na coluna, sobre uma camada de 2 cm de Celite. A coluna foi lavada com água deionizada até teste negativo com fenol-sulfúrico. A solução contendo o polissacarídeo (25 ml) foi, então, aplicada na coluna e a eluição feita, inicialmente, com água. Foram coletadas alíquotas de 10 ml, com velocidade de escoamento mantida em aproximadamente 1,0 ml/min., e a eluição acompanhada pela reação com fenol-ácido sulfúrico. A seguir, os polissacarídeos ácidos foram eluídos (Stepwise) com solução de NaCl nas seguintes concentrações: 0,02; 0,1; 0,25; 0,5 e 0,1N e com NaOH 0,05 e 0,2N.

As frações correspondentes a cada eluição foram reunidas e o rendimento de cada fração polissacarídica determinado pelo método de DUBOIS (61). Como o rendimento das frações obtidas pela eluição com NaCl 0,02N e 0,1N foi muito baixo, os eluatos foram desprezados. As frações foram dialisadas em água corrente, concentradas a vácuo e as frações polissacarídicas precipitadas pela adição de etanol. Os precipitados correspondentes a cada fração polissacarídica foram separados por centrifugação, la-

vados e secos. Os polissacarídeos (3 a 10 mg) foram hidrolisados com TFA 1N e analisados por cromatografia nos solventes I, II e IV e por g.l.c., na coluna A. O polissacarídeo eluído com água foi designado PSN e os outros, obtidos por eluição com NaCl 0,1; 0,25 e 0,5 e com NaOH 0,05 e 0,25N foram designados, respectivamente: PSX<sub>1</sub>, PSX<sub>2</sub>, PSX<sub>3</sub>, PSX<sub>4</sub> e PSX<sub>5</sub>.

#### 2.2.7.3 - Filtração em gel das frações PSN e PSX<sub>1</sub>

A homogeneidade das frações PSN e PSX<sub>1</sub> foi verificada por filtração em BIO-GEL P-30. 2 mg de cada polissacarídeo foram aplicados separadamente, em coluna de BIO-GEL P-30 (33,5 x 1,0 cm d.i.) previamente calibrada com Blue Dextran. A eluição de cada fração polissacarídica foi feita com água com velocidade de fluxo de 8 ml/h. Alíquotas de 1,0 ml foram coletadas e o conteúdo em açúcar determinado como descrito anteriormente.

#### 2.2.7.4 - Fracionamento da fração PSN

A fração polissacarídica PSN foi fracionada em BIO-GEL P-100 (100-200 mesh). Alíquotas contendo 4 mg do polissacarídeo foram aplicadas na coluna, onde o leito de gel era de 32,0 x 1,0 cm. A eluição foi feita com água com velocidade de escoamento de 5 ml/h. As frações coletadas (1,0 ml) foram analisadas pelo método de DUBOIS.

As duas frações obtidas (Pico I e Pico II) foram concentradas a vácuo e precipitadas pela adição de etanol. 2 mg de cada fração foram hidrolisados com TFA, e analisadas por g.l.c. na forma de acetatos de aldios na coluna A. A fração correspondente ao Pico I foi denominada PSG e a do Pico II de PSGM. A fração PSX<sub>1</sub> foi recromatografada nestas mesmas condições, seguida por um padrão de Dextran, com peso molecular de 20.800 daltons.

#### 2.2.7.5 - Metilação das frações PSG, PSGM e PSX<sub>1</sub>.

Os polissacarídeos PSG (10 mg), PSGM (7,0 mg), PSX<sub>1</sub> (50 mg) foram submetidos ao processo de metilação de HAKOMORI (80) modificado por SANDFORD & CONRAD (148), o qual é baseado na formação do alcóxido de polissacarídeo pela reação com o carbânion metilsulfínico (52), antes da adição do agente metilante, o iodeto de metila.

A fração polissacarídica, previamente seca sob pentóxido de difósforo, foi dissolvida em 2,0 ml de DMSO seco. Após resfriamento da solução, foi adicionado 0,5 ml do ânion metilsufinil (2 meq) e o sistema mantido em agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Ao sistema, resfriado em banho de gelo, foi adicionado 0,5 ml de iodeto de metila. Após completada a reação (observada pela redução da viscosidade e clareamento da solução), a mistura foi dialisada por 24 horas em água corrente. O polissacarídeo foi, então, extraído da solução pela adição de sucessivas porções de clorofórmio e o extrato clorofórmico resultante foi seco com sulfato de sódio anidro e evaporado a vácuo até a secura.

Este procedimento foi repetido mais três vezes. Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p). Após neutralização, os monossacarídeos resultantes foram reduzidos, acetilados e analisados por g.l.c., na coluna A. A fração PSGM foi analisada, também, por g.l.c. - m.s.

#### 2.2.7.6 - Grau de polimerização das frações GB<sub>8</sub> e PSX<sub>1</sub>.

As frações acima relacionadas foram reduzidas com boroidreto de sódio, oxidadas com periodato de sódio e o aldeído fórmico liberado foi determinado colorimetricamente pela reação com ácido cromotrópico, conforme descrito na Sec. 2.2.6.6.

#### 2.2.7.7 - Oxidação com m-periodato de sódio.

As frações GB<sub>8</sub> e PSX<sub>1</sub>, 40 e 60 mg de

açúcar, respectivamente, foram oxidadas por um período de 168 horas, na ausência de luz e à temperatura ambiente. O consumo de periodato foi verificado como anteriormente. O ácido fórmico liberado foi determinado por titulação potenciométrica e pelo método descrito por BACKER & SOMERS (16).

#### 2.2.7.8 - Degradação tipo SMITH

50 mg da xilana correspondente à fração PSX<sub>1</sub> foram oxidados com solução de m-periodato de sódio, durante 96 horas.

Após diálise, o polialdeído foi reduzido com boroidreto de sódio e, o poliálcool resultante, foi hidrolisado com HCl 0,5N. O ácido foi eliminado por evaporação até securo e o material dialisado. A fração dialisada (PSX<sub>1</sub>-DS-I) e a fração não dialisada (PSX<sub>1</sub>-DS-II) foram tratadas adequadamente e analisadas por g.l.c. na coluna A. O procedimento mais detalhado é encontrado na Sec. 2.2.6.5.

#### 2.2.8 - Isolamento de oligossacarídeos ácidos do caule de S. parahybum.

25 g do pó do caule de guapuruvu, previamente extraído com benzeno: etanol (2:1 v/v) foram extraídos exaustivamente com oxalato de amônio 0,1M e EDTA 0,1M a 80 °C. O pó foi lavado abundantemente com água quente, as filtrações feitas em funil com placa de vidro sinterizado. O pó foi, então, hidrolisado com 350 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N por 5 horas, a 100 °C, sob refluxo. O hidrolisado foi resfriado e separado através de filtração em placa porosa. O resíduo foi lavado com água e os líquidos de lavagem foram adicionados ao filtrado. Após neutralização do ácido com carbonato de bário, a solução contendo o material hidrolisado (700 ml) foi deionizada em resina DOWEX 50W e concentrada a vácuo (30 ml).

O hidrolisado foi aplicado no topo de uma coluna de DOWEX 1 X 8 forma AcO<sup>-</sup> (50 x 2,0 cm d.i.). Os açúcares neutros foram eluídos com água (1 litro) e os açúcares ácidos com ácido acético 3N (1 litro). O eluato ácido foi evaporado até securo e o resíduo lavado com

água até remoção completa do ácido acético. A fração ácida foi cromatografada em papel nos solventes I, III e por CCD, nos solventes IV, V e VI.

A análise cromatográfica em papel revelou a presença de 08 componentes e em CCD, no solvente IV, 12 componentes foram revelados. Foram isolados por cromatografia preparativa em papel Whatman nº 17 no solvente III três componentes (R<sub>x</sub>il 0,27; 0,42 e 0,64) designados por Fa<sub>1</sub>, Fa<sub>2</sub> e Fa<sub>3</sub>, respectivamente.

As frações Fa<sub>2</sub> e Fa<sub>3</sub>, obtidas em maior proporção, foram secas e submetidas ao tratamento com metanol: HCl 3% por 6 horas, a 60 °C e com boroidreto de sódio por 12 horas conforme descrito anteriormente. Este procedimento foi repetido mais três vezes. As frações carboxireduzidas foram hidrolisadas com TFA 1N e os monossacarídeos convertidos a acetatos de alditóis e analisados por g.l.c. na coluna A.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TANINOS

A casca do caule foi removida logo após a coleta, reduzida a pequenos fragmentos e envolta em papel alumínio, evitando desta forma, a exposição direta ao ar e luz, com o objetivo de minimizar processos oxidativos sobre os compostos fenólicos.

O material, mantido a 30°C por 24 horas, foi pulverizado e submetido à extração com acetona: água (3:1), conforme anteriormente descrito. O extrato obtido, foi concentrado a vácuo. Após a destilação da acetona, o extrato aquoso apresentou odor agradável, podendo tratar-se de óleo essencial volátil, pois foi arrastado pelo vapor d'água durante a concentração do extrato aquoso. O resíduo obtido após a concentração do extrato aquoso, apresentou coloração castanho-avermelhada, representando 22,41% da casca seca. A avaliação qualitativa, realizada com os reativos gerais de coloração e precipitação, evidenciou que as substâncias tânicas presentes na casca do caule do S. parahybum são constituídas por taninos hidrolisáveis e condensados.

Com a finalidade de apresentar resultados mais seguros, a avaliação quantitativa de taninos foi efetuada por vários métodos, visto que não há um método totalmente específico para esta finalidade, em virtude do imperfeito conhecimento e complexidade da composição química dos mesmos. A eficiência dos reativos e das técnicas empregadas foram testadas utilizando-se uma solução de tanino comercial de acácia negra (Acacia decurrens Willd), a principal espécie vegetal tanífera utilizada no Brasil. A técnica descrita por REICHER e colaboradores (138) baseia-se na redução do reativo de Folin-Denis em meio ácido e determinação colorimétrica do complexo formado. Como a re-

reação não é específica, os taninos são adsorvidos no pó de pele. O conteúdo em taninos tanantes é determinado por diferença, após a adsorção dos mesmos no pó de pele. Por este método, foram encontrados 26,57% de polifenóis totais no extrato bruto, o que corresponde a 5,96% da casca seca e 17,05% de taninos tanantes (3,82% do pó). O método oxidativo (AOAC) (13) baseia-se na oxidação dos taninos, em presença de um indicador corado. Esta determinação é feita por diferença, dosando-se as substâncias redutoras antes e após a precipitação com gelatina. O resultado obtido foi de 15,96% correspondendo aos taninos hidrolisáveis. A terceira técnica empregada baseia-se na capacidade de interação dos taninos (condensados ou hidrolisáveis) com proteínas, formando um complexo insolúvel e estável (19). Por este método, o conteúdo em taninos encontrado no extrato bruto foi de 28,36% representando 6,36% da casca do caule seca. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela I e representam os valores médios obtidos a partir de várias determinações. Para efeitos comparativos, a Tabela I inclui os resultados encontrados para as determinações efetuadas no tanino comercial de acácia negra. Após precipitação dos taninos com acetato de chumbo e éter, conforme descrito na Sec. 2.2.2, foi obtido um pó mais claro que o anterior (1,75 g). Este resíduo contém 68% de taninos, representando 16% de taninos no extrato bruto, o que está em concordância com o encontrado após a reação com pó de pele. O açúcar identificado por cromatografia em papel, após hidrólise do tanino purificado, foi a glucose.

Os resultados encontrados mostraram que a casca do caule de S. parahybum contém quantidades apreciáveis de taninos, igualando-se ao encontrado em Qualea grandifolia, que contém 14% de substâncias tânicas (143), Schinus terebinthifolius com 13,9% (35) e espécies de Tibouchina, com 13 a 31% destas substâncias (114). Esses vegetais podem representar mais uma opção para a indústria tanífera brasileira.

Tabela I - Determinação quantitativa de taninos na casca do caule de S. parahybum

Método empregado	<u>S. parahybum</u>	Tanino Comercial ( <u>Acácia decurrens</u> )
	Polifenóis Totais (%) a	Polifenóis totais (%) a
Colorimétrico (138)	26,57 17,05 <sup>b</sup>	35,96 30,01 <sup>b</sup>
Oxidativo (13)	15,96	16,20
Precipitação (79)	28,36	24,96

a - Valores relativos ao extrato bruto (resíduo seco).

b - Após reação com pó de pele cromada - Taninos Tanantes

### 3.2 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO CAULE DE S. parahybum.

O pó do caule foi submetido à extração com mistura de benzeno: etanol (2:1 v/v), com a finalidade de remover pigmentos, ceras vegetais, lipídeos e açúcares livres (95). O pó tratado foi utilizado para todas as de terminações realizadas.

O conteúdo em acetil presente no pó de madeira foi determinado através da reação de formação do ácido acetohidroxâmico, o qual forma complexo estável e solúvel com íons Fe(III), podendo ser determinado colorimetricamente; e pelo método da saponificação, que consiste na desacetilação com hidróxido de sódio e titulação do ácido acético formado, após remoção de íons Na<sup>+</sup> por resina trocadora (forma H<sup>+</sup>). O resultado obtido foi de 3,74% em peso (em relação ao pó seco) estando de acordo com o esperado para angiospermas, cujo conteúdo varia de 3 a 5% (41, 170). Para o caule de bracatinga (Mimosa scabrella) foi determinado um rendimento de 3,62%, em experimento realizado paralelamente.

A lignina foi determinada conforme

ADAMS (Klason lignina) (6) e corresponde a 23,75% em peso do caule de guapuruvu. O conteúdo em cinzas igual a 1,1%, determinado de acordo com os métodos oficiais, é relativamente elevado, quando comparado ao descrito na literatura. JONES e colaboradores (93) encontraram 0,2% de cinzas em caule de P. tremuloides e este mesmo valor foi encontrado por GLAUDEMANS em Betula papyrifera (74).

A análise dos açúcares presentes no caule foi feita por cromatografia gasosa, após hidrólise de SAEMAN (149) sendo observada a seguinte composição: Arabinose (1,49%); Xilose (30,05%); Manose (2,76%); galactose (1,40%); Glucose (64,3%) e traços de Ramnose.

Para a remoção de substâncias pécticas foram utilizados E.D.T.A., o qual complexa os íons  $\text{Ca}^{2+}$  ligados aos ácidos pécticos, formando um complexo estável ( $K_{st} = 5,0 \times 10^{10}$ ), e o oxalato de amônio, o qual promove a precipitação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  sob a forma de oxalato de cálcio ( $K_{ps} = 2,6 \times 10^{-9}$ ) (67). Desta forma, íons cálcio vão sendo removidos do ácido péctico, aumentando sua solubilidade e conseqüentemente, extração em água quente, junto aos ácidos pectínicos.

A Tabela II indica os principais constituintes do caule de S. parahybum.

**Tabela II** - Principais constituintes determinados no caule de S. parahybum.

Constituintes	% <sup>a</sup>
Acetil	3,74
Ceras, pigmentos, outros	3,33
Celulose	47,08
Cinzas	1,10
Hemiceluloses	18,88
Lignina	23,76
Substâncias Pécticas	2,11

a - Valores determinados em relação ao pó seco.

Após a extração das hemiceluloses, que será objeto de discussão na Sec. 3.3., o pó denominado R-IV, constituído basicamente de celulose ( $\alpha$ -celulose) e lignina, foi submetido à análise, com a finalidade de verificar a presença de xilana resistente. A análise realizada por cromatografia gasosa, após hidrólise do resíduo, mostrou a seguinte composição: xilose (12,69%); manose (2,23%); glucose (85,08%) e traços de arabinose e galactose.

ASTBURY, citado por POLGLASE (133), sugeriu que moléculas de xilana participam das micelas de celulose orientadas na mesma direção das cadeias de celulose, formando uma espécie de rede cristalina, onde as mesmas são mantidas juntas por forças de valências secundárias, tal como pontes de hidrogênio. Foi sugerida também a possibilidade de ligação química, provavelmente glicosídica, entre a xilana e a celulose, para explicar a resistência de parte da xilana ao tratamento alcalino empregado durante a extração. Foi verificada a resistência de xilanas frente a diferentes solventes e concentrações, constatando-se que a xilana resistente poderia ser extraída da  $\alpha$ -celulose com KOH a 24% (5,2M). O conteúdo de xilanas resistentes em angiospermas pode chegar a 9%.

### 3.3 - EXTRAÇÃO DAS HEMICELULOSES

A extração de hemiceluloses no pó de madeira, delignificado ou não, pode ser realizada através do uso de uma série de solventes e procedimentos.

Inicialmente, devemos considerar se a espécie vegetal a ser analisada pertence à sub-divisão Angiospermae ou Gimnospermae, pois em algumas gimnospermas a extração das hemiceluloses só pode ser realizada no pó de madeira delignificado. Outro fato a ser considerado é que os processos usados para a remoção de lignina utilizam agentes oxidantes fortes, os quais podem promover modificações estruturais e degradação dos polissacarídeos, devido à oxidação a ácidos aldônicos. A prévia delignifica

ção pode levar à perda dos polissacarídeos por solubilização na ordem de 10 a 20% (16).

As hemiceluloses são comumente isoladas do pó através do uso de solventes alcalinos, como por exemplo, os hidróxidos de metais alcalinos, em diversas concentrações. Foi verificado que o poder solvente relativo aos hidróxidos de sódio e de potássio dependerá da natureza do polissacarídeo, da concentração do álcali e da temperatura em que a extração é realizada.

HAMILTON e QUIMBY (39,170) verificaram que o poder de dissolução dos hidróxidos de lítio, sódio e potássio é o mesmo para os polissacarídeos contendo xilose. Já o LiOH e NaOH são mais eficientes do que o KOH para remover glucomanas e o KOH a 16-24% é mais eficiente para extrair xilanas de madeira dura do que o NaOH.

Polissacarídeos contendo unidades de açúcar com grupos OH em posição cis são facilmente removidos por hidróxidos contendo borato, devido à formação de complexos.

Normalmente, a obtenção de hemiceluloses é feita através de extrações sucessivas. Xilanas ácidas são removidas facilmente da holocelulose com KOH ou NaOH diluído (0,25 - 1,0N) preferencialmente às glucomanas e NaOH 2,5N remove principalmente 4-O-metil-glucuronoxilanas. Após a extração destes polissacarídeos, glucomanas são facilmente removidas com KOH ou NaOH (16 - 18%) contendo boratos.

Hemiceluloses podem ser extraídas também com água quente, após exposição do pó ao hidróxido de amônio. A amônia entumesce as fibras de celulose, alterando sua estrutura nativa, transformando-a em estrutura hidratada, aumentando a solubilidade das hemiceluloses em água quente (170).

NEUBAUER (118) utilizou  $NH_4OH$  para extrair xilanas de "sugar maple", verificando que os grupos O-acetil foram eliminados como acetilamida, e que apenas 2% de xilanas foram obtidas após extração com água.

As hemiceluloses acetiladas são facilmente extraídas com DMSO, método introduzido por HAGGLUND e colaboradores em 1956.

Desta forma, podemos verificar que o rendimento e a composição das hemiceluloses dependem do método de extração utilizado para obtê-las. Foi proposta a uniformização dos procedimentos de obtenção de hemiceluloses para permitir um estudo comparativo entre elas (31).

Recentemente, CARPITA (45) obteve dezessete distintas frações hemicelulósicas da parede celular de coleóptiles de milho, utilizando um gradiente de KOH 0,01 a 0,4M; mostrando que as três espécies de polímeros obtidas dependem do método de extração.

Tendo em vista os fatores acima citados, a extração das hemiceluloses foi realizada no pó não delignificado, optando-se pela extração direta, visando reduzir perdas dos polissacarídeos por solubilização ou degradação.

Para a primeira extração, utilizamos KOH 8% (1,4N) que extrai basicamente xilanas. O sal formado após a neutralização do extrato - o acetato de potássio - é mais solúvel em etanol, quando comparado ao acetato de sódio. A segunda extração foi realizada com KOH a 24% (4,28N), contendo 4% (0,1M) de tetraborato de sódio, com a finalidade de extrair glucomanas, as quais são encontradas nas madeiras duras na proporção de 3 a 5% (39,170). A extração inicial com álcali mais diluído foi feita com o objetivo de extrair glucuronoxilanas, além de prevenir o enorme inchamento do pó que ocorre quando o mesmo é tratado diretamente com álcalis mais concentrados.

É conhecido o fato de que, polissacarídeos em meio alcalino e em presença de oxigênio, podem ser degradados (degradação alcalina). Tal degradação ocorre a partir da oxidação do grupo terminal redutor (reação de poda) ou pelas unidades terminais das cadeias laterais.

Tentando minimizar qualquer alteração na estrutura dos polissacarídeos em decorrência do procedimento de extração, esta foi realizada em presença de boridreto de sódio, atmosfera de  $N_2$  e temperatura ambiente. Com os cuidados tomados, ou seja, proteção da ponta redutora através da redução com boridreto, ausência de  $O_2$  e temperatura ambiente, os efeitos degradativos ocasionados pelas condições experimentais sobre os polissacarídeos em extração são redu

zidos, exceto a de-esterificação de polissacarídeos acetilados, ocorrida em meio alcalino.

Na primeira extração, obteve-se 12,6% de hemiceluloses totais, na segunda, apenas 6,29% conforme mostrado na Tabela III.

Tabela III - Rendimento das frações hemicelulósicas do caule de guapuruvu.

Hemicelulose	Fração KOH 8% (%) <sup>a</sup>	Fração KOH 24% (%) <sup>a</sup>
A	6,45	3,44
B	5,54	2,66
C	0,60	0,19
T o t a l	12,59	6,29

<sup>a</sup> Determinado pelo método de DUBOIS e colaboradores (61), em relação ao pó seco.

### 3.4 - FRACIONAMENTO DAS HEMICELULOSES

As preparações obtidas através da extração alcalina consiste em uma mistura de polissacarídeos. A separação destes polímeros pode ser feita por precipitação fracionada, (através do controle de pH), pela adição de solventes orgânicos miscíveis, por agentes complexantes, como o reagente de Fehling, hidróxido de bário ou sal de amônio quaternário (Cetavlon), cromatografia e outros métodos (19,39).

Nestes procedimentos, obtém-se apenas fracionamento parcial, pois as frações são heterogêneas com respeito à composição e ao peso molecular (polimolecularidade e polidiversidade).

O'DWEYER (125) classificou estes polímeros como hemiceluloses A e B. A primeira, normalmente com maior peso molecular e pouco ramificada, é obtida após o extrato alcalino ser acidificado a pH = 5,0 com ácido

acético. Nestas condições, a hemicelulose B é solúvel, sendo, posteriormente, precipitada pela adição de etanol. A hemicelulose B normalmente possui peso molecular menor, é mais ramificada e contém um percentual de ácido urônico maior que a hemicelulose A. Após a remoção das frações hemicelulósicas A e B, permanece em solução a fração designada hemicelulose C e que consiste, segundo BLAKE e RICHARDS (31), de produtos de degradação (oxidação e degradação alcalina) dos polissacarídeos. Esta fração normalmente apresenta um alto conteúdo de cinzas. Estes autores observaram também que, quando a hemicelulose A é redissolvida em álcali, somente 30% da amostra original é reprecipitada, atribuindo à precipitação excessiva à elevada força iônica da solução, e em vista deste fato, sugeriram um possível procedimento para sub-fracionar a hemicelulose A.

GAILLARD (70) estendeu o método de classificação de hemiceluloses, utilizando iodo para separar polissacarídeos lineares e ramificados.

No presente trabalho, as hemiceluloses foram separadas de acordo com o procedimento proposto por O'DWEYER. Cada fração polissacarídica obtida foi redissolvida em NaOH 1N contendo boridreto de sódio (hemiceluloses A) e em água (hemiceluloses B) e reprecipitadas com ácido acético e etanol, respectivamente. Tal procedimento teve por objetivo eliminar traços de pó de madeira que poderiam estar contaminando a fração, bem como remover eventual contaminação das hemiceluloses por coprecipitação. Conforme pode ser verificado na Tabela III, as hemiceluloses A e B, extraídas com KOH a 8% correspondem a 63,5% das hemiceluloses totais.

A Tabela IV mostra a composição em monossacarídeos das seis frações obtidas. A fração GA<sub>8</sub> após dissolução e reprecipitação, mostrou diferença na proporção dos açúcares em relação à fração original. Desta forma, o procedimento foi repetido até que a proporção xilose: glucose fosse mantida constante, ou seja, aproximadamente 4:1.

A fração GB<sub>8</sub> apresentou-se homogênea por eletroforese e por filtração em gel e é composta pelos açúcares L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glucose.

Tabela IV - Composição em monossacarídeos das hemiceluloses isoladas do caule de S. parahybum

Fração hemicelulósica	Monossacarídeos <sup>a</sup>						Ácido <sup>b</sup> urônico	Ácido <sup>c</sup> urônico
	R amnose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose		
GA <sub>8</sub>	tr		80,36	-	-	19,64	16,56	12,90
GB <sub>8</sub>	2,56	5,60	73,75	3,26	2,20	12,63	25,79	19,73
GC <sub>8</sub>	5,93	4,49	9,54	33,79	11,41	34,84	11,27	8,62
GA <sub>24</sub>	tr	9,43	46,95	tr	tr	43,62	23,53	18,00
GB <sub>24</sub>	1,82	2,63	46,5	20,08	3,77	25,2	29,40	22,49
GC <sub>24</sub>	2,16	4,77	20,58	36,22	6,65	29,62	17,11	12,09

a. Determinado por g.l.c, na forma de acetatos de alditóis

b. Determinado pelo método Carbazol (28)

c. Resultados corrigidos pelo fator 0,235

tr. Traços

Pela composição, a fração GA<sub>24</sub> parece ser constituída por uma arabinoxilana e uma glucana e a fração GB<sub>24</sub> por uma xilana e uma glucomanana.

As hemiceluloses C foram obtidas por precipitação com etanol, após concentração e diálise. Durante a diálise, foi observada a formação de um resíduo branco, insolúvel em água e em etanol, o qual escurece quando exposto ao ar. O resíduo foi hidrolisado e a análise por g.l.c. (coluna B) revelou a presença de arabinose e pequenas proporções de ramnose, xilose, manose, galactose e glucose, além do pico que aparece após a glucose, o qual pode ser atribuído a compostos fenólicos (139). O resíduo foi também analisado no ultra-violeta, revelando duas bandas de absorção: uma em 210 nm e a outra, menor, em 275 nm, as quais foram observada em análises de lignina.

Pequenas quantidades de lignina podem ser dissolvidas pela ação de álcalis diluídos a frio. Foram encontrados, em extratos alcalinos de madeira, ácidos carboxílicos aromáticos, como o p-hidroxibenzóico, o vanílico, o siringico, o p-cumárico e o ferrúlico, que podem corresponder a produtos de degradação de lignina.

PEAL, citado por BROWNING (40) verificou que o ácido p-hidroxibenzóico encontrado em P. tremuloides está combinado com a fração de carboidratos, esteróides, compostos alifáticos de cadeia longa e lignina. Provavelmente, esta fração da hemicelulose C pertença a alguns destes grupos de compostos, ou represente produtos de degradação, apesar das condições relativamente amenas utilizadas na extração. O mesmo resíduo foi obtido quando se realizou a extração e fracionamento a partir de outra porção do pó de caule, o que nos leva a concluir que o resíduo acima citado pode não ser um artefato de técnica.

### 3.5 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS URÔNICOS

O conteúdo de ácidos urônicos encontrados em xilanas de madeira dura varia de 10 a 15% e em madeiras moles de 15 a 20% (16), o qual pode ser determinado por descarboxilação com ácidos ou através de métodos colorimétricos.

Um dos métodos colorimétricos mais empregados é o do carbazol, proposto por DISCHE em 1947, que consiste na desidratação do ácido hexurônico, formando principalmente, o ácido 5-formil-2-furóico, pequenas quantidades de furfuraldeído e 5-hidroxi-metil furfuraldeído, reagindo posteriormente, com o carbazol.

Neste método, diferentes ácidos hexurônicos e lactonas dão absorbâncias específicas e a presença de açúcares neutros e proteínas interferem na reação. Proteínas em concentração acima de 0,1% diminuem em cerca de 20% a absorção do ácido urônico e a presença de açúcares neutros ocasiona um aumento na absorção (hexoses: 6%, pentose: 1%), o que leva a sérios erros durante a determinação (39,111).

Várias modificações foram introduzidas ao método original. GREGORY, citado por MARSH (111) determinou que a adição de íons borato aumenta consideravelmente a intensidade de cor da reação com ácidos urônicos (exceto o ácido galacturônico) e com polissacarídeos ácidos. BITTER & MUIR (28) verificaram que 100 µg/ml de xilose não desenvolvem cor com o carbazol e que 60 µg/ml de glucose desenvolvem intensidade de cor equivalente a 8 µg/ml de ácido urônico.

GALAMBOS (72) verificou que a absorção característica de hexoses a 525 nm com o carbazol é maior quando o sistema é aquecido a 100°C por 10 minutos e que o desenvolvimento de cor devido a presença de hexoses, pentoses e aminoácidos podem ser prevenida pela adição de sulfamato de amônio ao sistema.

O ácido glucurônico pode ser diferenciado do ácido galacturônico, utilizando-se os métodos propostos por BLUMENKRATZ (34) e ARCURI (12). O primeiro,

que se baseia na reação com p-hidroxibifenil, apresenta a mesma sensibilidade com os dois ácidos acima citados, e o outro; que consiste na reação do açúcar ácido com indol, o ácido glucurônico apresenta apenas 14% da cor desenvolvida com o ácido galacturônico. Foi descrito por WARDI e colaboradores (175) um método para a determinação quantitativa de ácidos hexurônicos e pentoses, isolados ou em mistura.

SALIMATH e THARANATHAN (147) estudando hemiceluloses de casca de Dolichos lablab verificaram que embora a dosagem com carbazol tenha indicado 7,3% de ácido urônicos, nenhum açúcar ácido foi identificado por cromatografia.

SELEVENDRAN e colaboradores (149) verificaram que açúcares neutros interferem na determinação de ácidos urônicos pelo carbazol, na extensão de 5 a 15%.

Tendo em vista que a presença de material não urônico pode ocasionar erros apreciáveis na determinação quantitativa de ácido urônico através de método do carbazol, tentou-se estabelecer um fator de correção apropriado, a partir da determinação de xilose e mistura de xilose com ácido urônico pelo carbazol, conforme descrito em materiais e métodos.

Foi verificado que apenas 30% do ácido glucurônico total é dosado pela reação com fenol: ácido sulfúrico, o que representa o esperado, já que a produção de furfural a partir da descarboxilação ácida, não é estequiométrica (111, 161). Por outro lado, foi determinado que a xilose desenvolve cor com o carbazol, com absorção máxima em 525 nm, e que 0,66  $\mu\text{mol/ml}$  (100  $\mu\text{g/ml}$ ) de xilose desenvolvem intensidade de cor equivalente a 0,027  $\mu\text{mol/ml}$  (5,3  $\mu\text{g/ml}$ ) de ácido glucurônico, diferente, portanto, do que foi observado por BITTER & MUIR (138) os quais relataram que pentoses nesta concentração não desenvolvem cor com o carbazol.

Quando determinadas quantidades de ácido glucurônico e xilose foram misturadas, as absorbâncias combinadas não diferiram muito da soma das absorbâncias observadas para cada açúcar individualmente, conforme pode ser verificado nas Tabelas V e VI.

Para as determinações quantitativas de ácidos urônicos nas frações hemicelulósicas, foram tomadas alíquotas contendo cerca de 100  $\mu\text{g/ml}$  de açúcar total determinado pelo método de DUBOIS (61). Desta forma, foi estabelecido um fator igual a 0,2350 para corrigir os resultados obtidos (Tabela IV), o qual representa a interferência de 100  $\mu\text{g/ml}$  de xilose nas condições experimentais.

Tabela V - Absorbâncias de xilose e ácido glucurônico determinadas a 480 nm e 525 nm.

Xilose				Ácido Glucurônico			
$\mu\text{mol}$	$\lambda 480^a$	$\mu\text{mol}$	$\lambda 525^b$	$\mu\text{mol}$	$\lambda 480^a$	$\mu\text{mol}$	$\lambda 525^b$
0,066	0,125	0,33	0,04	0,044	-	0,044	0,13
0,132	0,25	0,66	0,08	0,088	0,06	0,088	0,26
0,198	0,38	1,00	0,125	0,177	0,135	0,132	0,395
0,264	0,50	1,33	0,170	0,265	0,19	0,177	0,51
0,33	0,675	2,00	0,25	0,354	0,25	0,22	0,62
0,396	0,84	2,66	0,32	0,44	0,30	0,265	0,76

<sup>a</sup> - Método do fenol: ácido sulfúrico (61)

<sup>b</sup> - Método do carbazol (28)

Tabela VI - Absorbância a 525 nm de misturas de xilose e ácido glucurônico.

$\mu\text{mol}$	525 <sup>a</sup>		$\mu\text{mol}$	525 <sup>a</sup>	
A.G. <sup>b</sup> + Xilose	Obs	Calc.	Xilose + A.G. <sup>b</sup>	Obs	Calc.
0,088	0,33	0,30	0,66	0,044	0,21
0,088	0,66	0,35	0,66	0,088	0,335
0,088	1,00	0,38	0,66	0,132	0,47
0,088	1,33	0,41	0,66	0,177	0,60
0,088	2,00	0,49	0,66	0,22	0,80

<sup>a</sup> - Determinada pelo método do carbazol (28)

A.G. - Ácido glucurônico

### 3.6.- ANÁLISE DA FRAÇÃO GA<sub>8</sub>

A composição de hemiceluloses em termos dos açúcares individuais que a constituem pode ser facilmente determinada através de hidrólise e análise cromatográfica do hidrolisado. Porém, a elucidação estrutural, ou seja, como simples unidades de açúcar compõem um polissacarídeo, é um procedimento bastante complexo, envolvendo a análise de resultados obtidos através de métodos químicos, físicos e físico-químicos.

Vários são os procedimentos disponíveis e utilizados para se chegar à conclusão da mais provável estrutura de um polissacarídeo, os quais envolvem a determinação da configuração anomérica dos átomos de carbono envolvidos na ligação, a existência de açúcares nas formas piranosídicas e furanosídicas, o comprimento da cadeia, o peso molecular, os pontos de ramificações e suas ligações à cadeia principal e, no caso de heteropolímeros, a sequência das unidades de açúcar que o compõem.

Um dos procedimentos mais utilizados é a análise do hidrolisado de polissacarídeos metilados, que fornece informações a respeito do modo de ligação entre os monômeros que constituem o polímero. Estas informações são complementadas através da análise dos produtos obtidos por oxidação e degradação do polímero em estudo. Uma análise mais completa exige, ainda, o estudo dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise ácida ou enzimática, bem como a análise de espectros obtidos por ressonância magnética nuclear e determinação da massa molecular através de espectrometria de massa.

O requisito básico, em qualquer análise de estrutura, é a pureza do composto que será submetido à análise. No caso de polissacarídeos, mais especificamente as hemiceluloses, o critério de pureza é referido à sua "homogeneidade", com respeito à sua migração em campo elétrico, à sua filtração molecular ou mesmo com relação à sua composição. Porém, estes critérios não excluem a polidiversidade e polimolecularidade que caracterizam estes polímeros.

No presente trabalho, a fração hemicelulósica  $A_8$  ( $GA_8$ ) foi considerada homogênea pelos resultados obtidos por eletroforese e pela relação xilose: glucose constante e igual a 4,0:1,0 obtida após repetidas dissoluções e reprecipitações do polissacarídeo. A presença de glucose nesta fração pode representar contaminação do material hemicelulósico por coprecipitação de pequenas cadeias de celulose, como também fazer parte do complexo hemicelulósico em forma de glucana não celulósica ou, ainda, estar ligada à xilana (54).

Parte da fração  $GA_8$  foi purificada por acetilação. Após este procedimento, a razão  $D$ -xilose:  $D$ -glucose na fração hemicelulósica é aumentada para 14,6:1,0; permanecendo constante após uma segunda acetilação (Figura I).

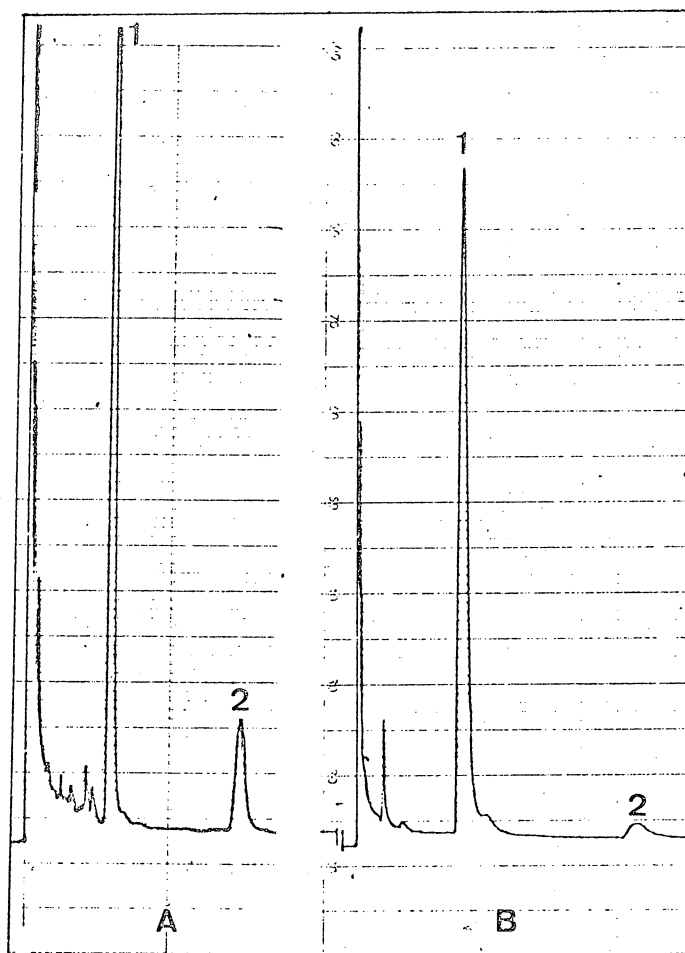


Figura I - Análise cromatográfica por g.l.c (coluna A) dos acetatos de alditóis obtidos após hidrólise, redução e acetilação das frações polissacarídicas  $GA_8$  (A) e  $GA_8$  acetilada (B). (1) xilitol, (2) glucitol.

Se considerarmos que o complexo hemicelulósico contém, além da xilana, uma glucana, a redução na concentração da glucose no material acetilado poderia ser explicada através da maior solubilidade da glucana de vido, talvez, a seu menor tamanho.

A pequena quantidade de glucose que permanece junto à xilana acetilada pode ser considerada, também, como contaminação pelas cadeias da glucana ou mes mo que esta encontra-se ligada à xilana pois a mesma proporção entre os açúcares foi obtida após uma segunda purificação e em repetidos experimentos.

Isto poderia ser comprovado através do fracionamento da hemicelulose acetilada, por exemplo, de modo semelhante ao realizado por SALIMATH & THARANATHAN (147) e de posterior análise de oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida suave ou enzimática.

### 3.6.1 - Análise do polissacarídeo metilado

A fração hemicelulósica GA<sub>8</sub>-I, metilada pelos métodos de HAWORTH e de KUHN (53), foi hidrolisada (Sec. 2.2.6.2 e 2.2.6.3) e o hidrolisado foi analisado co mo derivados de acetatos de alditóis por g.l.c. e por g.l.c. - m.s. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram identificados por g.l.c. através de seus tempos de retenção relativos (T) (coluna A) e seus espectros de massa foram comparados a padrões autênticos. Os resultados encontrados estão na Tabela VII e nas figuras II, III e IV.

A presença dos derivados 2,3,4-tri-0 - metil-D-xilitol, 2,3-di-0-metil-D-xilitol em proporção mo lar igual a 1,0:95,62 respectivamente, indicam que esta xi lana possui estrutura basicamente linear, onde as unidades de D-xilose encontram-se unidas por ligações glicosídicas' do tipo (1→4).

O aparecimento do derivado 3-mono-0 - metil-D-xilitol, identificado através de seus fragmentos ' de massa (Figura III-a), na proporção molar de 3,96 pode ser atribuído à presença de ramificações por açúcar ou grupos aglicona, por metilação incompleta, por demetilação

Tabela VII - Análise por metilação da fração hemicelulósica GA<sub>8</sub>.

Acetato de alditóis	T <sup>a</sup>	%	T(min) <sup>b</sup>	Fragmentos de massa (m/z)	%
2,3,4-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	0,67	0,99	6,45	43 58 71 87 101 117 129 161	0,94
2,3,4,6-tetra- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	1,0	0,85			
2,3-di- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	1,48	88,97	8,34	44 58 71 81 87 101 117 129 161 189	89,88
2,3,6-tri- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	2,60	3,08	10,33	43 45 71 87 99 101 113 117 143 161 233	3,89
3-mono- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	2,91	3,89	10,12	43 59 71 87 99 117 129 145 159 172 189	3,73
2,6-di- <u>0</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	3,81	2,22	12,26	43 45 58 87 97 111 117 129 143 159 185 213	1,56
Não identificado	4,06	tr			
"	5,52	tr			
"	6,96	tr			

<sup>a</sup> - Tempos de retenção relativos ao 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol (Coluna A)

<sup>b</sup> - Tempo de retenção em relação ao pico do solvente (Coluna C).

do polissacarídeo durante a hidrólise e mesmo pelo rompimento das ligações glicosídicas entre xilose e ácido urônico, apesar da sua resistência à hidrólise como resultado da estabilização da mesma pela presença dos grupos carboxílicos (24).

A partir da análise dos derivados do polissacarídeo metilado, a presença de pontos de ramificação por unidades de D-xilose fica excluída, considerando a proporção respectiva de 3,96:1,0 entre os derivados 3-mono-O-metil-D-xilitol e 2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol, o qual é originado de unidades terminais não redutoras de xilose, embora esta discrepância seja atribuída, por alguns autores, à alta volatilidade do derivado trimetilado (89, 174).

Se esta xilana apresentasse pontos de ramificação por D-glucose, conforme sugerido anteriormente, o derivado esperado seria o 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, em proporções similares a do mono-metil-xilitol, o que não foi observado. A ocorrência de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, 2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol e 2,6-di-O-metil-D-glucitol, identificados por g.l.c. e g.l.c.-m.s. (Figura IV-a e b) é atribuída à contaminação da xilana por cadeias de uma glucana.

Outra possibilidade seria que a xilana em análise apresentasse ramificações terminadas por ácidos urônicos, conforme sugerido por alguns autores (20, 93). Neste caso, se o ácido urônico estivesse ligado à posição C-2 da unidade de D-xilose, o derivado metilado da xilose corresponderia ao 3,4-di-O-metil-D-xilitol, o qual apresenta o mesmo tempo de retenção do 2,3-di-O-metil-D-xilitol ( $T = 1,54$ ). Se o ácido urônico ocupasse a posição C-3 da unidade de D-xilose, o derivado esperado seria o 2,4-di-O-metil-D-xilitol ( $T = 1,34$ ), o que não foi observado por g.l.c. e g.l.c. - m.s.

Desta forma, o derivado 3-mono-O-metil-D-xilitol tem sua origem, provavelmente, em pontos de ramificação no C-2 da unidade de D-xilose por grupos aglicona, possivelmente lignina, ou pela liberação de algumas unidades de ácido urônico, o qual não é identificado nesta análise.

A análise dos gráficos de cromatogra

fia em fase gasosa mostra ainda a presença de picos não identificados com  $T = 4,06$ ;  $T = 5,52$  e  $T = 6,96$ . SJOSTROM, citado por BLAKE & RICHARDS (30) atribuiu os picos falsos observados na análise cromatográfica a fragmentos acídicos e especula-se que os mesmos podem originarem-se de fragmentos de lignina.

ZERMIANI (190) isolou da hemicelulose A de bracatinga um componente com  $T = 5,7$  (coluna A) e análise por espectrometria de massa revelou que o mesmo não apresenta estrutura relacionada a monossacarídeos. Sua origem foi atribuída a um derivado aromático, com possível origem na lignina.

Foi observado na análise por g.l.c. - m.s. da hemicelulose A de guapuruvu a ocorrência de um derivado com  $T = 11:18$  min (relativo ao pico do solvente) e espectro de massa com fragmentos iônicos correspondentes ao xilitol penta-acetato (Figura III-b) em proporção correspondente a 60% daquela observada para o derivado mono-metil-xilitol, indicando que algumas unidades de xilose da cadeia principal possuem as posições C-2 e C-3 substituídas.

### 3.6.2 - Oxidação com periodato de sódio e degradação tipo SMITH.

A fração  $GA_8-A$ , previamente desacetilada com hidróxido de sódio 0,2N, quando submetida à oxidação com periodato de sódio à temperatura ambiente (28 a 32 °C) consome 0,86 moles de  $IO_4^-$  /mol de pentose anidra. A temperatura de 4 °C, o consumo observado foi de apenas 0,41 moles do oxidante/mol de pentose anidra (Figura V).

O ácido fórmico liberado foi de 0,1 mol/mol de pentose anidra.

BARNOUD e colaboradores (21) constataram a dificuldade da oxidação de xilanas a baixas temperaturas quando estudaram uma xilana isolada de Arundo donax. O mesmo comportamento foi observado por WENZEL (184) em uma xilana isolada de folhas de Coffea arabica.

A dificuldade de xilanas serem oxidadas à baixa temperatura encontra explicação no fato de

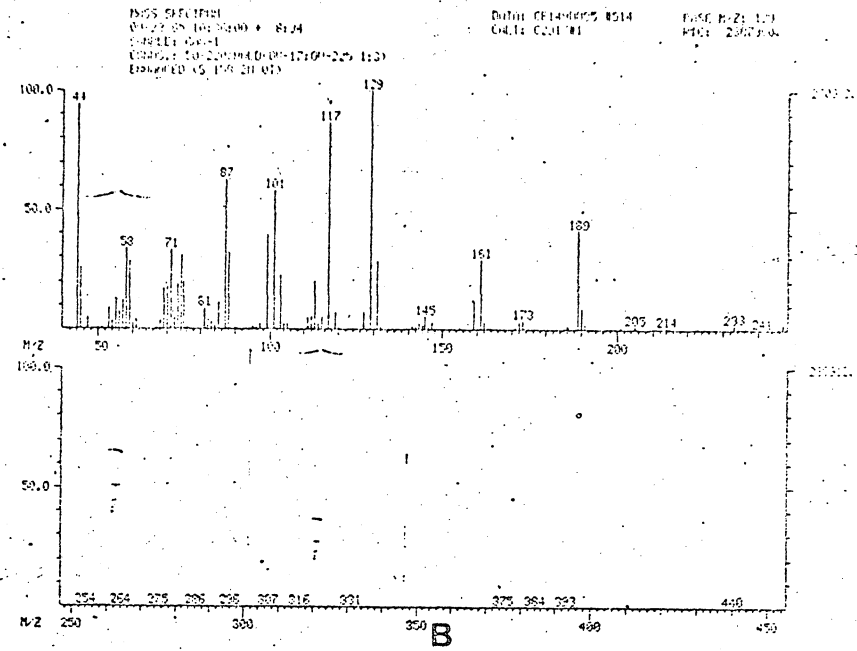
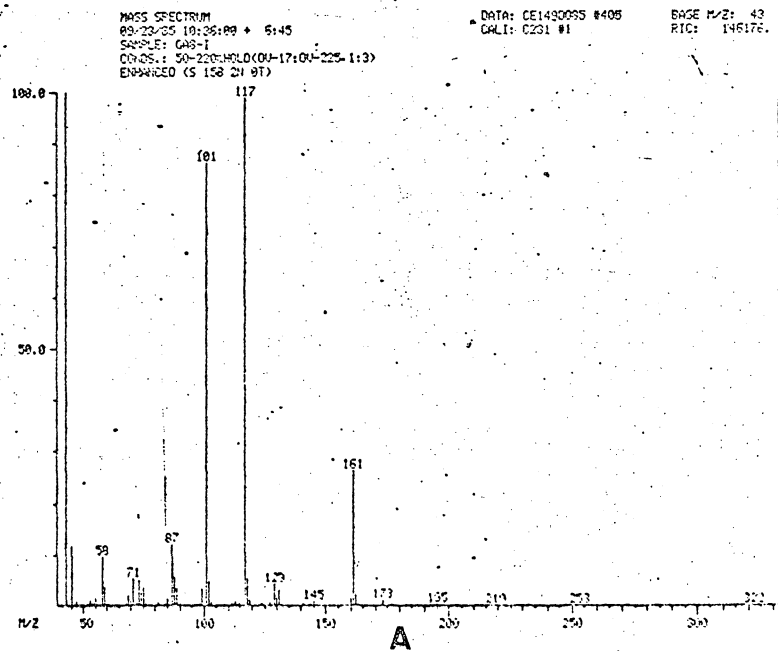


Figura II - Espectros de massa de:

A - 1,5-di-0-acetil-2,3,4-tri-0-metil-xilitol

B - 1,4,5-tri-0-acetil-2,3-di-0-metil-xilitol

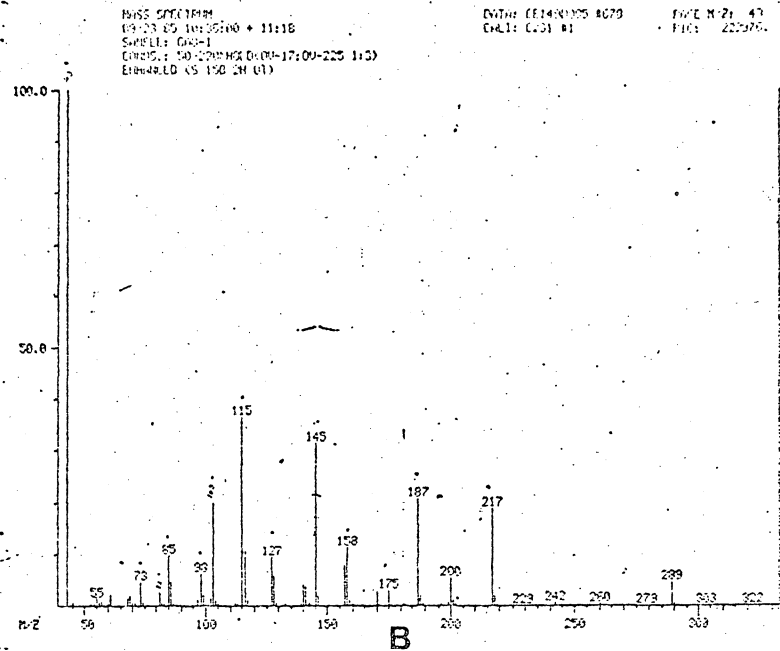
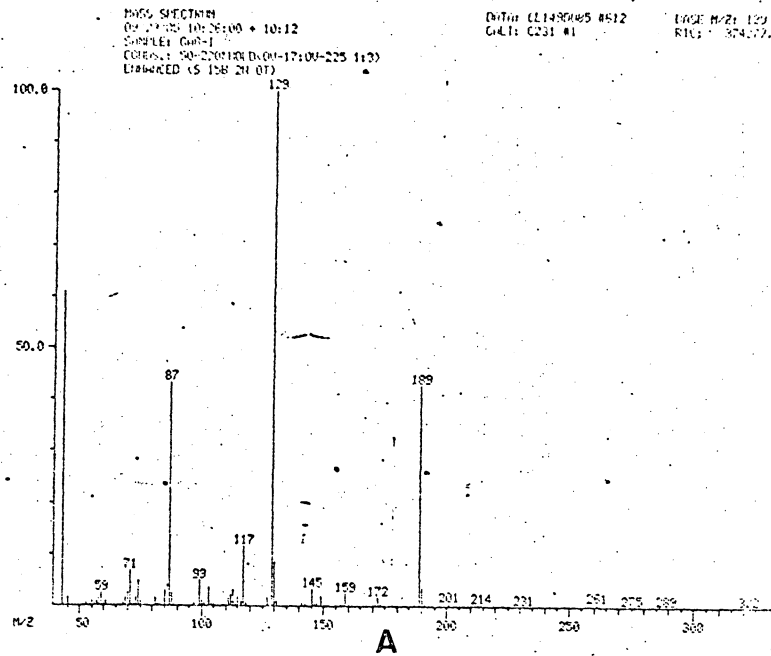


Figura III - Espectros de massa de:  
 A - 1,2,4,5-tetra-0-acetil-3-0-metil-xilitol  
 B - xilitol-penta-acetato

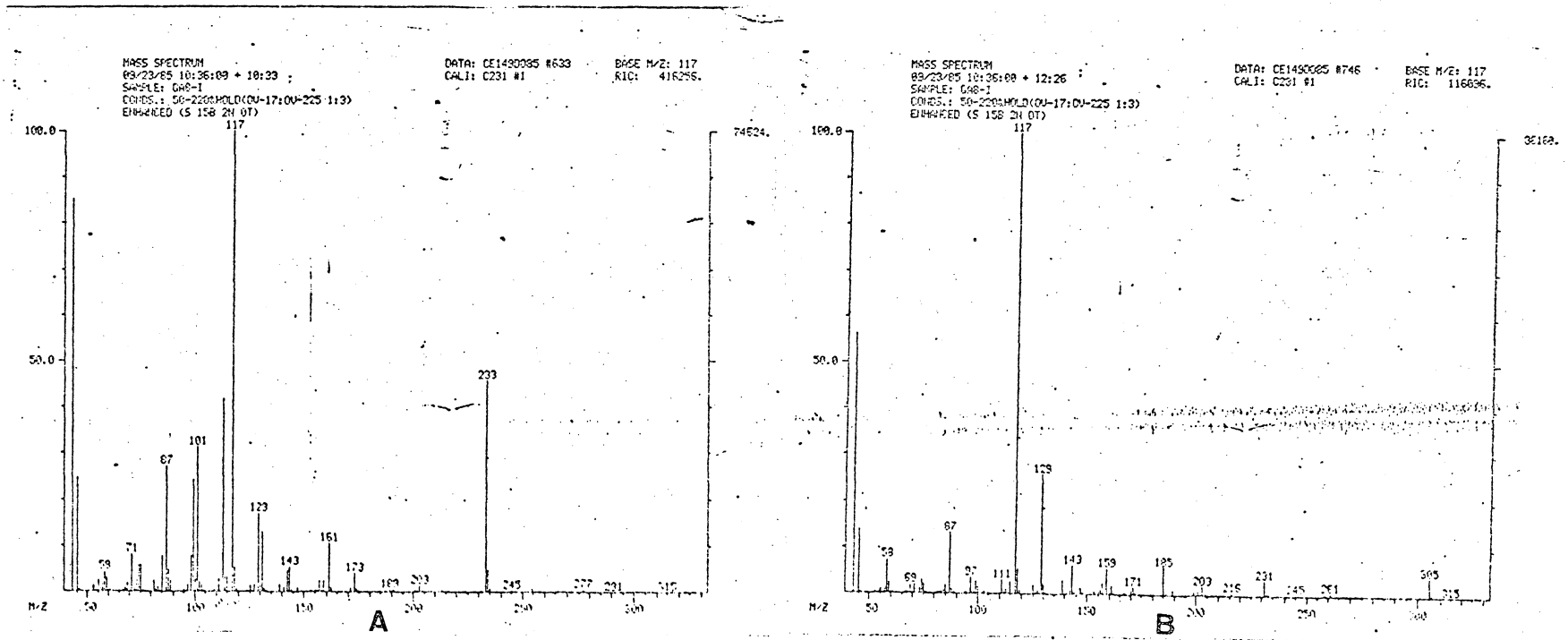


Figura IV - Espectros de massa de:

A - 1,4,6-tri-0-acetil-2,3,6-tri-0-metil-hexitol

B - 1,3,4,5-tetra-0-metil-2,6-di-0-metil-hexitol

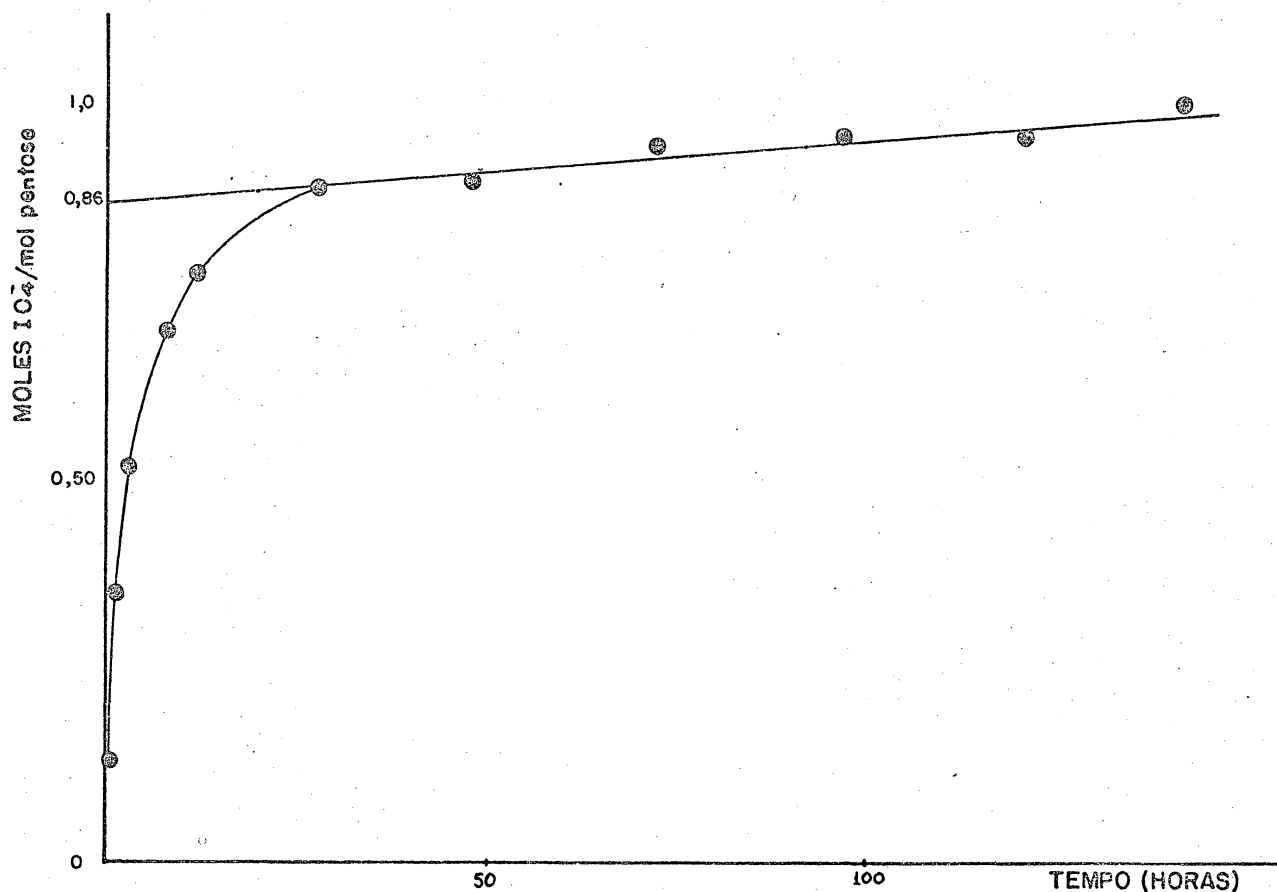


Figura V - Determinação do consumo de periodato de sódio pela fração hemicelulósica GA<sub>8</sub> do caule de *S. paraybum*.

Uma amostra do polissacarídeo (46 mg) foi oxidada com periodato de sódio (c.f. 0,05M) à temperatura ambiente. Alíquotas de 1,0 ml da solução oxidante foram retiradas em diferentes intervalos de tempo. O consumo de periodato de sódio foi determinado através da titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01M e os valores obtidos foram extrapolados para o tempo zero.

que as xilanas formam agregados moleculares, enrolando-se em  $\alpha$ -hélice (32, 184).

A análise da fração dialisada obtida após o polissacarídeo ter sido submetido à degradação controlada de SMITH (1, 77) mostrou que a mesma é constituída por glicerol, por xilitol, por traços de eritritol e por outros produtos não identificados.

O grau médio de polimerização determinado experimentalmente (83) para esta fração polissacarídica foi de 140. CORREA e colaboradores (54) encontraram para a hemicelulose A de Mimosa bracaatinga um grau médio de polimerização igual a 150.

O consumo de m-periodato de sódio, esperado para uma xilana linear com  $\overline{Dpn} = 140$  seria de 1,01 moles/mol de pentose anidra. A partir do consumo observado (0,86 moles de  $IO_4^-$ ), pôde-se verificar que 0,15 moles do oxidante não foram consumidos, significando que aproximadamente 21 unidades de D-xilose não foram oxidadas.

Para a estrutura sugerida a partir dos dados de metilação e  $\overline{Dpn}$  encontrados, o consumo de periodato de sódio esperado seria de 0,98 moles/mol de pentose anidra e apenas 7,14  $\mu$ moles de ácido fórmico seriam liberados. Estes resultados, comparados aos encontrados (0,86 moles de  $IO_4^-$ /mol de pentose e 0,07 moles/mol de ácido fórmico) sugerem que aproximadamente 17 unidades de xilose não foram oxidadas.

A análise dos produtos obtidos após a degradação do polissacarídeo, mostrou que a fração dialisável (GA<sub>8</sub>-DS-I) contém 86% de glicerol, 14% de xilitol e traços de eritritol. A fração não dialisável (GA<sub>8</sub>-DS-II) contém xilitol e uma série de componentes não identificados.

Estes dados sugerem que pelo menos 19 unidades de xilose não apresentam hidroxilas vicinais, indicando possíveis pontos de ramificação.

Assim o conjunto de resultados obtidos sugerem que a xilana isolada do caule de S. parahybum com KOH a 8% (GA<sub>8</sub>) apresenta-se constituída por unidades de (1→4) xilopirranose, onde algumas unidades de xilose possuem a posição C-2 substituída, por lignina ou outros grupos aglicona e/ou ácidos urônicos.

### 3.6.3 - Identificação do ácido aldobiurônico

O ácido aldobiurônico isolado da fração hemicelulósica GA<sub>8</sub>, conforme Sec. 2.2.6.7, contém proporções equimoleculares de D-xilitol e 4-O-metil-D-glucitol além de traços de glucitol, conforme pode ser verificado na Figura VI, cujos componentes são obtidos, respectivamente, da D-xilose, do ácido 4-O-metilglucurônico e do ácido glucurônico ou da glucose.

Estes açúcares foram evidenciados por cromatografia em papel, em camada delgada e gasosa, após sucessivas metanólises, carboxireduções e hidrólise.

Como nas demais hemiceluloses já estudadas (16, 133, 190), o ácido aldobiurônico deve corresponder ao ácido (2-O-metil- $\alpha$ -D-glucuronosilurônico)-D-xilose.

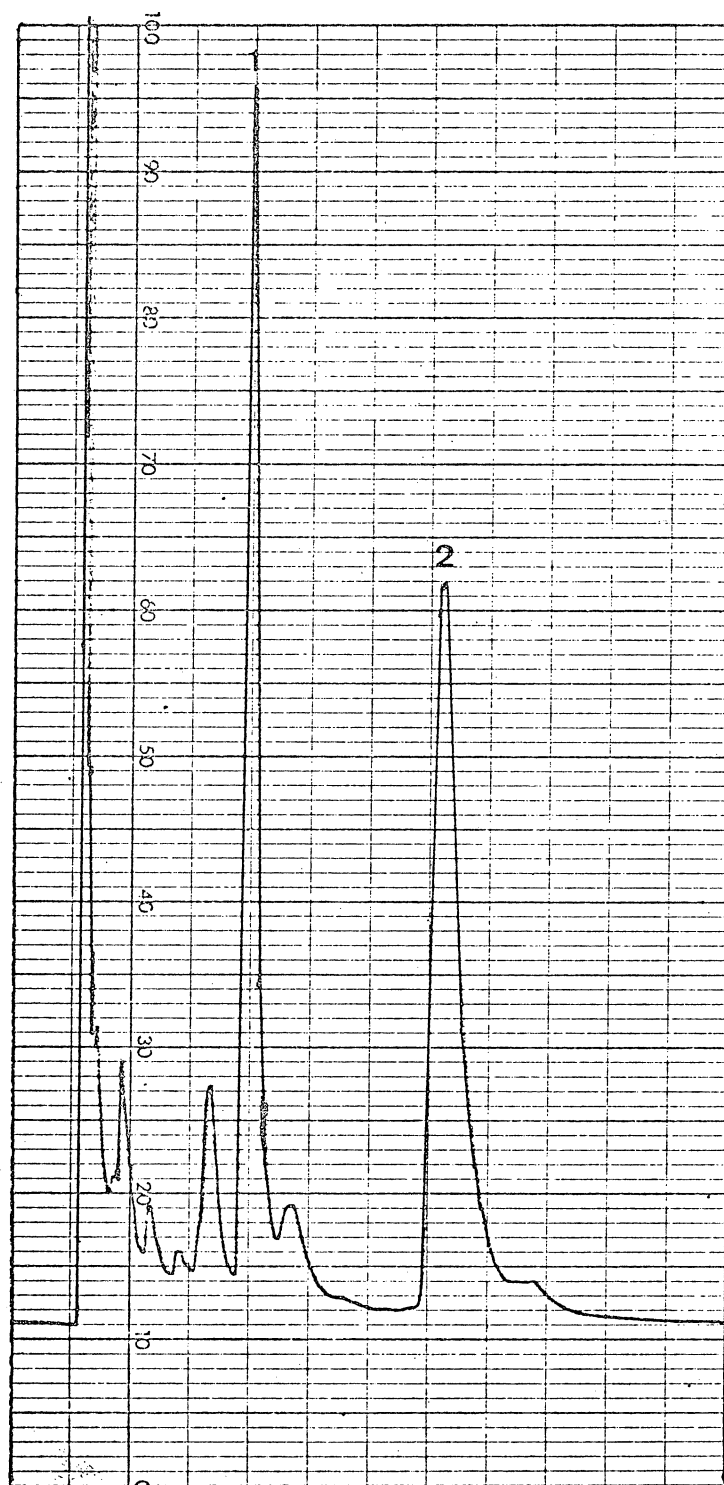


Figura VI - Análise cromatográfica (g.l.c.) do ácido aldobiosônico isolado da fração hemicelulósica GA<sub>8</sub>. A cromatografia foi realizada na coluna A, após metanólise, carbôxi-redução, hidrólise, redução e acetilação do dissacarídeo.  
 (1) xilitol      (2) 4-O-metil-glucitol

### 3.7 - ANÁLISE DA FRAÇÃO GB<sub>8</sub>

A fração hemicelulósica GB<sub>8</sub> mostrou-se constituída por ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose na seguinte proporção: 1:2,2:28,80:1,27:0,86:4,93 (Tabela IV). É provável que a presença de ramnose e galactose nesta fração representem contaminação por material péctico. Quando submetida à eletroforese em fita de acetato de celulose, a hemicelulose GB<sub>8</sub> apresentou, embora difusa, apenas uma banda. A filtração em gel mostrou a presença de um único pico, conforme mostra a Figura VII. A absorção observada na região de 280 nm pode ser atribuída à presença de grupos agliconas, provavelmente lignina, associados ao polissacarídeo. É conhecido o fato que polissacarídeos são excluídos por filtração em gel devido a formação de agregados moleculares em solução aquosa (32), não sendo portanto, uma técnica usualmente empregada para a determinação do peso molecular de hemiceluloses. Desta forma, a filtração em gel teve por objetivo, apenas verificar a homogeneidade da amostra em análise.

O grau de polimerização encontrado para este polissacarídeo foi de 69 e o consumo de m-período de sódio foi de apenas 0,67 moles/unidades de açúcar (Figura XVII).

#### 3.7.1 - Fracionamento da hemicelulose GB<sub>8</sub>

Muitos são os métodos utilizados para o fracionamento de hemiceluloses. Normalmente, a hemicelulose B, é constituída por polímeros lineares e ramificados e seu fracionamento pode ser realizado, por exemplo, através da complexação com iodo (70). DOROSO (59), analisando a hemicelulose B isolada do caule de M. bracaatinga obteve, através deste procedimento, uma fração linear (B<sub>8</sub>L) e uma fração ramificada (B<sub>8</sub>R), com rendimento e composição característicos. WENZEL (184) utilizou o Cetavlon (brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil-amônio) para separar polissacarídeos neutros e ácidos da hemicelulose B de folhas de café. A fração neutra foi, posteriormente, subme-

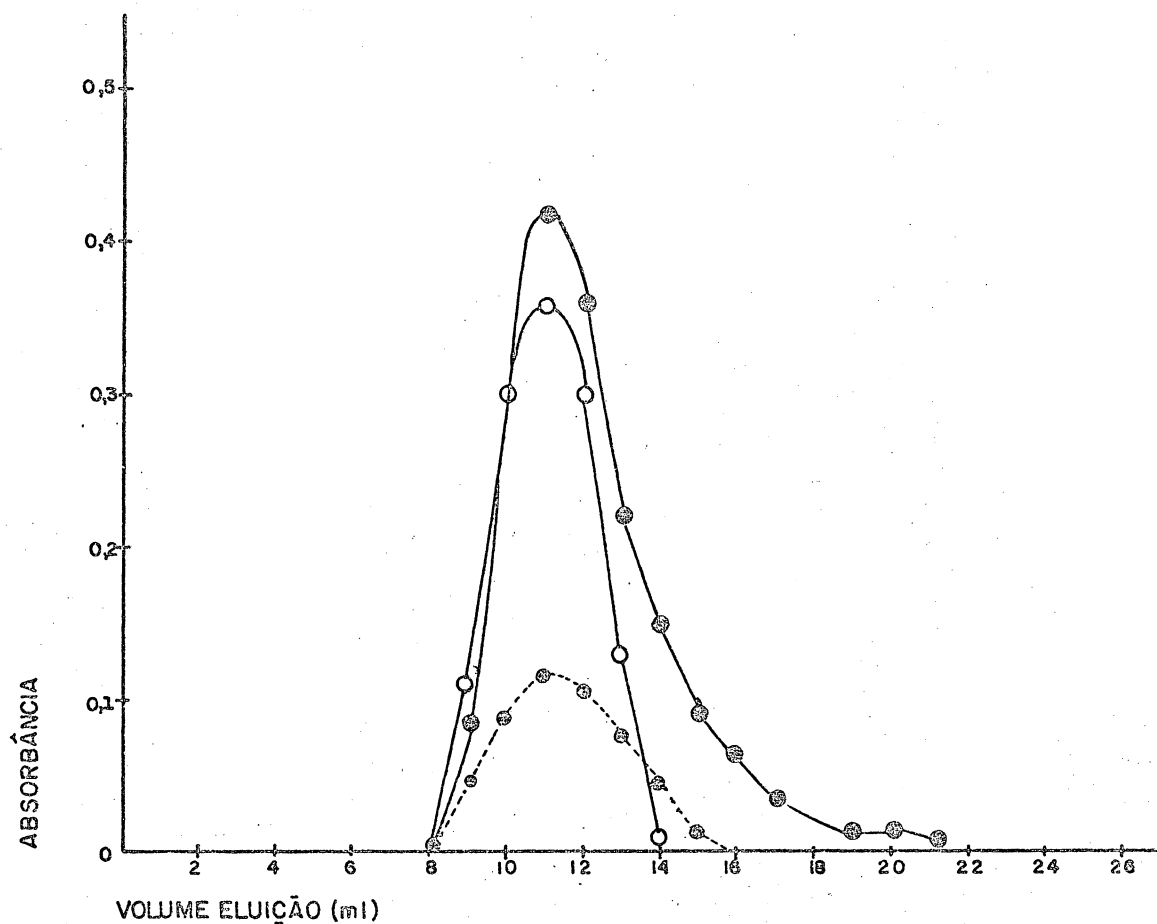


Figura VII - Filtração em gel da fração  $GB_8$ .

A cromatografia foi realizada em coluna de Bio-Gel A 0,5m (41,0 x 1,0 cm di). A eluição foi feita com água e alíquotas de 1,0 ml coletadas em coletor automático de frações, com velocidade de fluxo de 5,0 ml/h. As absorvâncias foram determinadas a 625 nm para o Blue Dextran (o-o-o); a 480 nm (●-●-●) e 280 nm (●- - -●- - -●) para a fração polissacáridica  $GB_8$ .

tida ao fracionamento com iôdo, quando foi obtida uma fração ramificada, rica em arabinose, galactose e glucose e uma fração linear constituída, principalmente, por xilose e glucose.

WOOLARD e RATHBONE (187, 188) obtiveram, após o fracionamento da hemicelulose B de casca do grão de sorgo em DEAE-Celulose, 13 frações com características estruturais distintas. O mesmo procedimento foi empregado por WANKHEDE e colaboradores (181), para o fracionamento da hemicelulose B isolada de endosperma de Arachis hypogea. Tendo em vista estes aspectos, bem como a composição da hemicelulose GB<sub>8</sub>, submeteu-se este polissacarídeo ao fracionamento em coluna contendo DEAE-Celulose (forma Cl<sup>-</sup>), de acordo com o procedimento descrito em materiais e métodos (Sec. 2.2.7.2).

Inicialmente, a eluição foi feita com água deionizada (300 ml) e a fração obtida, contendo manose e glucose na proporção de 1:5,2, foi designada PSN. A eluição foi prosseguida com NaCl 0,1M (1200 ml), NaCl 0,25M (700 ml), NaCl 0,5M (300 ml) e com NaCl 1,0M (300 ml). As frações obtidas, constituídas basicamente por xilose, foram denominadas PSX<sub>1</sub>, PSX<sub>2</sub> e PSX<sub>3</sub>, respectivamente. A fração obtida pela eluição com NaCl 1,0M representou menos de 1% da fração original e foi desprezada. A seguir, a eluição foi feita com solução de NaOH 0,05M (700 ml), obtendo-se a xilana designada PSX<sub>4</sub> e com NaOH 0,2M (350 ml), cuja fração foi denominada PSX<sub>5</sub>.

A Figura VIII mostra o perfil de eluição da hemicelulose GB<sub>8</sub> e a Tabela VIII o rendimento e a composição de cada fração obtida.

Conforme pode ser verificado na Tabela VIII, o rendimento obtido após o fracionamento da fração hemicelulósica foi de apenas 73,58%, sendo que 26,42% da fração original ficou adsorvida na resina. Esta fração, bastante corada, não foi deslocada quando a solução de NaOH 0,5M foi passada através da coluna. Foi verificado que a adsorção de polímeros sobre fibras de celulose é grandemente influenciada por uma série de fatores, como a estrutura do polissacarídeo, a concentração, o pH da solução e temperatura, entre outros. Por exemplo, polímeros lineares de baixo peso molecular e polímeros ramificados

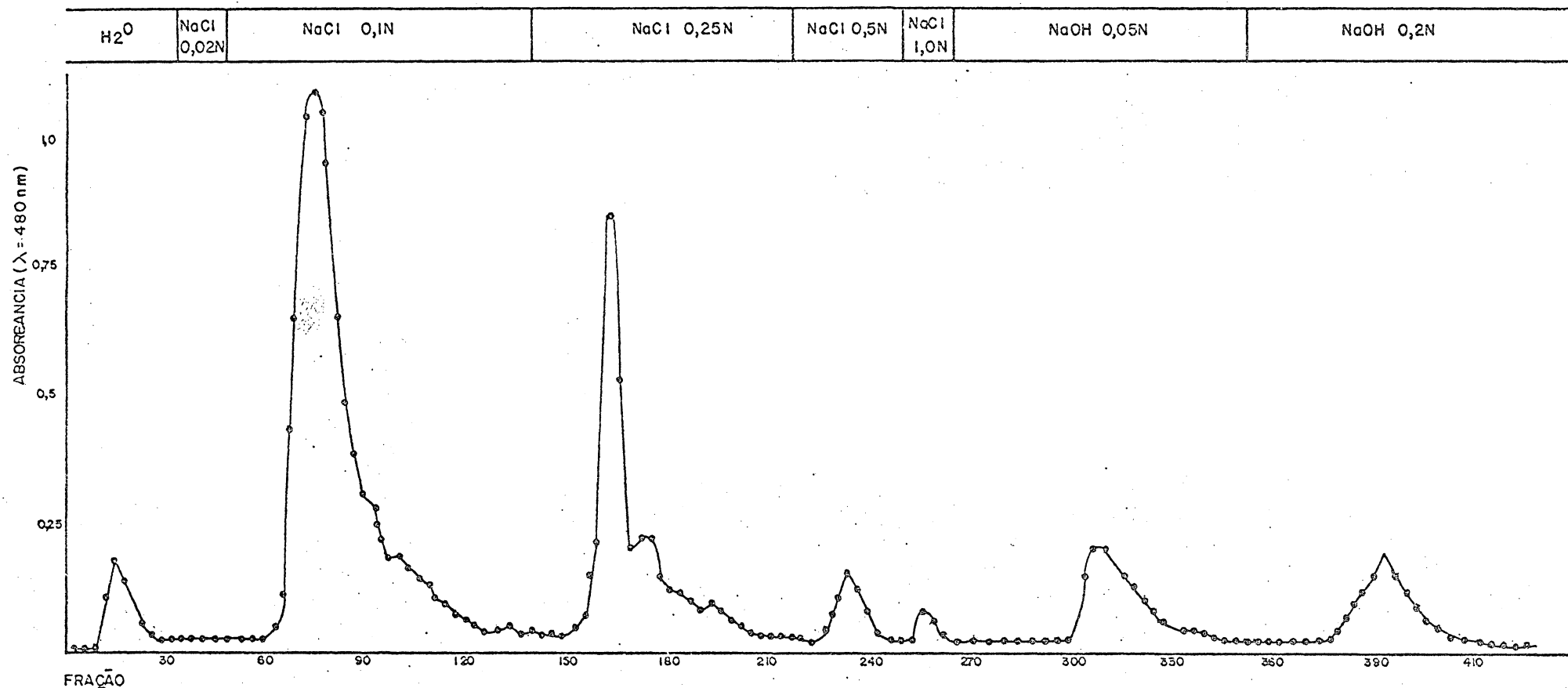


Figura VIII - Diagrama de eluição da Fração GB<sub>8</sub> em DEAE-Celulose

A amostra (200 mg) foi aplicada em coluna de DEAE-Celulose, forma Cl<sup>-</sup> (35,0 x 2,5 cm d.i.). A eluição foi realizada com água, NaCl 0,1M; NaCl 0,25M; NaCl 0,5M; NaCl 1,0M; NaOH 0,05M e NaOH 0,2M (Stepwise) e a velocidade de fluxo mantida em 60 ml/h. As alíquotas coletadas (10 ml) foram analisadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

Tabela VIII - Composição das frações obtidas pelo fracionamento em coluna de DEAE-celulose da fração hemicelulósica GB<sub>8</sub>.

Fração	Rendimento <sup>a</sup> (%)	Monossacarídeos <sup>b</sup>					Ácido <sup>c</sup>	
		Ramnose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	Urônico
PSN	4,05	-	-	-	16,19	-	83,81	-
PSX <sub>1</sub>	41,95	1,21	tr	94,09	-	2,52	2,18	16,89
PSX <sub>2</sub>	11,39	3,65	2,64	78,37	-	9,53	5,81	27,90
PSX <sub>3</sub>	2,78	7,28	1,68	65,06	2,65	5,38	17,95	34,32
PSX <sub>4</sub>	6,77	3,81	1,01	77,22	3,66	4,71	9,59	15,81
PSX <sub>5</sub>	6,64	-	-	96,30	-	-	3,70	15,18

<sup>a</sup> - Rendimento baseado no total da fração GB<sub>8</sub>

<sup>b</sup> - Determinado por g.l.c., na forma de acetatos de alditóis

<sup>c</sup> - Valores determinados pelo método do carbazol (28), corrigidos pelo fator 0,235

são retidos mais frouxamente que os lineares de maior peso molecular. O acréscimo de grupos acídicos na molécula do polímero também aumenta a adsorção do mesmo sobre a resina de DEAE-Celulose (119). Foi observada adsorção irreversível de xilanas sobre celulose e DEAE-Celulose (33). CLAYTON e PHELPS (49) ao estudarem a adsorção de xilana e glucomanana sobre  $\alpha$ -celulose de fibras de madeira, concluíram que a adsorção é de natureza física. A baixa adsorção de xilana acídica observada foi atribuída à presença dos grupos carboxílicos, os quais influenciam o grau de hidratação da xilana, limitando sua adsorção.

A análise do polissacarídeo original e das frações obtidas mostra que a fração adsorvida contém cerca de 46% da ramnose, 92,5% da arabinose, 16,5% da xilose, 70% da manose e 49,5% da glucose presentes na fração original (GB<sub>8</sub>). Com relação ao ácido urônico apenas 67,4% do mesmo foi recuperado em relação à fração original. Assim, a fração adsorvida parece ser constituída por polímeros acídicos, como uma 4-O-metil-glucuronoxilana e por polímeros neutros, possivelmente uma glucomanana e uma glucana, já que a proporção observada entre a manose e a glucose (1,41:1,0) é menor que a razão esperada para este grupo de hemiceluloses (2:1). Parte da glucose poderia, então, ser originada de uma glucana, uma vez que estes dois polímeros (glucomanana e glucana) foram isolados da fração GB<sub>8</sub>, conforme será visto adiante.

### 3.7.2 - Filtração em Gel e fracionamento do polissacarídeo PSN.

Para uma análise mais detalhada, foram escolhidas as frações PSN, devido a sua composição e a fração PSX<sub>1</sub> que é obtida em maior proporção.

A homogeneidade das amostras foi verificada por cromatografia em Bio-Gel P-30. A fração PSX<sub>1</sub> foi eluída em um único pico simétrico, com volume de eluição superior ao do padrão de Blue-Dextran, indicando que o peso molecular deste polímero situa-se na faixa de 2.500 a 40.000 daltons.

A filtração em gel da fração neutra -PSN- constituída por glucose e manose em proporção incomuns (5,2:1,0), evidenciou a presença de dois picos. O pico maior (I) foi eluído com pico máximo de eluição igual ao Blue Dextran ( $V_0=8,0$  ml) e o pico menor (II), eluído com pico máximo de eluição no volume de 16,5 ml. Esta fração foi, então, fracionada em coluna contendo Bio-Gel P-100, onde o mesmo comportamento acima foi observado (Figuras IX e X).

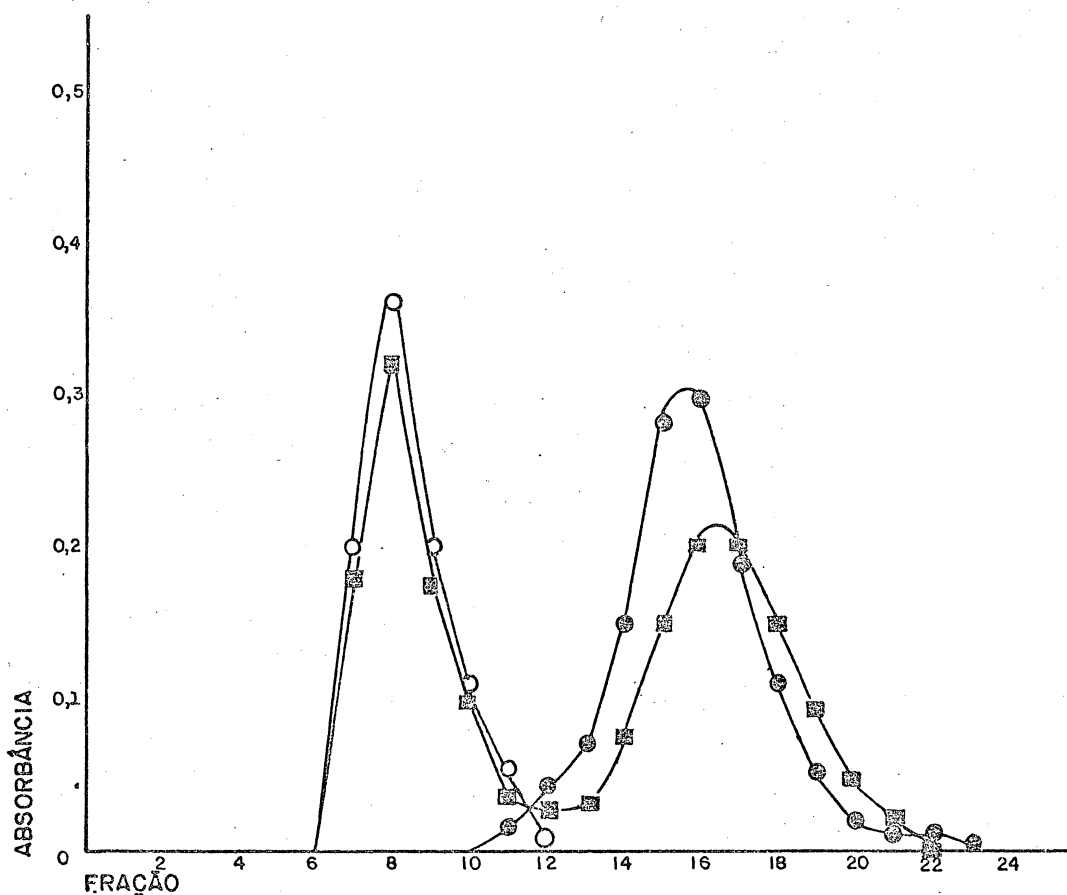


Figura IX - Filtração em gel das frações polissacarídicas PSN e PSX<sub>1</sub>

A cromatografia foi feita em coluna contendo Bio-Gel P-30 (33,5 x 1,0 cm d.i.), previamente calibrada com Blue-Dextran (○-○-○). Frações de 1,0 ml foram coletadas, com velocidade de escoamento de 8,0 ml/h. As absorvâncias das frações polissacarídicas PSN (□-□-□) e PSX<sub>1</sub> (○-○-○) foram determinadas a 480 nm.

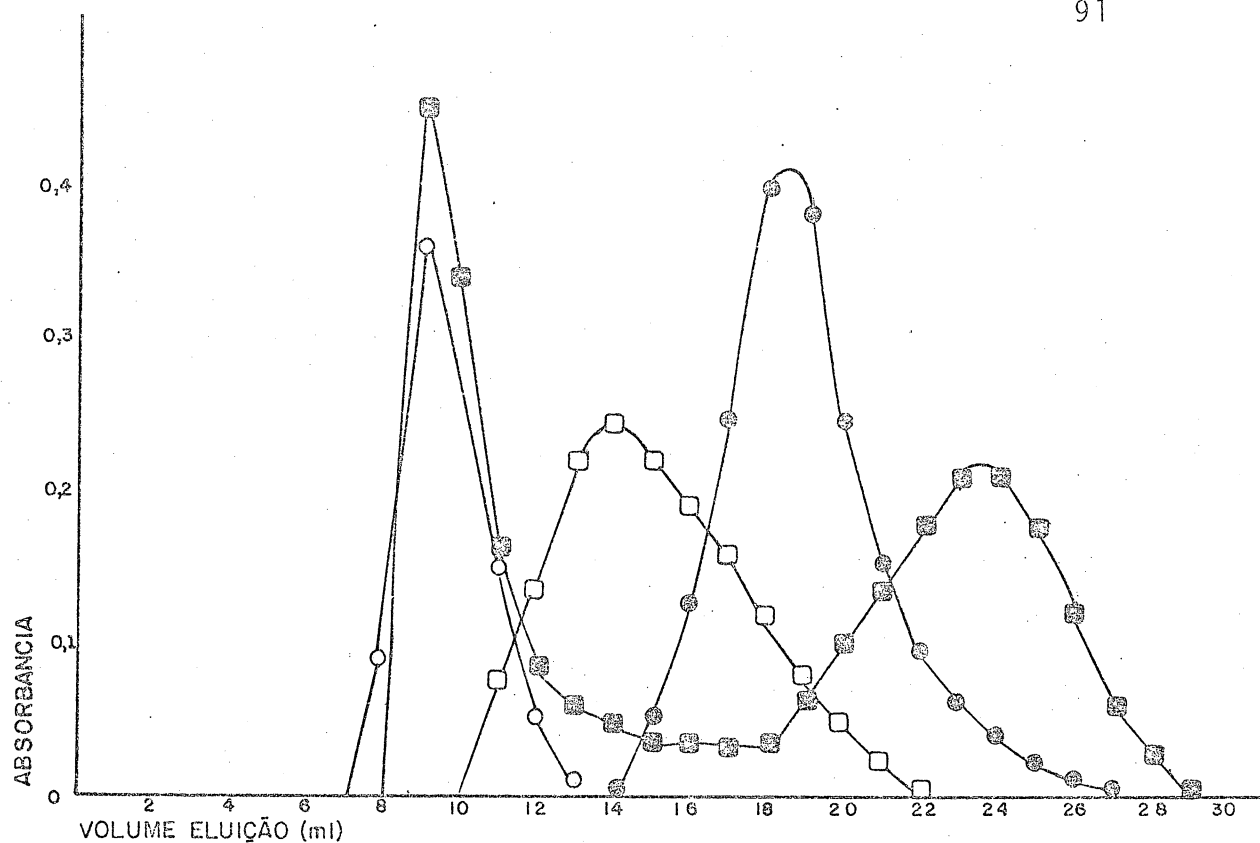


Figura X - Fracionamento do polissacarídeo PSN e PSX<sub>1</sub>  
 A fração PSN (●-●-●) foi aplicada em coluna de Bio-Gel P-100 (32,0 x 1,0 cm d.i.), calibrada com Blue-Dextran (○-○-○). A eluição foi feita com água, mantendo-se a velocidade de fluxo em 5,0 ml/h. Alíquotas de 1,0 ml foram coletadas e analisadas pelo método fenol-ácido sulfúrico. O mesmo procedimento foi repetido para a fração polissacarídica PSX<sub>1</sub> (○-○-○) e para o padrão de Dextran (□-□-□) de peso molecular igual a 20.800 daltons.

As frações correspondentes ao pico I e II foram analisadas por g.l.c, após concentração, hidrólise, redução e acetilação e designadas por PSG e PSGM, respectivamente. A Figura XI mostra a composição da fração PSN e a Figura XII das frações PSG e PSGM, obtidas após o fracionamento em Bio-Gel P-100.

Desta forma, a fração neutra, após o fracionamento da hemicelulose GB<sub>8</sub> por cromatografia em coluna de DEAE-Celulose, é constituída por uma glucana (PSG) e uma glucomanana (PSGM), onde a razão manose: glucose é de 1,7:1,0.

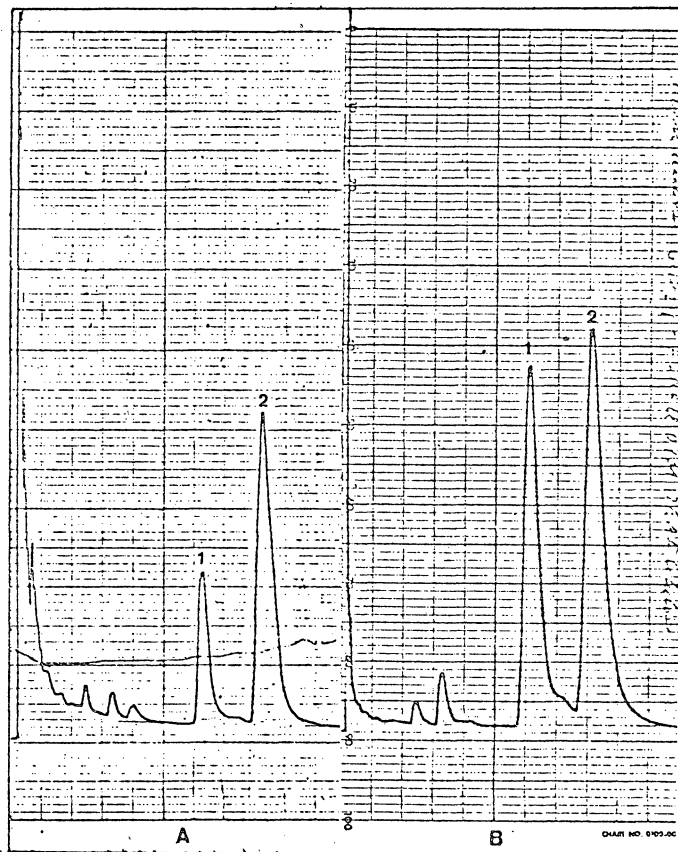


Figura XI - Análise cromatográfica por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos após hidrólise, redução e acetilação de polissacarídeo PSN isolado pelo fracionamento das hemiceluloses GB<sub>8</sub> (A) e GB<sub>24</sub> (B) em coluna de DEAE-Celulose. (Coluna A) Componentes: (1) manitol e (2) glucitol

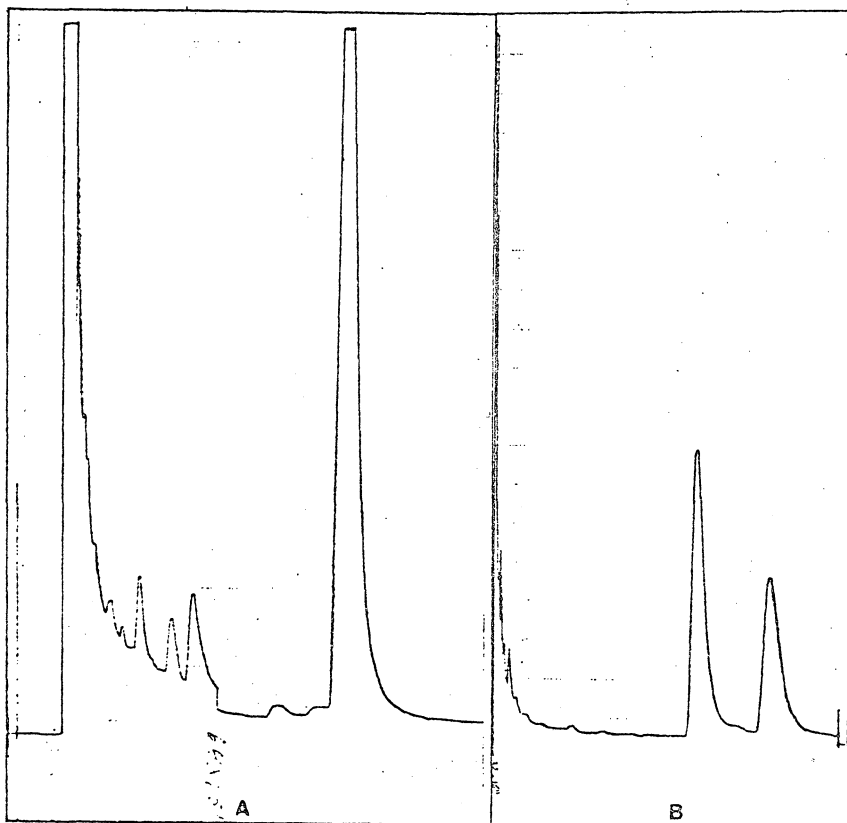


Figura XII - Cromatografia por g.l.c. (Coluna A) da fração PSN, após fracionamento em coluna de Bio-Gel P-100. A análise dos acetatos de alditóis correspondentes aos Picos I e II revelaram a presença de uma Glucana (A) e uma Glucomanana (B), respectivamente

Assim, a alta proporção de glucose na fração original é explicada, já que as glucomananas isoladas de madeiras contêm mais manose do que glucose (16, 170), embora glucomananas de sementes apresentando maiores conteúdos de glucose do que manose tenham sido isoladas (174).

A possibilidade de que a glucana seja produto de contaminação do material pela DEAE-Celulose é totalmente excluída, uma vez que todos os cuidados foram tomados durante o preparo e a eluição da coluna. A realização de vários experimentos de eluição da hemicelulose GB<sub>8</sub> em coluna de DEAE-Celulose mostrou os mesmos resultados anteriormente descritos, sendo observada apenas pequenas variações quanto ao rendimento de cada fração. Porém, a possibilidade de que a glucana seja celulose degradada não é totalmente descartada. Segundo ASPINALL (16) a glucana que acompanha glucomananas isoladas por extração alcalina provavelmente corresponde à celulose degradada.

Foi isolada da fração hemicelulósica GB<sub>24</sub>, através de fracionamento em coluna de DEAE-Celulose, uma fração neutra constituída por 43,15% de manose e 56,83% de glucose, representando 8,9% da fração hemicelulósica. Não foi realizada uma análise mais detalhada desta fração, mas pela sua composição, parece ser constituída também por uma glucana e uma glucomanana, semelhante ao encontrado para fração GB<sub>8</sub> (Figura XI).

### 3.7.3 - Análise das frações PSG, PSGM e PSX<sub>1</sub>.

A Tabela IX apresenta os dados obtidos após hidrólise, redução, acetilação e análise por g.l.c. dos seguintes polissacarídeos metilados: glucana (PSG), glucomanana (PSGM) e da xilana (PSX<sub>1</sub>) isolada por cromatografia em DEAE-Celulose, durante a eluição com NaCl 0,1M.

Tabela IX - Composição do hidrolisado obtido das frações PSG, PSGM e PSX<sub>1</sub> permetiladas.

Acetato de alditóis	PSG		PSGM		PSX <sub>1</sub>	
	T <sup>a</sup>	%	T <sup>a</sup>	%	T <sup>a</sup>	%
2,3,4-tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	-	-	-	-	0,66	3,65
2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol e/ou <u>D</u> -manitol.	1,03	4,25	1,0	9,74	-	-
2,3-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	-	-	-	-	1,55	86,19
2,3,6-tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -manitol	2,26	tr	2,25	47,03	-	-
2,3,6-tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	2,57	95,75	2,57	43,23	2,6	tr
mono- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	-	-	-	-	2,92	10,17
não identificado	3,8	-	3,79	-	3,82	

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

tr - traços

## 3.7.3.1 - Fração PSG.

A análise dos produtos de metilação da fração PSG sugere que a glucana isolada da fração hemicelulósica GB<sub>8</sub> é constituída por unidades de glucopirano-se, unidas por ligações do tipo (1 → 4), visto que o principal produto obtido foi o derivado 2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol. A proporção igual a 1:22,5 entre os derivados tetra-O-metil-glucitol e tri-O-metil-glucitol sugere que a glucana apresenta uma estrutura linear, com um grau médio de polimerização em torno de 24 unidades de glucose. De acordo com o observado, a partir da filtração em gel, o peso molecular deste polissacarídeo seria maior que 100.000 daltons, ou seja, o polímero apresentaria um  $\overline{Dpn}$  em torno de 600. O mais provável é que a exclusão do polissacarídeo observada experimentalmente, seja própria da formação de agregados moleculares, semelhante ao que é verificado para xilanas.

O aparecimento de pequenas proporções de um derivado com  $T = 2,25$  foi atribuído à contaminação da fração PSG pela glucomanana.

As glucanas não celulósicas isoladas de parede celular vegetal apresentam ligações do tipo  $\beta(1 \rightarrow 3)$  e  $\beta(1 \rightarrow 4)$  em proporções que variam com o órgão e o estágio de desenvolvimento do vegetal analisado (178). A possibilidade de ligações do tipo (1 → 3) para a glucana isolada de caule de S. parahybum ficou excluída, pois não foi observado o derivado esperado a partir deste tipo de ligação, o 2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol ( $T=1,95$ ). Recentemente, CORREA (55) isolou uma glucana com DMSO do caule de S. parahybum previamente delignificado. A análise do polissacarídeo metilado mostrou que é linear, apresentando  $\overline{Dpn} \approx 15$ . O polissacarídeo foi degradado pela  $\alpha$ -amilase, indicando que se trata de uma  $\alpha$ -glucana (confirmado por  $^{13}\text{C}$ -n.m.r.), provavelmente amido.

Na análise dos derivados metilados desta fração polissacarídica foi observado o componente com  $T = 3,8$  o qual aparece em todas as análises cromatográficas de derivados metilados efetuadas (Tabela VII e IX). Para esta fração polissacarídica, este poderia repre

sentar o 2,6-di-O-metil-D-glucitol (T=3,83). A presença deste derivado indicaria a possibilidade de pontos de ramificação na cadeia, onde unidades de D-glucose estariam ligadas ao C-3 das unidades da cadeia principal. Este componente, aparece em proporção três maior que o derivado tetra-metilado, o que contrapõe para o proposição de uma estrutura ramificada para esta glucana embora, discrepâncias deste tipo, tenham sido explicadas por demetilação do derivado tetra-metilado, alta volatilidade do mesmo ou ainda a falta de sensibilidade do detector a este composto, conforme citado por HENDERSON e HAY (89).

Estes autores isolaram de folhas de Berberis vulgaris uma  $\beta$ -glucana apresentando ramificações através das posições C-3 (um ponto de ramificação a cada 6 unidades de glucose) e C-6 (um ponto a cada 29 unidades de glucose da cadeia principal).

Levando-se em consideração os fatos anteriormente mencionados, ou seja: que o componente com T = 3,8 pode ser um artefato; que a proporção do derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil encontrada não explica pontos de ramificação, e a falta de informações na literatura sobre glucanas de madeiras, pode-se sugerir que esta glucana apresenta estrutura linear constituída por unidades de (1  $\rightarrow$  4) glucopiranoose e que esta deve fazer parte do complexo hemicelulósico de S. parahybum.

### 3.7.3.2 - Fração PSGM

Os derivados acetilados parcialmente metilados obtidos da fração PSGM foram os seguintes: 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol e/ou D-manitol; 2,3,6-tri-O-metil-D-manitol; 2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol, na proporção de 1,0:4,83:4,44, respectivamente, além de um componente com T = 3,79, com área aproximadamente a mesma do derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-hexitol (Figura XIII- a).

Estes dados levam a duas considerações: o componente com T = 3,79 corresponde ao 2,6-di-O-metil-D-glucitol e que também pode ser um artefato ou composto não relacionado a açúcar.

Se o componente com  $T = 3,79$  corresponde ao 2,6-di-0-metil-D-glucitol, a proporção entre os derivados obtidos, ou seja, tetra-0-metil-hexitol; tri-0-metil-manitol; tri-0-metil-glucitol e di-0-metil-glucitol passaria a ser, respectivamente, 1,05:5,09:4,74:1,0.

Os dados sugerem então, que a glucomana apresenta uma cadeia constituída por unidades de glucose e manose, na forma piranosídica, unidas por ligações tipo  $(1 \rightarrow 4)$ . A cadeia principal apresentaria ramificações por unidades de manose, ligadas às unidades de glucose da cadeia principal, através da posição C-3. A posição e as unidades terminais não redutoras são provenientes dos monômeros de manose, baseia-se no fato do polímero apresentar maior conteúdo de manose do que de glucose (Figura XII-b).

Em concordância com a proposição de estrutura ramificada, teríamos as proporções entre os derivados 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-manitol: 2,6-di-0-metil-D-glucitol de 1,05:1,0, além da sugestão de possibilidades das glucomanas apresentarem pontos de ramificação ou ligações  $(1 \rightarrow 3)$  (16). Nas análises realizadas em glucomanas isoladas de *P. tremuloides* (92) e de espécies de *Acer* (110, 113) a ocorrência do derivado 2,6-di-0-metil-D-glucitol verificada não foi explicada, ou foi atribuída à demetilação durante a hidrólise ou à metilação incompleta.

Levando em consideração que o componente com  $T = 3,79$  é um artefato ou composto não relacionado à açúcar, e a proporção observada entre os derivados metilados, pode ser sugerido que a glucana apresenta estrutura linear, onde as unidades de manose e glucose estariam ligadas por enlaces glicosídicos do tipo  $(1 \rightarrow 4)$ . A proporção entre os derivados tetra-metil-hexitol: tri-metil-hexitóis é de 1,0:9,3, respectivamente, o que indica que há uma unidade terminal não redutora a cada 9-10 unidades de açúcar. Considerando o polímero linear, o mesmo apresentaria um grau médio de polimerização em torno de 10 - 11. O grau médio de polimerização para estes polissacarídeos isolados de madeira dura variam de 26 a 120 (5, 170).

Segundo TIMELL (170) o  $\overline{Dpn}$  70 encontrado para glucomananas de alguns vegetais não representa o polímero nativo, pois análises posteriores evidenciaram que os mesmos apresentam  $\overline{Dpn}$  de 108 a 120, indicando a polimolecularidade destes polissacarídeos.

O peso molecular da fração PSGM situa-se entre 5000 e 20.800 daltons, conforme pode ser verificado na Figura X. A análise por g.l.c.-m.s. da fração PSGM (Figuras XIII-b, XIV e XV) mostrou os mesmos resultados anteriormente citados, ou seja: 2,3,4,6-tetra-0-metil-hexitol (9,28%), 2,3,6-tri-0-metil-manitol (46,99%), 2,3,6-tri-0-metil-glucitol (43,73%) e pequenas proporções (1%) de 2,3-di-0-metil-glucitol, provavelmente como resultado da contaminação pela glucana. Como não foi identificado nenhum derivado correspondente à di-metil-hexitóis, a primeira sugestão é descartada, indicando que o componente com  $T = a$  3,79 deve ser um artefato ou composto não relacionado à açúcar.

### 3.7.3.3 - Fração PSX<sub>1</sub>

A análise por metilação da xilana PSX<sub>1</sub>, a qual representa a principal fração polissacarídica obtida após o fracionamento da hemicelulose GB<sub>8</sub> em DEAE-Celulose, mostrou que a mesma apresenta-se constituída por unidades de xilopirranose, interligadas por ligações do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , provavelmente com configuração . A proporção do derivado tri-0-metil-xilitol sugere estrutura levemente ramificada, o que seria reforçado pelo elevado conteúdo de mono-0-metil-D-xilitol encontrado. A inconsistência entre os pontos de ramificação e resíduos terminais não redutores tem sido atribuída principalmente à presença de grupos agliconas como proteínas e lignina, conforme discutido anteriormente. O grau de polimerização determinado para esta fração foi de 82. A partir da razão molar entre os derivados metilados e do  $\overline{Dpn}$  encontrado, pode-se sugerir que a macromolécula apresenta pelo menos dois pontos de ramificação por unidades de D-xilose.

O polissacarídeo seria constituído por três unidades repetitivas, sendo que em cada uma, haveria um ponto de ramificação por D-xilose a cada 24-25 unidades de D-xilose da cadeia principal, além de, pelo menos,

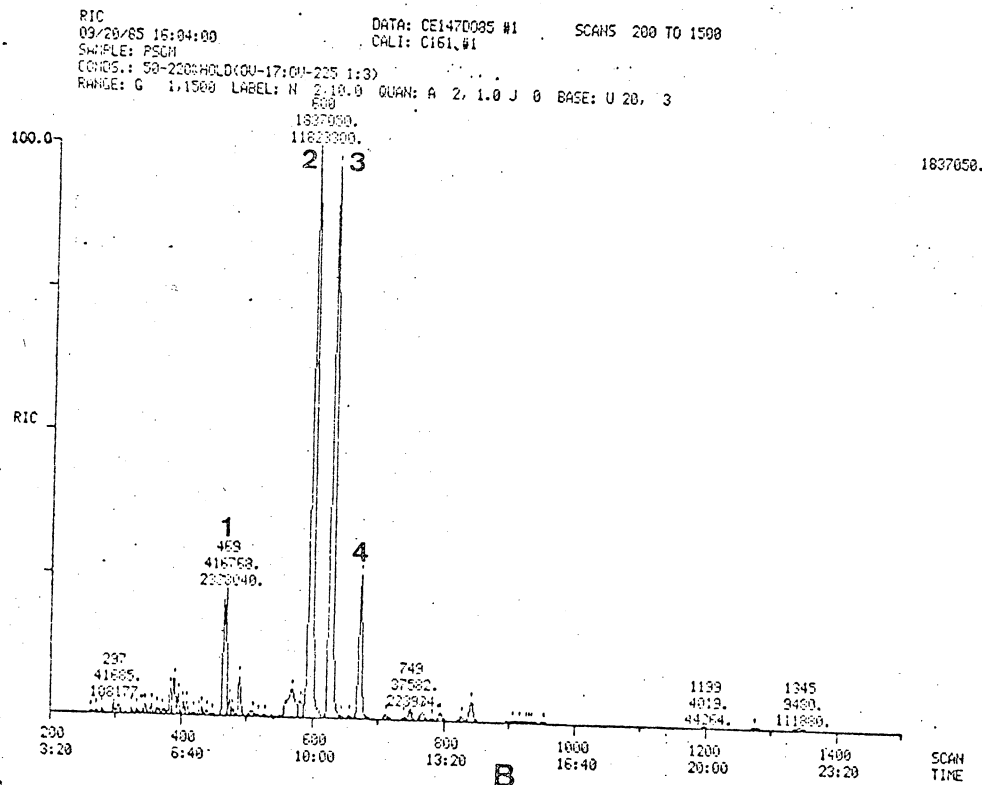
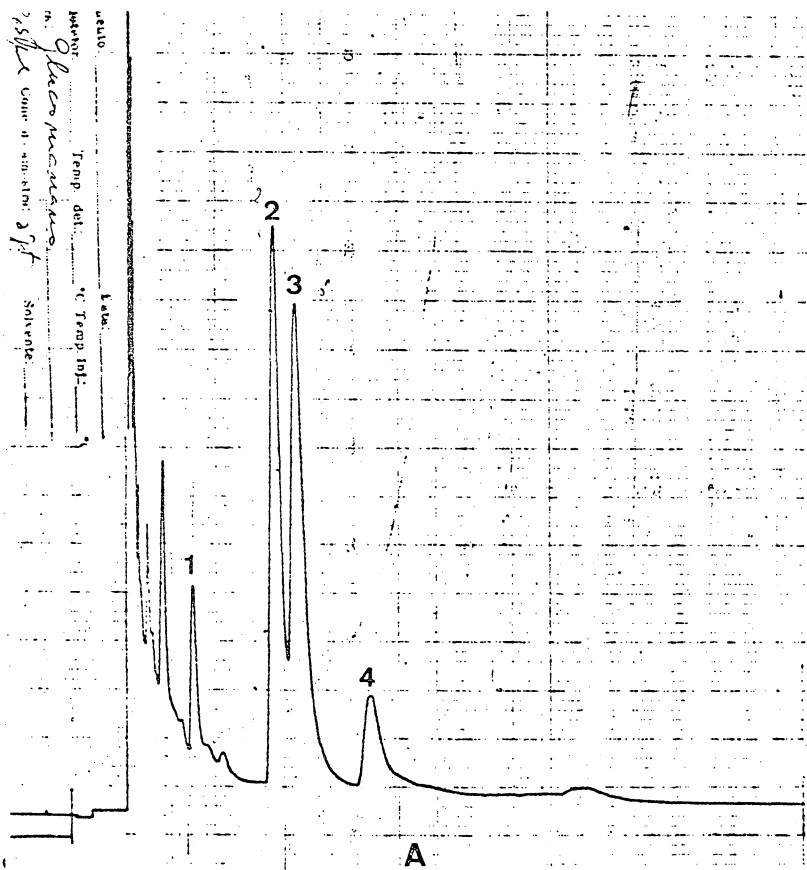


Figura XIII - Cromatogramas em g.l.c. da fração PSGM parcialmente metilada.

A - Coluna A

- (1) 2,3,4,6-tetra-0-metil-hexitol
- (2) 2,3,6-tri-0-metil-D-manitol
- (3) 2,3,6-tri-0-metil-D-glucitol
- (4) não identificado

B - Coluna C

- (1) 2,3,4,6-tetra-0-metil-hexitol
- (2) 2,3,6-tri-0-metil-D-manitol
- (3) 2,3,6-tri-0-metil-D-glucitol
- (4) 2,3-di-0-metil-D-glucitol

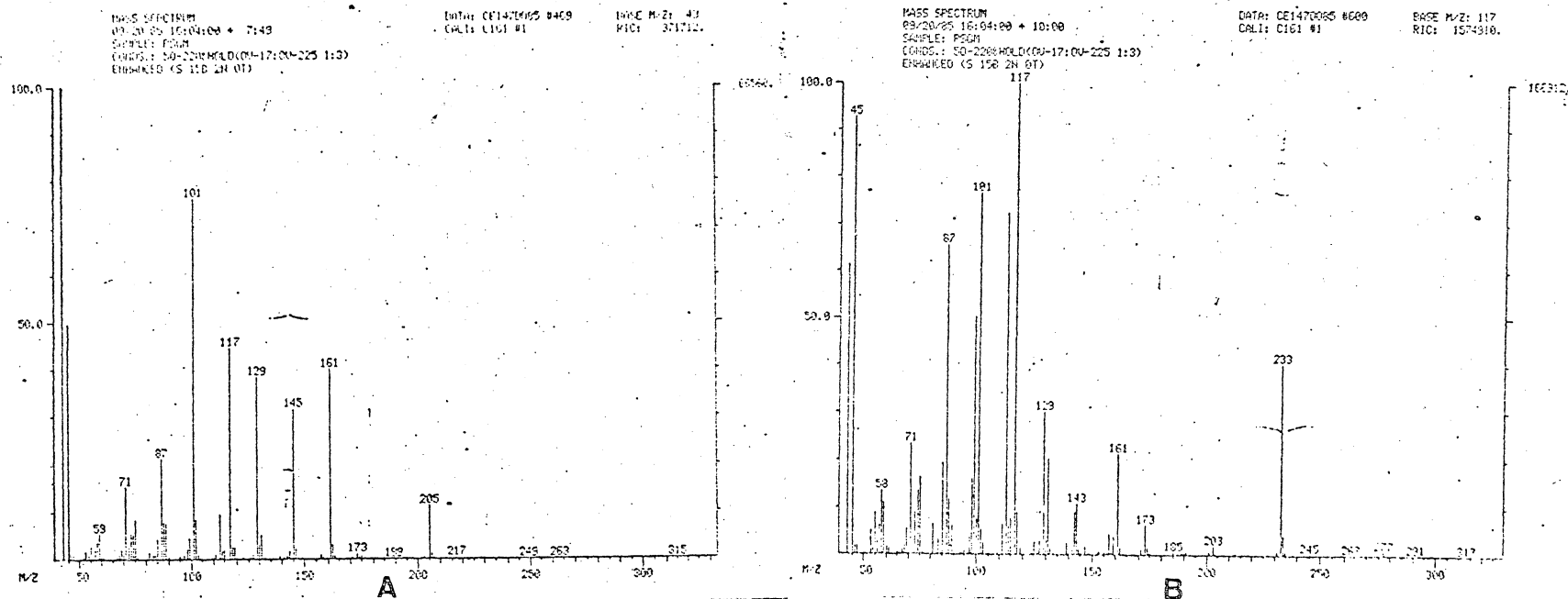


Figura XIV - Espectros de massa de:  
 A - 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-hexitol  
 B - 1,4,5-tri-0-acetil-2,3,6-tri-0-metil-manitol

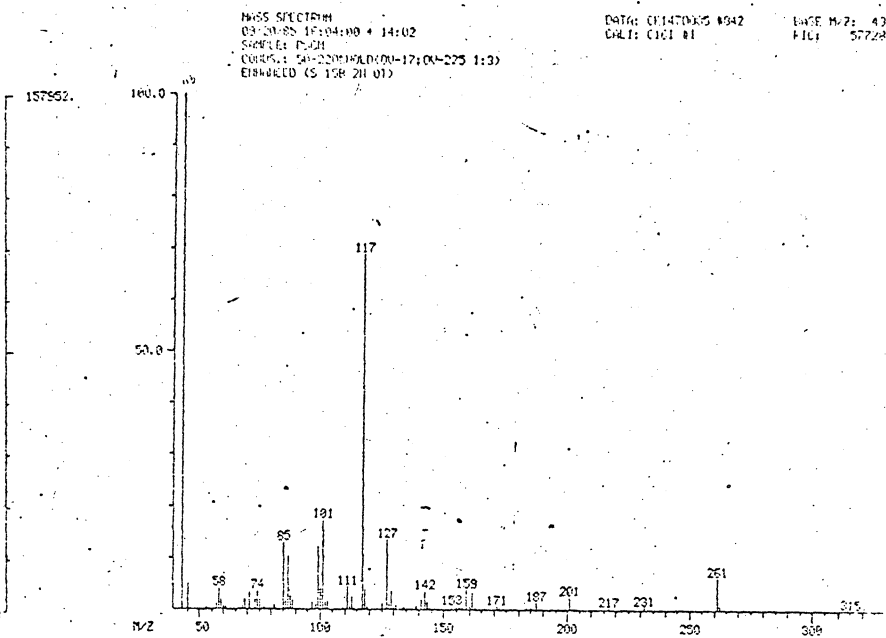
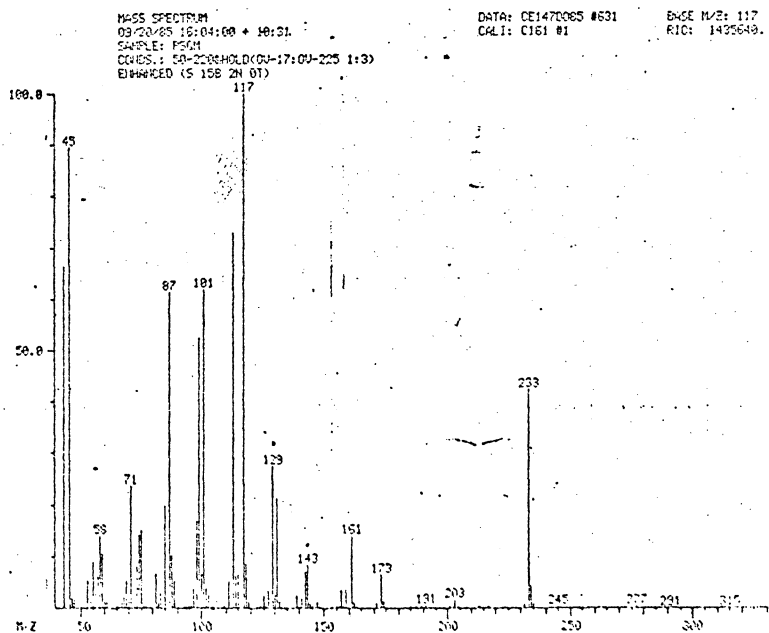


Figura XV - Espectros de massa de:

- A - 1,4,5-tri-0-acetil-2,3,6-tri-0-metil-glucitol
- B - 1,4,5,6-tetra-0-acetil-2,3-di-0-metil-glucitol

dois pontos de ramificação por outros grupos. A análise realizada não fornece dados que permitam verificar se as unidades de D-xilose ligam-se à cadeia principal através das posições C-2 ou C-3 das unidades de xilose não terminais, já que os produtos que seriam obtidos: o 2-O-mono-metil-D-xilitol (indicando ramificações na posição C-3) ou o 3-O-mono-metil-D-xilitol (indicando ramificação através de C-2) possuem o mesmo T na coluna utilizada. A sugestão de estrutura ramificada foi indicada também através da análise por degradação do polissacarídeo. Para a estrutura sugerida a partir dos dados de metilação, seria esperado um consumo de m-periodato e liberação de ácido fórmico de 0,915 e 0,036 mol/moles de pentose, respectivamente. O consumo observado (Figura XVI) foi de 0,74 moles/mol e o ácido fórmico liberado, determinado pelos métodos de BACKER & SOMERS (18) foi de 0,0878 mol/mol de pentose e pelo de titulação foi de 0,125 moles/mol de pentose anidra.

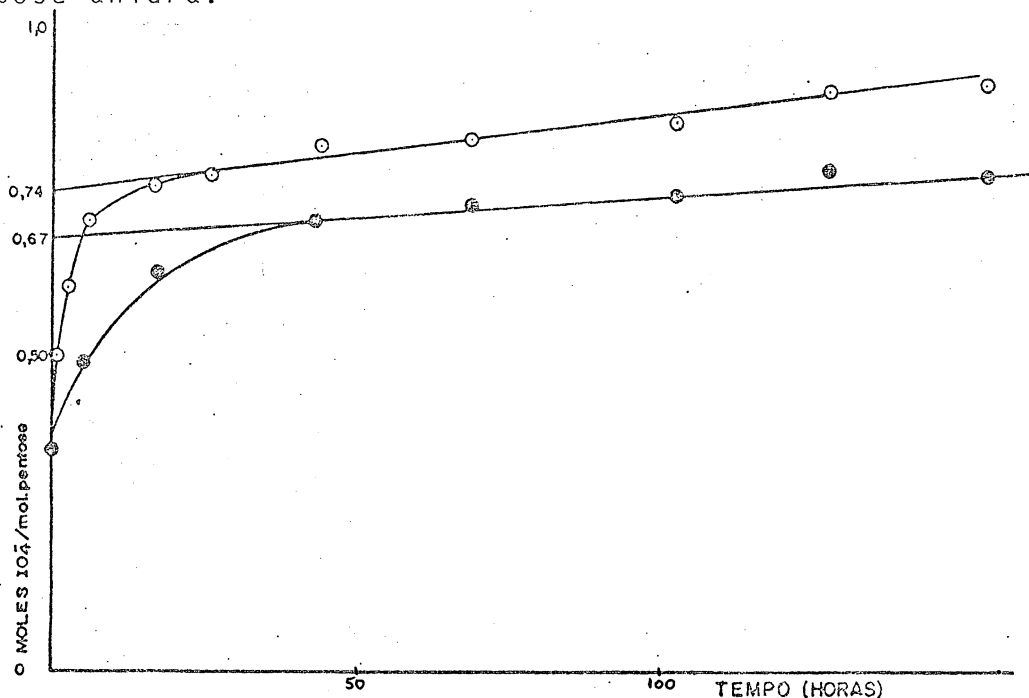


Figura XVI - Determinação do consumo de periodato de sódio das Frações GB<sub>8</sub> e PSX<sub>1</sub>. As frações polissacarídicas GB<sub>8</sub> (●-●-●) e PSX<sub>1</sub> (○-○-○) contendo 40 e 60 mg de açúcar, respectivamente, foram submetidas à oxidação com periodato de sódio (c.f. 0,05M), à temperatura ambiente. A diferentes intervalos de tempo, alíquotas de 1,0 ml das soluções oxidantes foram retiradas para a determinação do consumo de periodato pelo método do tiosulfato de sódio. Os valores obtidos foram extrapolados ao tempo zero.

A partir do consumo observado, verifica-se que  $0,175$  moles de  $IO_4^-$  não foram consumidos, o que representa que cerca de 14 unidades de D-xilose do polímero não foram oxidadas. A análise dos produtos obtidos após a degradação do polissacarídeo mostrou que a fração dialisada contém 77,25% de glicerol, produto esperado a partir de unidades de D-xilose unidas por ligação (1→4) e 22,75% de xilitol, além de componentes não identificados. A proporção de xilitol encontrada indica que aproximadamente 18 unidades de xilose apresentam pontos de ramificação, proporção maior do que o esperado a partir do verificado após metilação. Estes dados, junto ao elevado conteúdo de mono-O-metil-xilitol observado, levam à proposição de pontos de ramificação por xilose, em proporções maiores do que o observado através dos dados de metilação, (considerando os resultados obtidos a partir da degradação do polissacarídeo) e, ramificações por grupos agliconas, conforme anteriormente citados. Considerando-se que o ácido urônico que se liga à cadeia principal da xilana é o ácido 4-O-metilglucurônico, este poderia ser oxidado, o que acarretaria um aumento no consumo de m-periodato de sódio observado. Se alguns destes resíduos corresponder ao ácido glucurônico, (cuja possibilidade de ocorrência neste vegetal será levantada adiante) o alto conteúdo de ácido fórmico encontrado poderia ter em parte, origem neste açúcar. A ocorrência de xilanas ramificadas de madeira foi proposta inicialmente por DULTON & UNRAU (63). DOROSO (73), analisando a hemicelulose B isolada do caule de M. bracaatinga, obteve duas frações polissacarídicas  $B_8L_1$  ( $D\bar{p}n = 43$ ) e  $B_8L_2$  ( $D\bar{p}n = 82$ ). A fração  $B_8L_1$  consiste de unidades de  $\beta(1 \rightarrow 4)$  e  $\beta(1 \rightarrow 3)$  D-xilopiranosose. Os resultados encontrados por metilação e por degradação do polissacarídeo sugeriram uma estrutura ramificada para esta xilana isolada de bracaatinga, com substituição no carbono C-3 das unidades de xilose da cadeia principal.

A partir, portanto, dos resultados encontrados, a estrutura geral proposta para a xilana obtida por fracionamento da hemicelulose B ( $GB_8$ ) de S. Parahybum está representada na Figura XVII.



lizados apenas os oligossacarídeos  $Fa_2$  e  $Fa_3$  obtidos em maiores quantidades. Após sucessivas metanólises e carboxi-reduções, as frações foram hidrolisadas e analisadas por CCD ( solventes IV e VI) e por g.l.c. (coluna A) após conversão a acetatos de alditóis.

A análise cromatográfica da  $Fa_3$  no solvente IV revelou a presença de 4 componentes, com os seguintes valores de  $R_{xil}$  1,37; 1,0; 0,63 e 0,5. O componente com  $R_{xil}$  1,37 possivelmente corresponde ao 4-O-metil-glucose. Neste solvente, a glucuronolactona apresenta  $R_{xil}$  1,40. No solvente VI, foi observado um outro componente, com  $R_f$  igual ao da glucuronolactona (Figura XXI). O componente com  $R_{xil}$  0,50 corresponde, provavelmente, à glucose.

A fração  $Fa_3$  é constituída por xilitol (40,5%) e 4-O-metil-glucitol (59,5%) além de manitol, glucitol, galactitol e grandes proporções de um componente não identificado, possivelmente de mesma origem ao relatado por ZERMIANI (190), que sugeriu que este este já relacionado à lignina (Figura XXII). Para esta fração, identificada como sendo o ácido aldobiurônico, seriam esperadas proporções equimoleculares de xilitol e 4-O-metil-glucitol. A maior proporção do derivado metilado sugere que o ácido 4-O-metil glucurônico poderia estar ligado também às unidades de hexose. A elevada proporção de glucitol observada pode ter sua origem a partir de unidades de glucose ou do ácido glucurônico. A possibilidade que parte da xilose tenha sido degradada durante os processos empregados não é descartada, pois este fato foi observado à partir de tentativas de carboxi-redução da fração hemi-celulósica  $GB_8$  (resultados não apresentados).

A análise por g.l.c. mostrou que a fração  $Fa_2$  é constituída por xilitol e 4-O-metil-O-glucitol na proporção de 1,7:1, além de manitol (4,6%), glucitol (11,7%) e traços de galactitol. Quando estes componentes são quantificados, a proporção entre os derivados xilitol: manitol: glucitol: 4-O-metil-glucitol é igual a 11:1:2,5:7,0, respectivamente (Figura XXIII). A presença de galactitol indica provável contaminação por material pético. A presença de glucitol pode sugerir que algumas unidades de ácido 4-O-metilglucurônico poderiam ligar-se

à glucose ou que o mesmo é originado a partir do ácido glucurônico, o qual poderia estar associado às hemiceluloses, juntamente com seu 4-O-metil-éster. Apesar da análise cromatográfica em CCD e CP não ter evidenciado a presença de açúcares neutros, a possibilidade dos mesmos estarem contaminando a fração ácida não é desprezada. Em função das proporções encontradas 1,7:1,0 (xilitol: 4-O-metil-glucitol), a fração Fa<sub>2</sub> foi caracterizada como o ácido aldotriurônico. Embora o ácido glucurônico seja encontrado basicamente em plantas anuais, sua ocorrência em madeiras já foi relatada (63). ROSA (145) isolou de Acacia mollissima, ácidos aldobiurônicos constituídos por xilose e ácido 4-O-metilglucurônico e, xilose e ácido glucurônico, em proporção aproximada de 1:1, sugerindo a necessidade de um estudo mais cuidadoso a respeito do assunto.

Os oligossacarídeos ácidos isolados do caule de guapuruvu, possuem possivelmente a mesma estrutura dos isolados de outras madeiras, ou seja, o ácido urônico liga-se à unidade de D-xilose por ligação do tipo  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ . Os ácidos urônicos associados às hemiceluloses de S. parahybum são o ácido 4-O-metilglucurônico e, provavelmente, o ácido glucurônico.

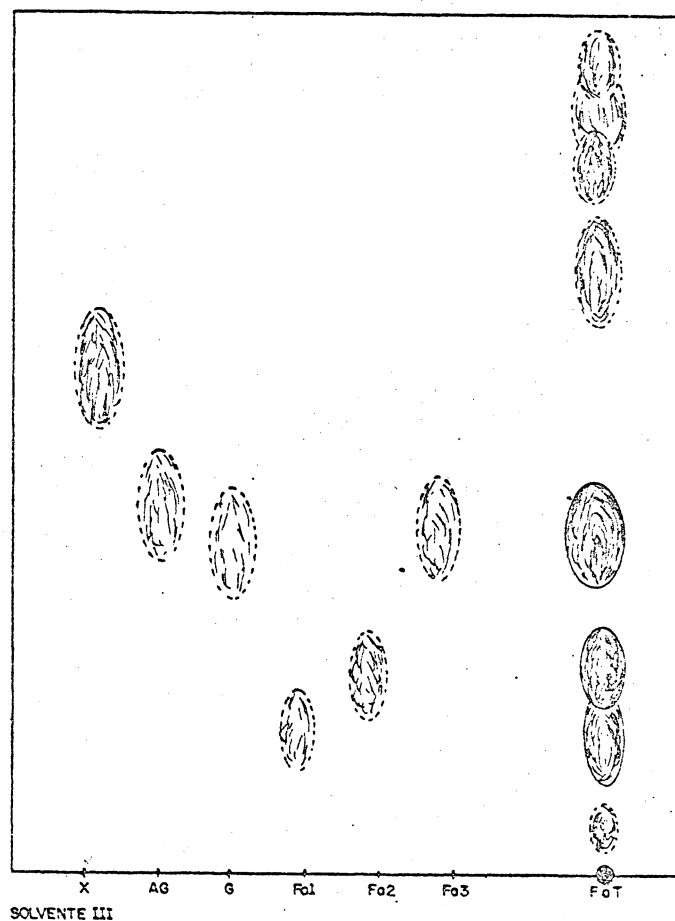


Figura XVIII- Análise por cromatografia em papel das frações ácidas isoladas por cromatografia preparativa em papel, após hidrólise parcial do caule de S. parahybum  
 X=xilose; A.G.=Ácido glucurônico  
 G=glucose.

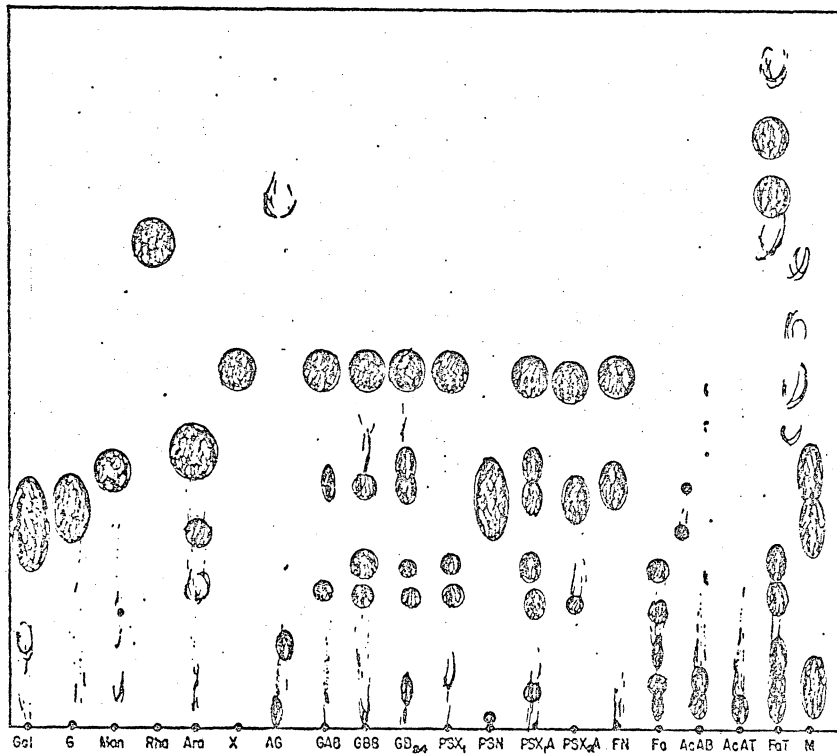


Figura XIX - Análise cromatográfica (C.C.D.) no solvente IV das frações hemicelulósicas e das frações ácidas isoladas do caule de S. parahybum.

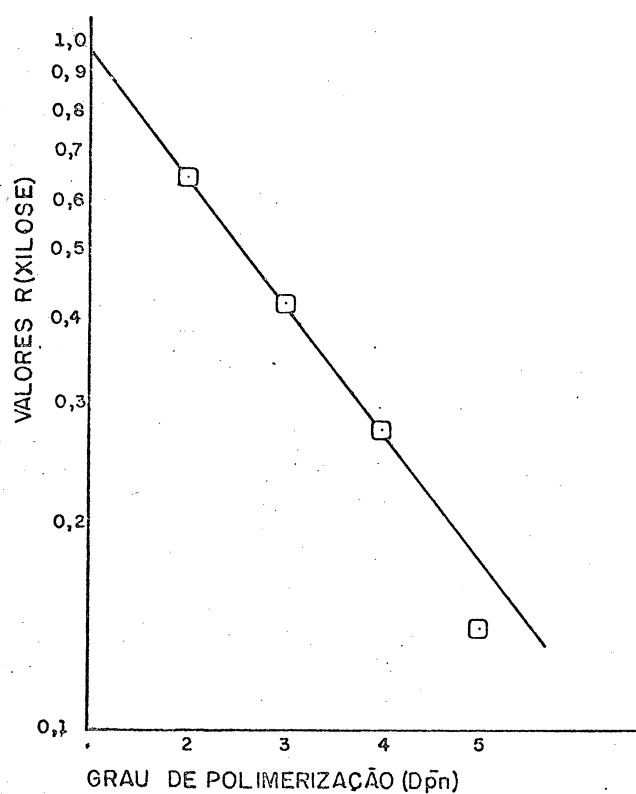


Figura XX - Relação linear entre estrutura e mobilidade cromatográfica. A análise cromatográfica foi feita em papel Whatman nº 3, no solvente III, por um período de 26 horas. Os oligossacarídeos ácidos foram obtidos após hidrólise parcial do pós da madeira e separação por cromatografia de troca-iônica.

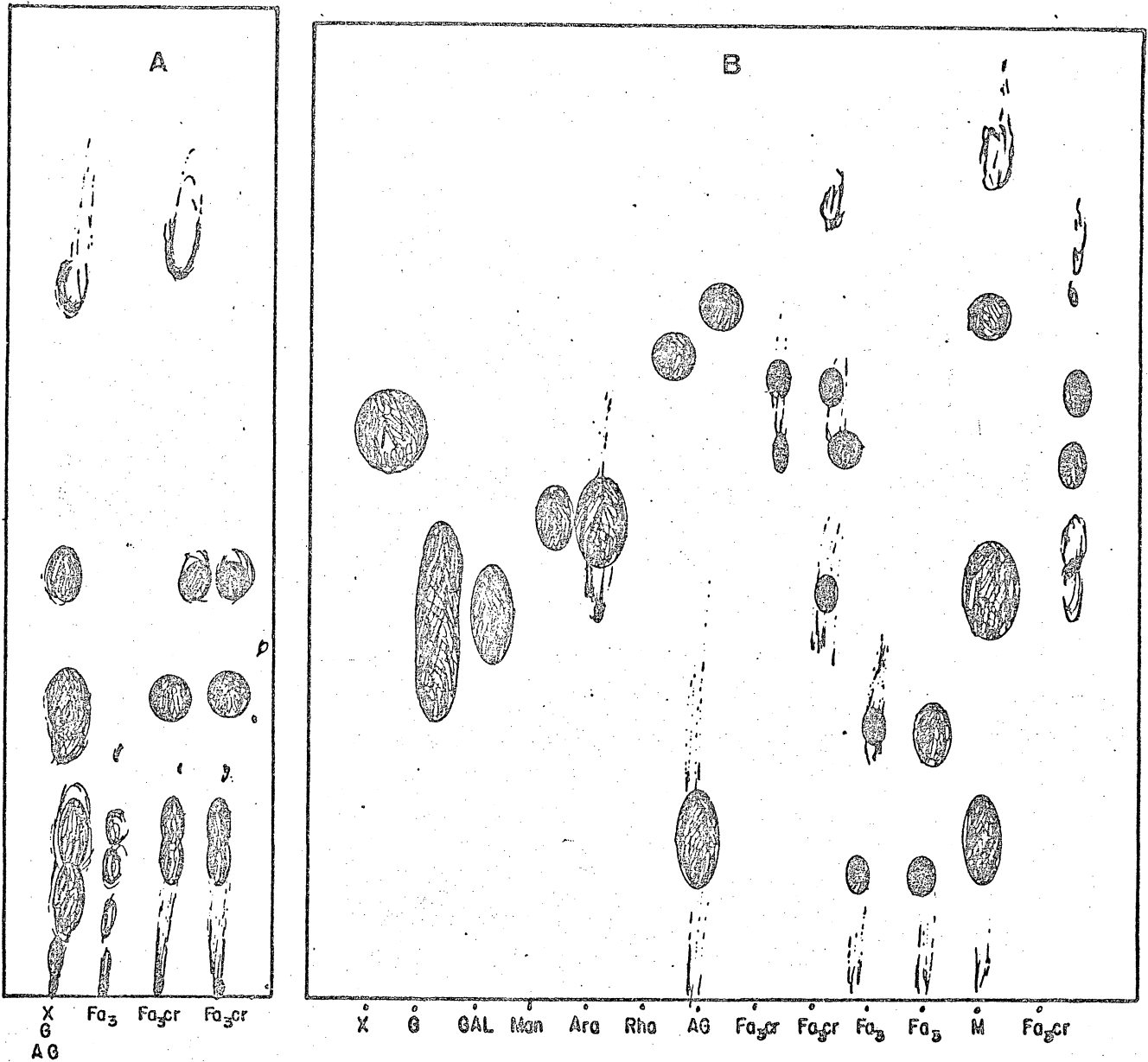


Figura XXI - Análise cromatográfica da fração ácida  $Fa_3$ .  
 A fração ácida  $Fa_3$ , correspondente ao ácido al dobiurônico isolado do caule de *S. parahybum*, foi analisada por CCD, após hidrólise do dissacarídeo metanolisado e carboxi-reduzido.  
 A = solvente IV      B = solvente VI

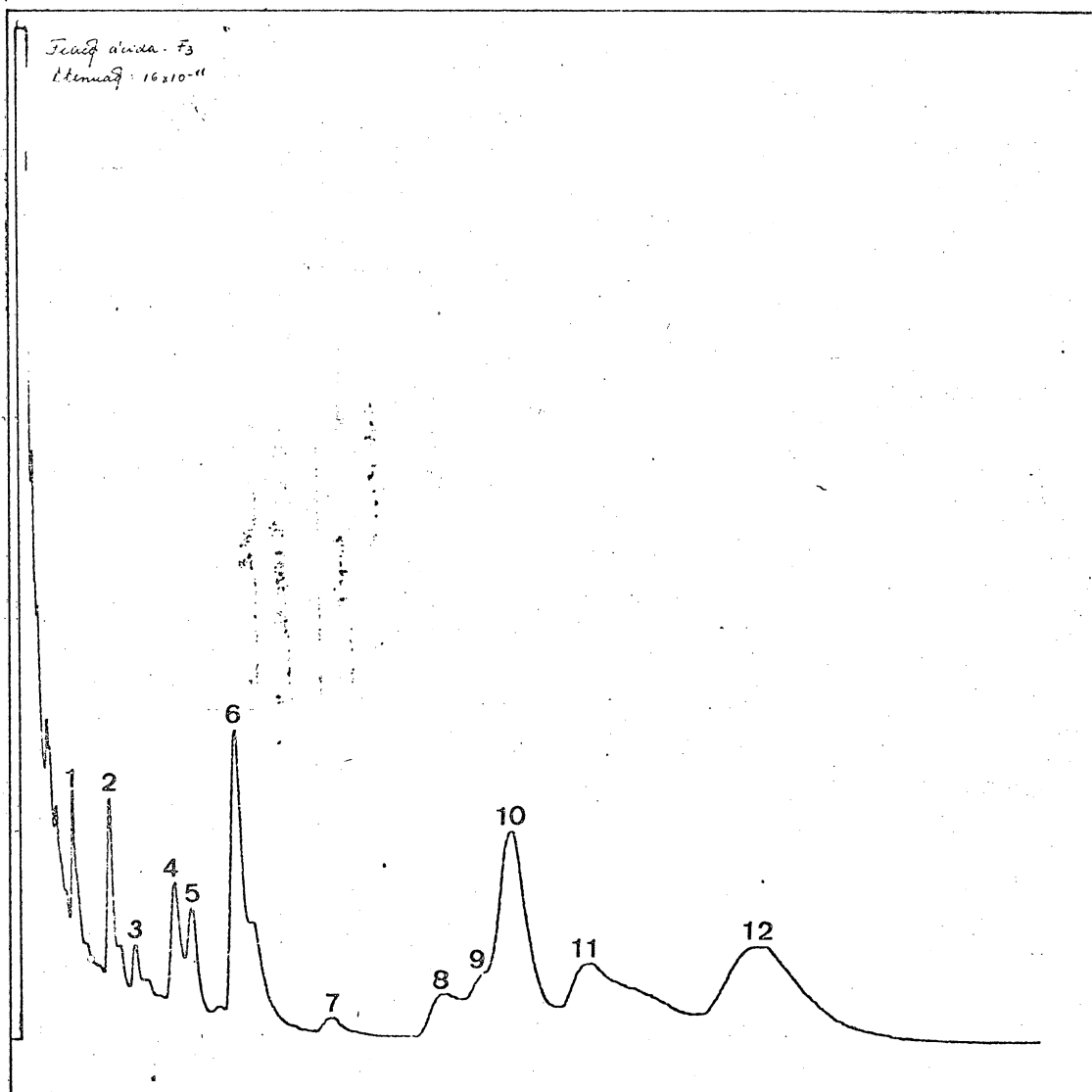


Figura XXII - Análise cromatográfica por g.l.c. (Coluna A) da Fração ácida Fa<sub>3</sub>. Os acetatos de alditóis foram obtidos após hidrólise, redução e acetilação da Fração Fa<sub>3</sub> metanolizada e carboxi-reduzida.

(1,2,3,4,5,7,11,12)?, (6) xilitol, (8) manitol, (9) galactitol, (10) 4-0-metil-glucitol (11) glucitol.

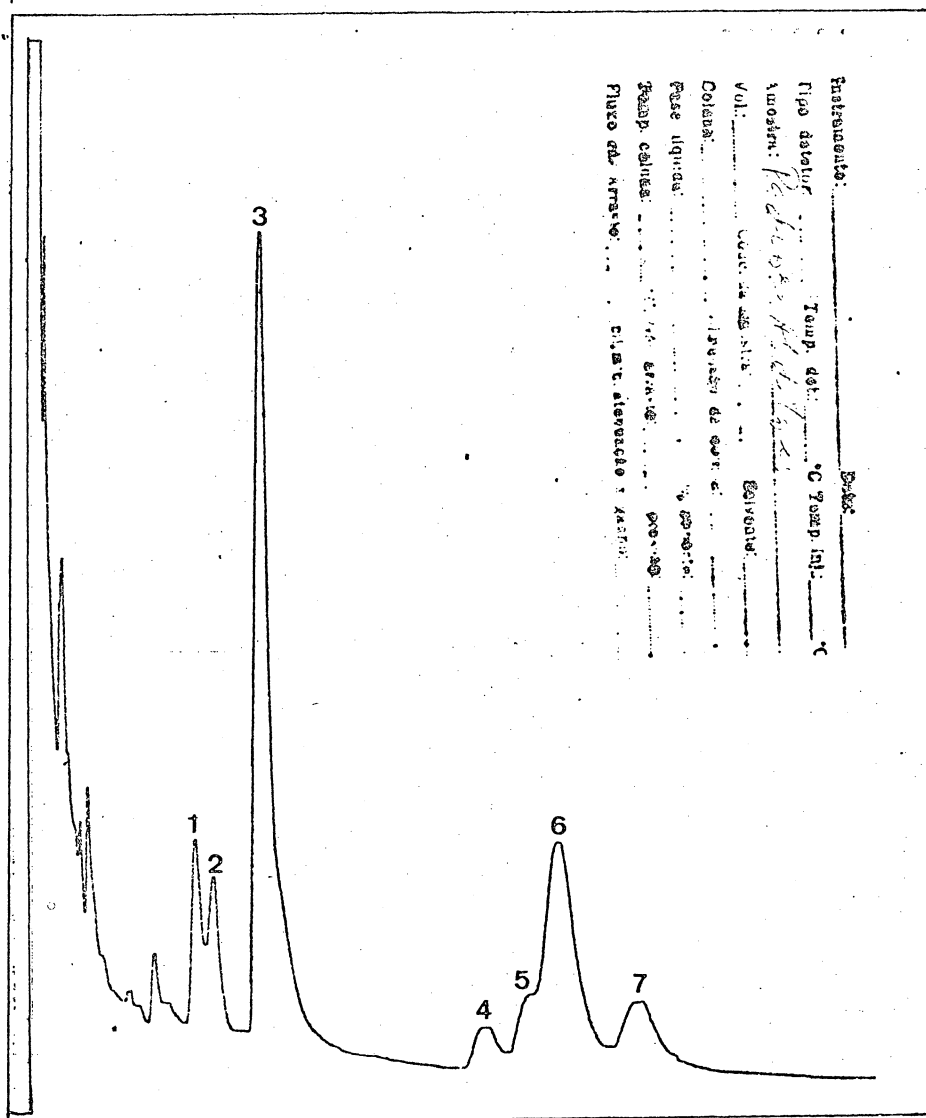


Figura XXIII- Análise Cromatográfica por g. l. c. (Coluna A)  
 da Fração ácida Fa<sub>2</sub>. Os acetatos de alditóis  
 foram obtidos após hidrólise, redução e aceti  
 lação da Fração Fa<sub>2</sub> metonolisada e carboxire  
 duzida.  
 (1,2)?, (3) xilitol, (4) manitol, (5) galacti  
 tol, (6) 4 - 0 - metil-glucitol (7) glucitol.

#### 4 - CONCLUSOES

A casca do caule de S. parahybum contém cerca de 17% de taninos tanantes e, tendo em vista sua abundância e rápido crescimento, representa uma opção a mais para a indústria tanífera regional.

A principal fração hemicelulósica presente no caule de Schizolobium parahybum (GA<sub>8</sub>) é constituída por unidades de (1 → 4) - D-xilopirranose, onde algumas unidades de D-xilose apresentam a posição C-2 substituída, indicando possibilidade de ramificações, provavelmente por grupos aglicona, como sugere os resultados obtidos das análises por metilação e degradação. Uma análise mais detalhada deste polímero faz-se necessária, tendo em vista algumas discrepâncias observadas nos resultados obtidos através dos procedimentos de análises empregados. A natureza dos compostos não identificados, observados nas análises cromatográficas requer um estudo mais pormenorizado para identificar sua origem, ou seja, se estes componentes tem sua origem a partir de açúcares ácidos ou em outros compostos como a lignina.

No procedimento empregado para fracionar a hemicelulose GB<sub>8</sub>, foram obtidas 6 frações polissacarídicas, distintas em composição e rendimento. A fração neutra obtida, representando apenas 4,5% da fração hemicelulósica total, é composta por uma glucana e uma glucomanana.

Os resultados encontrados após a metilação da glucana (PSG), sugerem que a mesma apresenta estrutura linear onde as unidades de D-glicopirranose interligam-se por enlaces do tipo  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ , provavelmente amido.

Em função dos resultados obtidos, a glucomanana parece apresentar estrutura linear e grau médio de polimerização em torno de 11 e as unidades de glucose e manose interligam-se por enlaces do tipo (1 → 4).

A xilana, denominada  $PSX_1$  e que representa 41,95% da hemicelulose  $GB_8$ , é constituída por unidades de xilopiranosas unidas por ligações (1 → 4). Através da metilação e degradação de SMITH, o polissacarídeo parece apresentar pontos de ramificação por xilose, grupos aglicona e ácidos urônicos.

Os ácidos aldourônicos isolados da fração hemicelulósica  $GA_8$  e do caule de S. parahybum, são constituídos por xilose e pelo ácido 4-O-metilglucurônico. A ocorrência dos outros componentes observados durante a análise, principalmente o glucitol, sugere que o ácido glucurônico pode, também, encontrar-se associado às frações hemicelulósicas.

Tendo em vista o elevado conteúdo de glucose, provavelmente pela presença de amido, e de ácidos urônicos observados nas frações hemicelulósicas analisadas, bem como as sugestões de pontos de ramificações ou outro tipo de ligação (inferida a partir dos resultados obtidos) e o aparecimento de picos não identificados nas análises cromatográficas efetuadas, um estudo mais detalhado das mesmas é necessário.

Comparando as sugestões aqui apresentadas, com as estruturas propostas para as hemiceluloses isoladas de vegetais da mesma família - Mimosa scabrella e Acacia mollissima - nota-se alguma semelhança entre a hemicelulose isolada de A. mollissima e de S. parahybum. Assim, sugere-se um estudo comparativo, mais detalhado entre as hemiceluloses presentes nestas duas espécies de leguminosas

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R. & SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. J. Am. Chem. Soc., 74:4970-1, 1952.
2. ADAMS, G. A. The constitution of a polyuronide hemicellulose from wheat. Can. J. Chem., 30:698-710, 1952.
3. \_\_\_\_\_. Constitution of a polyuronide hemicellulose from what leaf. Can. J. Chem., 32:186-94, 1954.
4. \_\_\_\_\_. Constitution of a water soluble hemicellulose from american beechwood (Fagus grandifolia). Can. J. Chem., 35:556-64, 1957.
5. \_\_\_\_\_. Constitution of a glucomannan from the sapwood of Sugar maple (Acer saccharum). Can. J. Chem. 39: 2423-30, 1961.
6. \_\_\_\_\_. Lignin determination. In: WHISTLER, R.L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965, v. 5, p. 185-7.
7. Alcoolacre. Projeto. Rio Branco, 1984.
8. ALBERSHEIM, P. The primary cell wall. In: BONNER, J. & VARNER, J.E., ed. Plant Biochemistry, 3. ed. New York, Academic Press, 1976, p. 225-74.
9. ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D. & KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polisaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res. 5:340-45, 1967.

10. ANDERSON, R.; SEELEY, M.; STEWARTH, W.T.; REDD, J. C. & WESTERBEKE, D. The origin and composition of the hemicelluloses obtained from hardwoods. J. Biol. Chem., 135:189-98, 1940.
11. ANDERSON, E.; KASTER, R. & SEELEY, M.G. Hemicelluloses and pectic material from cotton-wood. Populus macdougalii. J. Biol. Chem. 144(1):767-72, 1942.
12. ARCURY, B.E.F.; RECONDO, M.E.F. & RECONDO, E.F. A modified uronic acid-indole reaction. Carbohydr. Res. 83:165-76, 1980.
13. Association of Official Agricultural Chemists - Official Methods of Analysis. Washington, 10. ed. 1965, p. 219.
14. ASPINALL, G.D.; HIRST, E.L. & MAHOMED, R.S. Hemicellulose a of beechwood (Fagus sylvatica). J. Chem. Chem. Soc., 1734-8, 1954.
15. ASPINALL, G.O. & MAHOMED, R.S. The constitution of a wheat straw xylan. J. Chem. Soc., 1731-4, 1954.
16. ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. In: WOLFRUM, M.L., ed. Advances in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press, 1959, v. 14, p. 429-69.
17. \_\_\_\_\_. Pectins, plant gums and other plant polysaccharides. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. ed. The carbohydrates - Chemistry and Biochemistry, Academic Press. New York, 1970, v. 2-B, p. 513-36.
18. BACKER, S.A. & SOMERS, P.J. A spectrophotometric method for the determination of formic acid on the periodate oxidation of carbohydrates. Carbohydr. Res. 3:220-4, 1966.

- 116.
19. BANKS, W. & GREENWOOD, C.T. Physical properties of solution of polysaccharides. In: WOLFRON, M.L. and TIPSON, R.S., ed. Advances in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press, 1963, v. 18 p. 357-69.
20. BARDALAYE, P.C. & HAY, G.W. Structural studies on the hemicelluloses of the roots of the sugar maple (Acer saccharum Marsh). Part 2. Two (4-O-methyl-D-glucurono) glucoxytan from the sapwood of mature lateral roots. Carbohydr. Res., 37:339-50, 1974.
21. BARNOUD, F.; DUTTON, G.G.S. & JOSELEAU, J.P. La D-xylanne du roseau Arundo donax. Carbohydr. Res., 27:215-23, 1973.
22. BASAK, R.K.; MANDAL, P.K. & MUKHERJEE, A.K. Investigations on the structure of a hemicellulose fraction isolated from the trunk of a young bael. (Aegle marmelos). Carbohydr. Res., 104:309-17, 1982.
23. BAUER, D.; TALMADGE, R.W.; KEEGSTRA, K. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II The hemicellulose of the walls of suspension cultured sycamore cells. Plant. Physiol., 51:174-87, 1973.
24. BISHOP, C.T. Isolation of the aldobiuronic acid 3-(xylopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranoside, from wheat straw hemicellulose and synthesis of its  $\beta$ -isomer. Can. J. Chem., 31:134-44, 1953.
25. \_\_\_\_\_. Crystalline xylans from straws. Can. J. Chem., 31:793-800, 1955.
26. \_\_\_\_\_. Oligosaccharides of xylose from wheat straw hemicellulose. Can. J. Chem., 33:1073-8, 1955.
27. BISHOP, C.T.; BAYLEY, S.T. & SETTERFIELD, G. Chemical constitution of the primary cell wall of Avena coleoptiles. Plant. Physiol., 33:283-89, 1958.

28. BITTER, B. & MUIR, H.M. A modified uronic acid Carbazole reaction. Anal. Biochem., 4:330-34, 1962.
29. BJORNDAL, H.; LINDBERG, B. & SVENSSON, S. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. Acta. Chem. Scand., 21:1801 - 4, 1967.
30. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. A critical re-examination of problems inherent in compositional analysis of hemicelluloses by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., 14:375-87, 1970.
31. BLAKE, J. D. & MURPHY, P.T. & RICHARDS, G.N. Isolation and A/B classification of hemicelluloses. Carbohydr. Res., 16:49-57, 1971.
32. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. Evidence for molecular aggregation in hemicelluloses. Carbohydr. Res., 18:11-21, 1971.
33. \_\_\_\_\_. An examination of some methods for fractionation of plant hemicelluloses. Carbohydr. Res., 17:253-68, 1971.
34. BLUMENKRANTZ, N. & ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem., 54:484-89, 1973.
35. BÓRIO, E.B.L.; CECY, C. & YASSUMOTO, Y. Contribuição ao estudo farmacognóstico da casca do caule da aroeira Schinus terebinthifolius Radi - Anacardiaceae. Ciência e Cultura. 25(7):631-34, 1973.
36. BOUVENG, H.O.; GAREGG, P.J. & LINDBERG, B. Position of the O-acetyl groups in birch xylan. Acta. Chem. Scand. 14:742-48, 1960.
37. BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates II. Location of the O-acetyl groups in birch xylan. Acta. Chem. Scand. 15:96-100, 1961.

- 118.
38. BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated polysaccharides. In: WHISTLER, R.L. ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press. 1965, v. 5, p. 296-8.
  39. BROWNING, B.L. Isolation and separation of the hemicelluloses. In: Methods in Wood Chemistry. New York. Interscience Publishers. 1967, v. 2, p. 561-87.
  40. \_\_\_\_\_. Lignin. In: Methods in Wood Chemistry. New York. Interscience Publishers. 1967, v. 2, p. 717-83.
  41. \_\_\_\_\_. Determination of acetyl and methoxyl groups. In: Methods of Wood Chemistry. New York. Interscience Publishers. 1967, v. 2, p. 653-70.
  42. BRYANT, F. & OVERELL, B.T. Quantitative chromatographic analysis of organic acids in plant tissue extracts. Biochem. et Biophys. Acta. 10:471-76, 1953.
  43. BUCHALA, A. J. An arabinogalacto - (4-O-methyl glucurono)-xylan from the leaves of Hordeum vulgare Phytochem. 12:1373-6, 1973.
  44. BURKE, D.; KAUFMAN, P.; MCNEIL, M. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls VI. A survey of the walls of suspension cultured monocots. Plant Physiol. 54:109-15, 1974.
  45. CARPITA, N. Hemicellulosic polymers of cell walls of Zea coleoptiles. Plant Physiol 72:515-21, 1983.
  46. CHAMBAT, G.; JOSELEAU, J.P. & BARNOUD, F. The carbohydrate constituents of the cell wall of suspension cultures of Rosa glauca. Phytochem. 20:241-6, 1981.

47. CHAMBAT, G.; BARNOUD, F. & JOSELEAU, J.P. Structure of the primary cell walls of suspension-cultured Rosa glauca cells. Plant Physiol. 74:687-93, 1984.
48. CHEETHAN, N.W.H. & McILROY, R.J. Polysaccharydes of tropical grass species I. Giant star grass (Cynodon polectostachyus). Carbohydr. Res. 21:201-10, 1972.
49. CLAYTON, W. D. & PHELPS, G.R. The sorption of glucomannan and xylan on  $\alpha$ -cellulose wood fibers. J. Polymer. Sci. Parte C, 11:197-220, 1965.
50. CLELAND, R. Cell wall extension. Ann. Rev. Plant Physiol. 22:97-222, 1971.
51. COMTAT, J. & JOSELEAU, J.P. Mode of action a xylana se and its significance for the structural investigation of the branched L-arabino-D-glucurono-D-xylan from redwood (Sequoia sempervirens). Carbohydr. Res. 95:101-112, 1981.
52. COREY, E. J. & CHAYKOVSKY, M. Methylsulfinylcabani on. J. Am. Chem. Soc. 84:866-7, 1962.
53. CORREA, J.B.C. Metilação. In: Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos. Curitiba. 1971, p. 39-49 (monografia didática).
54. CORREA, J.B.C.; GOMES, S.L. & GEBARA, M. Structural features of the hemicellulose a from the steam of Mimosa bracaatinga. Carbohydr. Res. 60:337-43, 1978.
55. CORREA, J.B.C. Comunicação pessoal.
56. CORREA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. 1926, v. 1, p. 235.

57. COSTA, F. A. Farmacos com taninos. In: Farmacognosia, Fundação Calouste Gulbenkian. ed. Lisboa., 1970, v. 3, p. 643.
58. DETROY, R.W. & HESSELTINE, C. W. Availability and utilisation of agricultural and agro-industrial wastes. Proc. Biochem., p. 2-8, 1978.
59. DOROSO, N. Alguns aspectos estruturais da hemicelulose B do caule de Mimosa bracaatinga Hoehne. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1981.
60. DOWNS, F. & PIGMAN, W. Determination of O-Acetyl Groups by the Hestrin Method. In. WISTLER, R.L. & BeMILLER, J.N. ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press. 1976, v. 12, p. 241-3.
61. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-6, 1956.
62. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed polisaccharides on cellulose acetate. Can. J. Chem., 46:3079-84, 1968.
63. DUTTON, G.G.S. & UNRAU, A, M. The structural analysis of some acidic xylans by periodate oxidation. Can. J. Chem., 40:348-52, 1962.
64. DUTTON, G.G.S. & KABIR, M.S. A comparison of the xylans from corn leaves and stalks. Phytochem. 11:779-85, 1972.
65. FALCONER, E.L. & ADAMS, G.A. The aldobiuronic acids of hemicelulose B of oat hulls. Can. J. Chem. 34:338-44, 1956.

- 121.
66. FONTANA, J.D. Processamento de pentosanas de fibromassa agrícola residual. Arg. Biol. Tecnol. 28(1):206, 1985.
67. FLASCHKA, H.A.; BARNARD JR, A.J. & STURROK, P. E. Quantitative Analytical Chemistry. New York. BARNES & NOBLE BOOK. 1969, v. 1, p. 570-2.
68. FRASER, C.G. & WILKIE, K.C.B. A hemicellulosic glucan from oat leaf. Phytochem. 10:199-204, 1971.
69. FRENCH, D. & WILD, G.M. Correlation of carbohydrate structure with papergram mobility. J. Am. Chem. Soc., 75:2612-16, 1953.
70. GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. Nature., 191:1295-6, 1961.
71. \_\_\_\_\_. Comparison of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. Phytochem., 4:631-34, 1965.
72. GALAMBOS, J.T. The reaction of carbazole with Carbohydrates I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color sugar. Anal. Biochem., 19:119-32, 1967.
73. GEBARA, M. Degradação enzimática da hemicelulose A de Mimosa bracaatinga. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1977.
74. GLAUDEMANS, C.P.J. & TIMELL, T.E. The polysaccharides of white birch (Betula papyrifera). III-Determination of composition and identification of 2-O-(4-O-methyl-D-glucopyranosuluronic acid)-D-xylopiranose. J. Am. Chem. Soc., 80:941-3, 1958.

75. \_\_\_\_\_. The polysaccharides of white birch (Betula papyrifera) IV. The constitution of the hemicellulose. J. Am. Chem. Soc., 80:1209-13, 1958.
76. GOMES, S.L. Análise estrutural de um metilglucurônio xilano isolado do caule de bracatinga (Mimosa bracatinga, Hoehne). Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade do Paraná, 1975.
77. GOLDESTEIN, I.J.; HAY, G.M.; LEWIS, B.A. & SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R.L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry New York. Academic Press. 1965, v. 5, p. 361-70.
78. GUTHRIE, R.D. Periodate oxidation. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M. L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press. 1962, v. 1, p. 432-5.
79. HAGERMAN, A.E. & BUTLER, L.G. Protein precipitation Method for a quantitative determination of tannins. J. Agric. Food. Chem., 26:809-12, 1978.
80. HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glucolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulphoxide. J. Biochem., 55:205-7, 1964.
81. HAMILTON, J.K. & THOMPSON, N.S. Graded acid hydrolysis studies of a xylan polyuronide associated with cellulose from western hemlock. J. Am. Chem. Soc. 79: 6464-9, 1957.
82. HASLAM, E. Chemistry of vegetable tannins. Academic Press. London. 1965, p. 1-69; 91-141.
83. HAVLICEK, I. & SAMUELSON, O. Chromatography of oligosaccharides from xylan by various techniques. Carbohydr. Res., 22:307-16, 1972

84. HAWORTH, W.N. & PERCIVAL, E.G.V. Polysaccharides. Part IX. Evidence the pyranose structure of xylan. J. Chem. Soc., p. 2850-4, 1931.
85. HAWORTH, W.N.; HIRST, E.L. & OLIVER, E. Polysaccharides. Part XVIII. The constitution of of xylan. J. Chem. Soc., 1917-23, 1934.
86. HAWORTH, R.D. Some problems in the chemistry of the gallotannins. Proc. Chem. Soc., 401-10, 1961.
87. HAY, G.W.; LEWIS, B.A. & SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides. In: WHISTLER, R. L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press. 1965, v. 5, p. 357-61.
88. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. & UNRAU, A.M. Determinations of reducing end groups by periodate oxidation. In: WHISTLER, R.L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic. Press. 1965, v. 5, p. 251-53.
89. HANDERSON, G.A. & HAY, G.W. The carbohydrates of the leaves of common barberry (Berberis vulgaris). The extraction, fractionation and structural studies of selected non-cellulosic polysaccharides. Carbohydr. Res., 23:379-98, 1972.
90. HIRST, E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. In: WHISTLER, R.L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press. 1965, v. 5, p. 287-96.
91. JONES, J.R.N.; MERLER, E. & WISE, L.E. The hemicelluloses present in aspen wood (Populus tremuloides). Part I and II. J. Chem. Soc., 2750-6, 1952.

92. JONES, J.K.N.; MERLER, E. & WISE, L.E. The hemicelluloses present in aspen wood (Populus tremuloides) Part III. The constitution of pentosan and hexosan fractions. Can. J. Chem., 35:634-45, 1957.
93. JONES, J.K.N.; PURVES, C.B. & TIMELL, T.E. Constitution of a 4-O-methylglucuronoxylan from the wood of trembling aspen (Populus tremuloides Michx). Can. J. Chem., 39:1059-61, 1961.
94. JOSELEAU, J.P. & CHAMBAT, G. Structure of the primary cell walls of suspension cultured Rosa glauca cells II. Multiple forms of xyloglucans. Plant Physiol., 74:694-700, 1984.
95. KATO, Y & MATSUDA, K. Presence of a xyloglucan in the wall of Phaseolus aureus hypocotyls. Plant & Cell Physiol., 17:1185-98, 1976.
96. KATO, Y.; ASANO, N. & MATSUDA, K. Isolation xyloglucans from etiolated Glicine max and Vigna sesquipedalis hypocotyls. Plant & Cell Physiol., 18:821-29, 1977.
97. KATO, Y. & MATSUDA, K. Structure of oligosaccharides obtained by hidrolisis of mung bean xyloglucan with Trichoderma viride cellulose. Agric. Biol. Chem., 44(8):1759-66, 1980.
98. KATO, Y.; IKI, K. & MATSUDA, K. Cell wall polysaccharides of imature barley. plants II. Characterization of a xyloglucan. Agric. Biol. Chem., 45(12):2745-53, 1981.
99. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Cell wall polysaccharide of imature barley plants I. Isolation and chracterization of  $\beta$ -D-glucan. Agric. Biol. Chem., 45(12):2737-44, 1981.

125.  
100. KATO, Y.; SHIOZAWA, R.; TAKEDA, S.; ITO, S. & MA  
TSUDA, K. Structural investigation of a  $\beta$ -D-glu  
can and a xyloglucan from bamboo-shoot cell walls.  
Carbohydr. Res., 109:233-48, 1982.
101. KATO, Y.; ITO, S.; IKI, K. & MATSUDA, K. Xyloglucan  
and  $\beta$ -D-glucan in cell wall rice seedling. Plant  
& Cell Physiol., 23(3):351-64, 1982.
102. KEEGSTRA, K.; TALMADGE, R.W.; BAUER, W.D. & ALBERSHEIM,  
P. The structure of plant cell walls. III. A model  
of the walls of suspension - cultured sycamore cel  
ls based on the interconnections of the macromo  
lecular componentes. Plant Physiol., 51:188-97,  
1983.
103. KUBACKOVA, M.; KARACSONYI, S.; BILISICS, L. & TO  
MAM, R. On the specificity and mode of action of  
a xylanase from Trametes hirsuta (WULF) PILAT.  
Carbohydr. Res., 76:177:88, 1979.
104. KURSHAKOVA, G.V. Chemical - technological studies on  
Polygonum coriarium acclimatized to northern condi  
tion. Sosotoyanie i Perspektivy Izucheniya Rasti  
tel Resursov S.S.S.R. 406-10. 1958. Apud. Chem.  
Abstr., 56:1775, 1962.
105. LABAVITH, J.M. & RAY, P.M. Structure of hemicellulo  
sic polisaccharides of Avena sativa coleptile cell  
walls. Phytochem., 17:933-37, 1978.
106. LABAVITCH, J.M. Cell wall turnover in plant develop  
ment. Ann. Rev. Plant. Physiol., 32:385-406, 1981
107. LAMPORT, D.T.A. Cell wall metabolism. Ann. Rev.  
Plant Physiol., v. 21, p. 235-70, 1970.
108. LINDEBERG, B.; ROSSEL, K.G. & SVENSSON, S. Positions  
of the O-acetyl groups in birch xylan. Svensk Pap  
perstidning. 76:30-2, 1973.

109. LOESHER, W. & NEVINS, D.J. Auxin induced changes in *Avena coleoptile* cell wall composition. Plant Physiol., 50:556-3, 1972.
110. MANDAL, G. & DAS, A. Structure of the glucomannan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller. Carbohydr. Res., 87:249-56, 1980.
111. MARSH, C.A. Chemistry of D-glucuronic acid and its glycosides. In: GEOFFREY I. DUTTON., ed. Glucuronic Acid - Free and Combined. Academic Press. New York, 1966, p. 24-36.
112. McNEIL, M.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. The structural polymers of the primary cell wall of dicots. In: W. HERZ, H. GRISEBAH, G.W, KIRBY. ed. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products New York. Springer-Verlag, v. 37, p. 191-249, 1979.
113. MIAM, A. J. & TIMELL, T.E. Isolation and properties of a glucomannan from the wood of red maple (*Acer rubrum* L.). Can. J. Chem., 38:1511-17, 1960.
114. MOREIRA, E. A.; CECY, C.; NAKASHIMA, T.; LEONART, R.; FRANKE, T.A.; MIGUEL, O.G. & SATO, E.M.O. Substâncias tânicas em caules de espécies do gênero *Tibouchina* Melastomataceae. Rev. Bras. Farm. LXV(1/3), p. 27-33, 1984.
115. MORRAL, P. & BRIGGS, D.E. Changes in cell wall polysaccharides of germinating barley grains. Phytochem., 17:1495-1502, 1978.
116. MORRISON, I.M. Changes in the hemicellulosic polysaccharides of rye-grass with increasing maturity. Carbohydr. Res., 36:45-51, 1974.
117. NELSON, N. A photometric adaptation of the SOMOGYI Method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153:375-80, 1944.

- 127.
118. NEUBAUER, L.G. & PURVES, C.B. Structure of a hemicellulose from maple wood previously extracted by liquid ammonia. Can. J. Chem., 35:388-96, 1957.
119. NEUKON, H. & KUENDIG, W. Fractionation of diethylamino ethylcellulose columns. In: WHISTLER, R. L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry., New York, Academic Press, 1965, v. 5., p. 14-7.
120. NEUMILLER, G. & VASSEUR, E. The influence of pH on the periodate oxidation of carbohydrates. Arkiv for Kemi, 5:235-45, 1952.
121. NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D. & ALBERSHEIN, P. The specific nature of plant cell wall polisaccharides. Plant Physiol., 42:900-6, 1967.
122. NEVINS, D.J.; HUBER, D.J.; YAMAMOTO, R. & LOESCHER W.H.  $\beta$ -D-glucan of Avena coleoptile cell walls. Plant Physiol., 60:617-21, 1977.
123. NEVINS, D.J.; YAMAMOTO, R. & HUBER, D.J. Cell wall  $\beta$ -D-glucans of five grass species. Phytochem., 17:1503-5, 1978.
124. NORTHCOTE, D.H. Chemistry of the plant cell wall Ann. Rev. Plant. Physiol., 23:113-32, 1972.
125. O'DWYER, M.H. The hemicelluloses. Part. IV. The hemicelluloses of beech wood. Biochem. J., 20:656-64, 1926.
126. \_\_\_\_\_. XXXVI. The hemicelluloses of the wood of english oak. The fractionational hemicellulose. A. Biochem. J., 31:254-7, 1937.
127. \_\_\_\_\_. LXXXIX: The hemicelluloses of the wood of english oak. IV. the structure of hemicellulose. A. Biochem. J., 33:713-7, 1939.

128. \_\_\_\_\_. The hemicellulose of the wood of english oak -  
V. The structure of hemicellulose B. Biochem. J.,  
34:149-52, 1940.
129. OLIVEIRA, M. L. Análise estrutural e propriedades do  
O-Acetil-(4-O-metilglucurono)xilano de Mimosa  
bracaatinga. Curitiba. Tese de Mestrado apresenta-  
da ao Departamento de Bioquímica da Universidade Fe-  
deral do Paraná, 1977.
130. PARTHASARATHI, K. & KAMASWAMY, M.N. Role of phenolic  
bodies in the metabolism of sandalwood on health  
and disease. J. Sci. Ind. Res., (India) 20C:273-  
5, 1961. - Apud: Chem. Abstr., 56:3827a, 1962.
131. PASKOVA, J. & MUNK, V. A combined detecting reagent  
for the identification of organic acids on paper.  
chromatograms. J. Chromatog., 4:233-40, 1960.
132. PATRIDGE, S.M. Aniline hydrogen phtalate as spraying  
reagent for chromatography of sugar. Nature.,  
164:443, 1949.
133. POLGLASE, W.J. Polysaccharides associated with wood  
cellulose. In: WOLFRON, M. L. & TIPSON, R.S., ed.  
Advances in Carbohydrate Chemistry. New York:  
Academic Press, 1955, v. 10, p. 283-333.
134. PRESTON, R.D. Polysaccharide conformation and cell  
wall function. Ann. Rev. Plant. Physiol., 30:55-  
78, 1979.
135. RADJABI, F; AMAR, C. & VILKAS, E. Structural studi-  
es of a glucomannan from Aloe Vahombe. Carbohydr.  
Res., 116: 166-70, 1983.
136. RAY, P.M. Sugar composition of oat coleoptile cell  
wall. Biochem. J., 89:144-50, 1963.

137. REICHER, F.; CORREA, J.B.C. & GORIN, P.A. Location of O-acetil groups in the acidic D-xylan of Mimosa scabrella (bracatinga). A study of O-acetil group migration. Carbohydr. Res., 135:129-40, 1984.
138. REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. & CORREA, J.B.C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo fosfotungstico-fosfomolibdico. Arq. Biol. Tecnol., 24:407-11, 1981.
139. REICHER, F. Estudos sobre a estrutura da hemicelulose nativa de Mimosa scabrella (bracaatinga): localização e migração de grupos O-acetílicos; complexos lignina-xilana. Curitiba. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1984.
140. REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B. An acidic galactoarabinoxilan and other pure hemicelluloses in oat leaf. Phytochem., 8:2053-8, 1969.
141. \_\_\_\_\_. Polysaccharides of the oat plant in relationship to plant growth. Phytochem., 8:2045-51, 1969.
142. RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. Botânica Econômica Brasileira, São Paulo - EPU, 1976, p. 193.
143. ROCHA, A.B.; SILVA, J.B. & PANIZZA, S. Substâncias tânicas da casca de Qualea grandifolia Martins (Vochysiaceae). Rev. Cienc. Farm. São Paulo, 2: 109-14, 1979/80.
144. RONCERO, M.I.G. Genes controlling xylan utilization by Bacillus substilis. J. Bacteriol., 156(1): 257-63, 1983.
145. ROSA, I.G. Estudos das hemiceluloses do caule da Acacia mollissima. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1981.

146. ROSSEL, K.G. & SVENSSON, S. Studies of the distribution of the 4-O-methyl-D-glucuronic acid residues in birch xylan. Carbohydr. Res., 42:297-304, 1975.
147. SALIMATH, P.V. & THARANATHAN, R.N. Structural features of two amyloids from the hemicellulosic fraction of field-bean (Dolichos lablab) hulls. Carbohydr. Res., 107:103-9, 1982.
148. SANDFORD, P.A. & CONRAD, H.E. The structure of the Aerobater aerogens A<sub>3</sub>(S<sub>1</sub>) Polysaccharide I. A re examination using improved procedures for Methylation analysis. Biochemistry, 5(5):1508-17, 1966.
149. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F. & RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetal fiber.. Anal. Biochem., 96:282-92, 1979.
150. SHAFIZADEH, F. & MCGINNIS, G.D. Morphology and biogenesis of cellulose and plant cell walls. In: TIPSON, R.S., ed. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. New York. Academic Press, 1971, v.26, p.297-349.
151. SHARMA, U. Investigations on the fibers of pineapple [Ananas comusus (L). Men] leaves. Carbohydr. Res. 97:323-29, 1981.
152. SHARMA, U. & MUKHERJEE, A. K. Investigation on the structure of the hemicellulose obtained from the fiber of Sansevieira trifasciata leaves. Carbohydr. Res., 105:247-50, 1982.
153. SHIBUYA, N. & AKIRA, M. Structure of hemicellulose isolated from rice endosperm cell wall: mode of linkages and sequences in xyloglucan,  $\beta$ -glucan and arabinoxylan. Agric. Biol. Chem., 42(12):2267-74, 1978.

154. SHIBUYA, N. & IWASAKI, T. Structural features of rice bean hemicellulose. Phytochem., 24:285-9, 1985.
155. SHIMIZU, K. & SAKURAI, K. Isolation from a soft xylan of oligosaccharides containing two 4-O-methyl-D-glucuronic acid residues. Carbohydr. Res., 62: 117-27, 1978.
156. SCHUBERT, W. Lignin Biochemistry. New York. Academic Press., 1965, p. 131.
157. SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; VAN CAUWENBERG, J.E. & KURTZMAN, C.P. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng., 24:371-84, 1982.
158. SMITH, R.J. Determination of ash. In: WHISTLER, R.L. ed. Methods in Carbohydrate Chemistry., Academic Press, 1964, v. 4, p.41-2.
159. SOMOGY, M. A new reagent for the determination of sugar. J. Biol. Chem., 160:61-8, 1945.
160. STHAL, E. Thin-layer chromatography - A laboratory Handbook. 2. ed. New York. Springer Verlag, 1969, p. 855-905.
161. STEPHEN, A. M.; KAPLAN, M.; TAYLOR, G.L. & LEISENGANG, E.G. Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides. Tetrahedron, 7:233-40, 1966, Supplement.
162. SWAIN, T. The tannins. In: BONNER, JANUS & VARNER, J.E., ed. Plant Biochemistry. New York, Academic Press, 1965, p.552-79.
163. SWARDEKER, J.S.; SLONECKER, J.H. & JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. Anal. Chem., 37:1602-4, 1965.

164. TALMAGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W.D. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. Plant Physiol., 51:158-73, 1973.
165. TIMELL, T.E. The polysaccharides of yellow birch (Betula lutea) II. The constitution of the main hemicellulose. J. Am. Chem. Soc., 81:4989-94, 1959.
166. \_\_\_\_\_. The constitution of a hemicellulose from sugar maple (Acer saccharum). Can. J. Chem., 37: 893-8, 1959.
167. \_\_\_\_\_. Isolation and properties of an O-acetyl-4-O-methyl-glucurono-xyloglucan from the wood of white birch (Betula papyrifera). J. Am. Chem. Soc., 82:5211-5, 1960.
168. \_\_\_\_\_. The structure of an aldopentaouronic acid from a birch wood xylan. Acta. Chem. Scand., 16: 1027-30, 1962.
169. \_\_\_\_\_. Constitution of an aldotetraouronic acid formed on enzymic hidrolisis of a 4-O-methyl glucuronoxylan from the wood of white birch (Betula papyrifera Marsh). Can. J. Chem., 40:22-5, 1962.
170. \_\_\_\_\_. Wood hemicelluloses. Part. I. In: WOLFROM, M. L., ed. Advances in Carbohydrate Chemistry. New York., Academic Press, 1964, v. 19, p. 247-302.
171. \_\_\_\_\_. Wood hemicelluloses. Part II. In: WOLFROM, M. L., ed. Advances in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965, v. 20, p. 409-83.

172. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. Nature, 166:444-5, 1950.
173. VALENT, B.S. & ALBERSHEIN, P. The structure of plant cell walls V. On the binding of xyloglucan to cellulose fibers. Plants Physiol., 54:105-8, 1974.
174. WANKHEDE, D.B.; THARANATHAN, R.N. & RAO, M.R.R.R. Structural investigations on two hemicellulosic polysaccharides from groundnut (Arachis hypogea) seed endosperma. Carbohydr. Res., 74:207-15, 1979.
175. WARDI, A. H.; ALLEN, W. S. & VARMA, R. A simple method for the detection and quantitative determination of hexuronic acids and pentoses. Anal. Biochem., 57:268-73, 1974.
176. WATANABE, T.; SHIDA, M.; FURUYAMA, Y.; TSUKAMOTO, R. I.; NAKAJIMA, T. & MATSUDA, K. Structure of the arabinoxylan of rice hull. Carbohydr. Res., 125:83:95, 1983.
177. WENZEL, G.E. Fracionamento e purificação das hemiceluloses de folha de cafeeiro (Coffea arabica L, Var. Mundo Novo) - Análise estrutural de um O-metil-glucuronoxilano. Curitiba. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 1975.
178. WILKIE, K.C.B. & WOO, S.L. Non-cellulosic  $\beta$ -D-glucans from bamboo and interpretative problems in the study of all hemicelluloses. Carbohydr. Res., 49: 399-409, 1976.
179. WILKIE, K.C.B. The hemicelluloses of grasses and cereals. In: WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S., ed. Advances Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. New York, Academic Press, 1979, v. 36, p. 215-64.

180. \_\_\_\_\_. The hemicelluloses. Chemtech., 13(5):306-19, 1983.
181. WHISTLER, R.L. & HOUGH, L. Two further aldobiuronic acids from hemicellulose B of corn cob. J. Am. Chem. Soc., 75:4918-9, 1953.
182. WHISTLER, R.L.; CONRAD, H.E. & HOUGH, L. 2-O-(4-O-methyl-D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylose from hemicellulose-B of corn cob. J. Am. Chem. Soc., 76:1668-70, 1954.
183. WHISTLER, R.L. & FEATHER, M.S. Hemicellulose - Extraction from annual plants with alkaline solutions. In: WHISTLER, R.L., ed. Methods Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press, 1965, v. 5, p. 144-5.
184. WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L. Hemicelluloses. In: PIGMAN, W. & HORTON, D., ed. The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry. New York. Academic Press. 1970, v. 2a, p. 447-69.
185. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R.L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press, 1963, v. 2, p. 211-5.
186. \_\_\_\_\_. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R.L., ed. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York. Academic Press, 1963. v. 2, p. 65-7.
187. WOOLARD, G.R. & RATHBONE, E.B. Structural studies on a glucuronoarabinoxylan from the of sorghum grain. Carbohydr. Res., 51:239-47, 1976.
188. \_\_\_\_\_. Structural studies on three hemicellulose B fractions from the husk of sorghum grain. Carbohydr. Res., 59:547-52, 1977.

- 135.
189. \_\_\_\_\_. DMSO - soluble hemicelluloses from the husk of sorghum grain. Phytochem., 16:961-3, 1977.
190. ZERMIANI, A. Novos aspectos sobre a estrutura da hemicelulose A do caule de Mimosa bracaatinga Hoehne. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 1980.