

Guido Edgar Wenzel

FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS HEMICELULOSES DE FOLHA
DE CAPEEIRO (Coffea arabica L., var. Mundo Novo) - ANÁ-
LISE ESTRUTURAL DE UM O-METIL-GLUCURONOXILANO.

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

CURITIBA - 1975

BC/MUFPR - MEMORIA DA UNIVERSIDADE F. DO PARANA
AUTOR
R\$ 10.00 - Doacao
Termo No. 234/03 Registro: 347,147
25/07/2003

UFPR - Sistema de Bibliotecas

Tese orientada pelo
Dr. JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA

RESUMO

Além do estudo do fracionamento e purificação das hemiceluloses da folha de cafeeiro (Coffea arabica L., var. Mundo Novo) estudou-se, do ponto de vista estrutural, um 0-metil-glucuronoxilano composto de ácido 0-metil-glucurônico (13,45 %) e D-xilose (86,55 %) que apresenta uma rotação ótica de $[\alpha]_D^{25} = -92,7$ (c 2,25 % em NaOH 1 N). O seu grau médio de polimerização (\overline{DP}_n) é 58,3. O consumo de periodato de sódio é 0,90 moles /mol de pentose anidra. A análise dos produtos de metanólise deste xilano metilado permitiu identificar: 2,3,4-tri-0-metil-D-xilopiranosídeo (2,73 %), 2,3-di-0-metil-D-xilopiranosídeo (68,68 %), 2-0-metil-D-xilopiranosídeo (23,39 %) e 2,3,4-tri-0-metil-D-glucopiranosiluronato de metila (5,18 %). A presença de 2-0-metil-D-xilopiranosídeo bem como o aparecimento de treitol nos produtos da degradação de Smith dos oligossacarídeos ácidos, obtidos por hidrólise parcial ácida do 0-metil-glucuronoxilano são um indicativo de que a ramificação singular constituída pelo ácido 0-metil-glucurônico está ligado ao C-3 da D-xilose. Os resultados da metilação, da oxidação com periodato e a análise dos produtos da degradação de Smith, corroborados pela reação positiva com niidrina dos produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado, indicam a presença de grupos agliconas de origem proteica, ligados provavelmente ao C-3 da D-xilose. Os estudos de complexação com iodo indicam a linearidade da cadeia principal do xilano; confrontando os $\lambda_{\text{máx.}}$ dos espectros de absorção deste xilano com o $\lambda_{\text{máx.}}$ do xilano de Mimosa bracaatinga H. cujos \overline{DP}_n eram conhecidos (58,3 e 71,3 respectivamente) propõe-se o uso da isoterma de LANGMUIR no cálculo do \overline{DP}_n dos xilanos através da determinação do $\lambda_{\text{máx.}}$ do xilano complexado com iodo.

B.A.L = Hemicelulose A, insolúvel em água, extraída da madeira da Mimosa bracaatinga, Hoehne.

B.B.L = Fração polissacarídica linear, solúvel em água, da hemicelulose B da Mimosa bracaatinga, Hoehne, complexada com iodo.

S.M.A.L = Hemicelulose A do sabugo de milho (Zea mays).

DMSO = sulfóxido de dimetila.

DMS = sulfato de dimetila.

GLC = cromatografia em fase gasosa.

\overline{DP}_n = grau médio de polimerização.

M_n = peso molecular médio.

R_G = migração (cromatografia em papel) relativa à D-glucose.

Í N D I C E

	Resumo	I
	Siglas	II
	Índice	IV
1.	Introdução.....	1
2.	Problemas em torno do conceito de hemicelulose	12
2.1.	Célula vegetal e sua composição	12
2.2.	Conceito de hemicelulose.....	15
2.2.1.	Conceito de pectina.....	15
2.2.2.	Conceito de goma.....	16
2.2.3.	Conceito de mucilagem	16
2.2.4.	"Definições" de hemicelulose	17
2.2.5.	Definição de holocelulose.....	22
2.3.	Classificação das hemiceluloses.....	22
2.4.	Composição das hemiceluloses.....	24
3.	Materiais e métodos.....	26
3.1.	Materiais e métodos gerais.....	26
3.2.	Materiais e métodos especiais.....	29
3.2.1.	Preparo do pó cetônico.....	29
3.2.2.	Determinação do resíduo insolúvel por digestão ácida.....	29
3.2.3.	Isolamento e processos de fracionamento.....	31
3.2.3.1.	Fracionamento da hemicelulose B.....	32
3.2.3.2.	Fracionamento da hemicelulose A.....	34
3.2.3.3.	Fracionamento com iodo das frações A.1, A.2 e B.3.....	36
3.2.4.	Composição relativa, em monoaçúcares, das dife- rentes frações polissacarídicas.....	38
3.2.5.	Acetilação.....	40
3.2.6.	Determinação da natureza do ácido urônico liga- do à cadeia principal da fração A.2.L.ins.....	41
3.2.7.	Variação da densidade ótica, a 610 nm, de dife- rentes frações hemicelulósicas após complexação com iodo.	42

3.2.8.	Espectros de absorção das frações A.2.L.ins. e B.A.L complexadas com iodo.....	43 43
3.2.9.	Determinação do grau de polimerização da fração A.2.L.ins.	43
3.2.10.	Processos de metilação da fração A.2.L.ins...	45
3.2.10.1.	Processo de HAWORTH.....	45
3.2.10.2.	Método de SRIVASTAVA.....	45
3.2.10.3.	Processo de metilação com sulfato de dimetila e hidróxido de sódio pulverizado em tetrahidrofurano.....	46
3.2.10.4.	Metilação pelo processo de PURDIE.....	47
3.2.10.5.	Metanólise do polissacarídeo metilado.....	47
3.2.11.	Oxidação com periodato de sódio da fração A.2.L.ins.....	48
3.2.12.	Degradação de SMITH da fração A.2.L.ins.....	49
3.2.13.	Degradação de SMITH dos oligossacarídeos ácidos resultantes da hidrólise parcial da fração A.2.L.ins.....	50
3.2.13.1.	Hidrólise parcial ácida e separação dos oligossacarídeos ácidos.....	50
3.2.13.2.	Oxidação com periodato de sódio e degradação de SMITH dos oligossacarídeos ácidos.....	51
3.2.14.	Espectro de absorção no ultravioleta.....	51
4.	Resultados e discussão.....	52
4.1.	Extração, fracionamento e purificação da hemicelulose da folha de cafeeiro.....	52
4.2.	Resíduo insolúvel da digestão com ácido sulfúrico.....	60
4.3.	Grau médio de polimerização da fração A.2.L.ins.	61
4.4.	Metilação.....	63
4.5.	Oxidação com periodato de sódio.....	66
4.6.	Degradação de SMITH.....	67
4.7.	Complexação de hemiceluloses com iodo.....	71

Figura - 1	76
Figura - 2	77
Figura - 3	78
Figura - 4	78
Figura - 5	79
Figura - 6	70
Esquema - 1	30
Esquema - 2	33
Esquema - 3	35
Tabela - 1	54
Tabela - 2	58
Tabela - 3	62
Tabela - 4	64
Tabela - 5	70
Conclusões	80
Agradecimentos.....	81
Referências bibliográficas	82

1. INTRODUÇÃO.

As folhas de plantas superiores foram e continuam sendo utilizadas como fonte de estudo de polissacarídeos, não só do ponto de vista estrutural e composicional, mas também bioquímico. Na revisão abaixo não há preocupação em arrolar estudos bioquímicos, a não ser alguns trabalhos que estão em conexão com a química de polissacarídeos de folhas. Outro detalhe que se manifestará, no decorrer desta revisão, é que a maioria dos trabalhos publicados versa sobre a composição e estrutura de hemiceluloses extraídas de folhas de plantas pertencentes à família das gramíneas. E como a revisão não é volumosa, optou-se pelo critério de ordem cronológico.

Em 1954, ADAMS (2) escreveu que, embora se tivessem encontrado um fructosano em folhas de cevada (Hordeum vulgare) (2,10) e em Panicum virgatum (2) e um galactano em folhas de plantas anuais tais como de feijão (Phaseolus vulgaris), de videira (Vitis vinifera), de rabanete (Raphanus sp.) e de milho (Zea mays) (39) pouca informação se tinha tido sobre a ocorrência, em a natureza, das hemiceluloses do tipo dos xilanos nestes materiais. Apesar desta afirmação, dois dos autores referidos por ADAMS (2), BUSTON (39), em 1935, e WHISTLER et al. (128), em 1953, se detiveram, também, na análise de hemiceluloses. ADAMS, por sua vez, estudou detalhadamente a hemicelulose A, ou melhor, um arabino-glucuronoxilano da folha de trigo (Triticum vulgare).

Além do trabalho de ADAMS, foi publicado, neste mesmo ano, outro da autoria de FISCHER e DORFEL (56), que versava sobre

hemiceluloses totais, extraídas das folhas de plantas novas de aveia.

Dois anos mais tarde, em 1956, ANDREWS e HOUGH (7) noticiaram o isolamento de 2-0-metil-D-xilose, por hidrólise ácida de folhas de ameixeira (*Prunus domestica*, var. Victoria), lavadas com metanol. Os autores afirmaram que este resíduo de açúcar metilado fazia parte das hemiceluloses da folha de ameixeira. Mas, segundo outros autores (12, 14), este resíduo monossacarídico é parte constituinte das pectinas e não das hemiceluloses.

Em 1957, ANDERSON et al. (5) noticiaram a ocorrência de 2-0-metil-L-fucose como constituinte dos polissacarídeos das folhas de ameixeira.

Em 1958, ANDREWS & HOUGH (8) publicaram os resultados da análise dos produtos de hidrólise do mesmo material utilizado anteriormente (7). Identificaram os monossacarídeos seguintes: D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-xilose e ácido D-galacturônico, além de outros menos abundantes, como é o caso de L-ramnose, D-manose, 2-0-metil-D-xilose e 2-0-metil-L-fucose e ácido D-glucurônico; e descreveram, em detalhe, as técnicas de isolamento e purificação dos dois resíduos monossacarídicos metilados. Neste trabalho estudaram também a composição dos polissacarídeos obtidos por extração aquosa e alcalina, além de determinar o teor de proteína das diferentes frações polissacarídicas, teor que variava desde 3 % até 70 %.

Anos mais tarde, em 1960, ANDREWS et al. (9) ofereceram um quadro da composição, em monoaçúcares, das folhas de 27 espé -

cies de plantas. Estas foram selecionadas de diferentes famílias, a fim de se ter uma idéia representativa da composição de resíduos de monoaçúcares, em folhas de plantas superiores. Este estudo visava, pois, dar uma idéia indireta da composição polisacarídica das folhas destas plantas.

Um estudo, de caráter mais bioquímico, publicado, em 1961, é o de ADAMS e EMERSON (4). Analisaram os teores de amido e polissacarídeos não amídicos em folhas aciculares de Pinus ponderosa, quando submetidas a atmosfera intermitente de fluoreto. Na introdução de seu artigo referem-se a trabalhos semelhantes, em que folhas de outras plantas foram submetidas a atmosfera de dióxido de enxofre.

A composição molecular das hemiceluloses extraídas da hemicelulose da folha de aveia, Avena sativa, em termos de polimolecularidade, polidispersidade e polidiversidade foi estudada por REID e WILKIE (96). Estes termos, juntamente com os de hemicelulose pura e total, e material hemicelulósico foram definidos pelos autores com vistas a trabalhos futuros (98, 96, 97). Além disso, REID e WILKIE (96) determinaram, neste mesmo artigo, a composição qualitativa e quantitativa dos resíduos de açúcar obtidos da hemicelulose total da folha e de outros tecidos da mesma planta. Em suma, ocuparam-se mais com a conceituação e a tecnologia a ser empregada nas pesquisas posteriores (98, 97).

Neste mesmo ano, os dois pesquisadores já mencionados, REID e WILKIE (97), publicaram o estudo de um galactoarabinoxilano extraído das folhas de aveia (Avena sativa, var. Blenda). A he-

micelulose total da qual o galactoarabinoxilano foi separado por fracionamento, correspondia a 22 % do material delignificado.

O terceiro trabalho publicado pela dupla REID e WILKIE (98), em 1969, versou sobre um β -glucano não-celulósico, separado da hemicelulose total, extraída de diferentes tecidos não-endospermicos (folha, colmo, raiz) da aveia (Avena sativa, var. Blenda), crescida quer no laboratório quer no campo. Como a hemicelulose tivesse sido extraída em diferentes fases de crescimento, constataram que havia um aumento da percentagem dos resíduos de D-xilose em todos estes tecidos, no decorrer de seu amadurecimento, com simultâneo decréscimo percentual dos resíduos de D-glucose.

Em 1971, FRASER e WILKIE (58) isolaram um glucano da hemicelulose total de folhas novas de Avena sativa, var. Blenda, glucano que não era amido nem celulose e que apresentava elevado grau de polimerização, isento, porém, de ramificação. Neste polissacarídeo os resíduos de D-glucopiranosose estavam ligados por ligações do tipo (1-3) e (1-4).

Em outra etapa de suas pesquisas, FRASER e WILKIE (59), isolaram glucanos puros da porção solúvel da hemicelulose total da folha, bainha, raiz e coleóptilos de Avena sativa com o objetivo de investigar as relações entre maturidade da planta e composição do β -glucano. Verificaram que a razão da ligação do tipo (1-3) para (1-4), nos glucanos dos diferentes tecidos, caía à medida que a planta amadurecia.

Estudo semelhante ao acima mencionado (96) foi feito por BUCHALA e WILKIE (37), em hemicelulose total. Estudaram a rela-

ção das ligações glicosídicas do tipo β -(1-3) para β -(1-4) entre os resíduos de D-glucose nos diferentes tecidos não-endospermicos (também folha) da Avena sativa, nos diversos estágios de maturação, sem separar ou purificar os β -glucanos. Com base nos dados encontrados concluíram que este glucano era um polissacárido de reserva.

Interessante observação foi registrada por STEWART (109) ao estudar as transformações por que passam certos polissacarídeos de folhas de feijão (Phaseolus vulgaris), durante o desenvolvimento, no escuro, nas condições de murchidez e turgidez. Constatou que o teor de amido de folhas murchas decrescia mais rapidamente que o de folhas túrgidas. A perda acelerada de amido, nas folhas murchas, era acompanhada por um aumento de açúcares livres (principalmente sacarose), solúveis em álcool; nas folhas túrgidas, porém, a diminuição do amido não ocasionava formação de semelhante elevado teor de sacarose, embora o teor dos outros açúcares livres fosse semelhante ao do das folhas murchas.

Fenômeno semelhante já fora observado, anos antes (em 1966), por STEWART et al. (110) em relação ao acúmulo de prolina em folhas murchadas de Brassica rapa L., var. Shogoin, acúmulo este relacionado com a disponibilidade de carboidratos que fossem substrato para a síntese deste aminoácido. O mesmo acúmulo de prolina não foi, porém, observado em folhas túrgidas.

Em trabalho mais anterior ainda, em 1954, foi observado por VICKERY (125) um acúmulo de ácido málico em folhas de Briophyllum calycinum com simultâneo desaparecimento do amido.

Voltando ao tema de hemiceluloses em folhas, BLAKE et al. (28) apresentaram estudo diferente. Não se preocuparam com o estudo estrutural de hemiceluloses, mas estudaram, criticamente, os métodos de fracionamento ou classificação das hemiceluloses em A e B. E neste trabalho de crítica serviram-se, entre outros materiais, da holocelulose de folhas de Heteropogon contortus (uma graminea), em diferentes estágios de crescimento.

O artigo publicado por HENDERSON e HAY (76), em 1972, pretendeu ser o primeiro estudo estrutural detalhado de polissacarídeos não-péctico-não-celulósicos, de hemiceluloses portanto, da folha de um tipo de arbusto espinhento, a saber, Berberis vulgaris. E na revisão bibliográfica (76) referem-se ao estudo feito por HAQ et al., de um glucano semelhante a amido, extraído da folha de Bassella rubra.

Neste mesmo ano, 1972, CHEETHAM e McILROY (42) escreveram estar completando o estudo sobre um polissacarídeo de Cynodon plectostachyus, além de compararem as estruturas das hemiceluloses de várias espécies de gramas de zona tropical com as de gramas de zona temperada. Relataram, particularmente, o isolamento de um arabinoxilano da folha e caule do Cynodon plectostachyus.

Num breve artigo, FORD (57) apresentou os resultados do estudo de um polissacarídeo solúvel em água, extraído de folhas de Phaseolus atropurpureus, cujo teor de D-galactose, L-arabinose e ácido D-glucurônico é de 53,0 %, 32,2 % e 13,8 %, respectivamente. E verificou que este polissacarídeo difere em alguns aspectos estruturais do extraído de outras leguminosas.

Da hemicelulose solúvel em álcali, extraída tanto da folha quanto do caule do milho (Zea mays, var. Golden Bantan), DUTTON e KABIR (55) isolaram um arabinoglucuronoxilano, de estrutura semelhante, embora proviesse de folhas e colmo desta planta.

BUCHALA (35) isolou de folhas de cevada (Hordeum vulgare) um arabinogalacto-(4-O-metilglucurono)-xilano, solúvel em água e o estudou estruturalmente.

Em outro trabalho, BUCHALA e WILKIE (38), em 1973, estudaram as variações, na composição, das hemiceluloses da folha e caule do trigo (Triticum vulgare, var. Capel), crescido no campo. Verificaram que, em cada tecido (folha e caule) a percentagem de D-xilose em relação à hemicelulose total aumentava com o amadurecimento da planta e a da D-galactose variava pouco, ao passo que a da L-arabinose, D-glucose e do ácido urônico decrescia. Verificaram, ainda, que a relação entre as ligações glicosídicas do tipo β -(1-3) e β -(1-4) e o grau de polimerização dos β -glucanos diminuía com o amadurecimento dos tecidos.

Abandonando as gramíneas, a equipe BUCHALA e MEIER (36), isolou um galactoglucomanano de folhas e caule do trevo vermelho, Trifolium pratense L. A cadeia principal do polissacarídeo era constituída por resíduos de D-glucose e D-manose, interligados por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4), sendo que os resíduos de D-galactose constituía as ramificações através de ligações α -(1-6). Este trabalho (36) está relacionado com outro, anterior, da autoria de GAILLARD e BAILEY (62), que estudaram a distribuição dos resíduos de D-glucose e D-manose nas paredes celulares do trevo vermelho (Trifolium pratense), bem como os açúcares totais nas diver-

sas frações polissacarídicas das paredes celulares das folhas do trevo, do caule do trevo vermelho e das folhas de azevém. Os resultados experimentais obtidos, induziram os referidos autores (62) a postularem a existência de um galactomanano ou galactoglucomanano.

BAILEY & CONNOR (18) relataram, brevemente, numa nota, a determinação do teor de celulose e hemicelulose nas folhas e nas bainhas verdes de sete espécies de capim do gênero arundinoide (Cortadera argentea). Fizeram também referência a trabalhos semelhantes, executados com as mesmas partes da planta, em quatro outras espécies de capim de Nova Zelândia, do gênero arundinoide.

Deve-se mencionar, finalmente, o interessante trabalho de MORRISON (86) que extraiu da folha, da bainha e do caule do Lolium perenne (de quatro variedades), complexos de lignina-carboidrato e lignina-hemicelulose. Os complexos das folhas evidenciaram maior teor de D-glucose que os de outros tecidos. Além da D-glucose havia ainda outros açúcares neutros presentes nestes complexos, tais como L-arabinose e D-xilose. Verificou ainda que, à semelhança dos complexos lignina-carboidrato, os complexos lignina-hemicelulose da folha possuíam menor teor de lignina.

Revisando a bibliografia referente aos polissacarídeos em Coffea arabica, var. Mundo Novo, verificou-se que o único tecido do cafeeiro estudado do ponto de vista dos polissacarídeos era o grão de café nas suas diversas partes constituintes. Mencionar-se-ão, em primeiro lugar, uma série de trabalhos, de caráter mais geral. Entre estes podem-se mencionar os seguintes: THALER (119) comparou os carboidratos altamente polimerizados do café antes e

depois de torrado. Noutros trabalhos, relacionados com este, THALER & ARNETH (117, 118, 120) estudaram os polissacarídeos do grão verde, o comportamento e as transformações por que passavam os polissacarídeos durante o processo de torrefação. THALER (114, 115) estudou ainda a composição, em açúcares, dos precipitados etanólicos obtidos dos extratos de café torrado com água quente e fria, consistindo o sedimento da principal fração de D-glucose, D-manose e L-arabinose. Finalmente, GLOMAUD et al. (67), juntamente com um estudo de oligossacarídeos, apresentaram um estudo preliminar dos polissacarídeos solúveis em água quente e fria de cinco variedades de café; os polissacarídeos eram compostos principalmente de D-galactose, L-arabinose e pequenas quantidades de ácido urônico. PICTET & MOREAU (93) estudaram os polissacarídeos solúveis em água, extraídos de grãos de café submetidos a diferentes temperaturas. Até mesmo os polissacarídeos contidos no café solúvel (um arabinogalactano e um manano) foram motivo de estudo por parte de WOLFROM & ANDERSON (137), detectando um teor de L-arabinose menor neste arabinogalactano do que no arabinogalactano do grão de café verde.

Referir-se-ão, em segundo lugar, trabalhos mais específicos. Menção será feita à pesquisa em torno da celulose, de manano, de um polissacarídeo composto de D-galactose e L-arabinose e de polissacarídeos ácidos.

A celulose do grão de café (5 % do peso seco) foi estudada por WOLFROM & PATIN (135).

A primeira notícia de um manano presente no grão de café da-

ta do século passado, 1895, através de um estudo de GILSON (66). Outros estudos realizados por THALER (113, 116) referem-se a um manano presente no café torrado. Mais tarde, em 1961, WOLFROM et al. (136) isolaram e caracterizaram um manano extraído do grão de café verde.

WOLFROM & PATIN (138) estudaram estruturalmente um arabino-galactano, solúvel em água, isolado do grão de café. CORRÊA (46) e CORRÊA & FONTANA (47), por sua vez, estudaram um galactoarabano neutro extraído do epicarpo e mesocarpo do fruto de café em cereja.

Os polissacarídeos ácidos foram estudados por vários autores. COLEMAN et al. (44) estudaram o ácido péctico da camada mucilaginosa do grão de café em cereja. HERNAN (78) apresentou métodos de extração da pectina da polpa do grão de café. Em 1968, apareceu um estudo de SHADAKSARASWAMY (103) sobre polissacarídeos solúveis em meio ácido, extraídos de sementes de café. Finalmente merecem menção os trabalhos de CORRÊA et al. que estudaram o fracionamento e os produtos de hidrólise parcial da pectina solúvel em água, extraída do epicarpo e mesocarpo de frutos de café em cereja (48), estudo que foi completado com a análise estrutural do mesmo polissacarídeo (49).

Pela revisão acima, pode-se verificar que nenhum trabalho sobre polissacarídeos em folha de cafeeiro foi encontrado. Esta verificação é corroborada pela afirmativa de HENDERSON & HAY (76) de que, excluindo-se o estudo das pectinas e de um glucano semelhante ao amido, extraído de folhas de Basella rubra, existem apenas notícias preliminares sobre carboidratos de folhas de plantas le -

nhosas. Estes fatos, juntamente com a constatação de que as folhas de Coffea arabica, var. Mundo Novo, da família das rubiáceas, são alvo constante de uma das pragas mais temidas pelos cafeicultores do Brasil, a ferrugem (Hemileia vastatrix), constituem motivação suficiente para o estudo dos polissacarídeos das folhas da Coffea arabica, por serem estas macromoléculas a mais provável fonte de carbono da ferrugem. Como as pectinas já foram estudadas no epicarpo e mesocarpo do café cereja (48,49) e como do ponto de vista estrutural estes polissacarídeos ácidos não devem ser essencialmente diferentes das pectinas de folhas, optou-se pelo estudo das hemiceluloses da folha de cafeeiro. Neste estudo maior ênfase foi dada ao esquema de fracionamento, purificação e determinação da composição das diferentes frações polissacarídicas e a análise estrutural de uma das frações.

2. PROBLEMAS EM TORNO DO CONCEITO DE HEMICELULOSE.

2.1. Célula vegetal e sua composição.

Polissacarídeos de plantas ostentam uma grande variedade de estruturas. Do ponto de vista de origem podem ser classificados em dois grupos (14): polissacarídeos de parede celular e polissacarídeos de reserva.

Mas antes de falar dos polissacarídeos da parede da célula vegetal e da sua localização nesta mesma célula, é necessário descrevê-la sucintamente (51).

A parede celular (51, 121) apresenta, basicamente, a seguinte estrutura: uma parede primária (mais fina) e uma parede secundária (mais espessa), depositada sobre a face interna da parede primária (16), na qual se pode distinguir uma camada externa (S_1), uma camada média (S_2) e uma camada interna (S_3). O espaço intersticial entre uma célula e outra é a lamela média (substância intercelular) (77, 132). A lamela média e a parede primária são ricas em material péctico (132). A lignina (cuja concentração pode variar de 15-35 %) (68) é a substância predominante da lamela média, segundo alguns autores (68, 132; mas TALMAGE et al. (112) e TIMELL (121) afirmaram que é a substância predominante da parede secundária. WHISTLER e SANELLA (131) levantaram a hipótese da existência de ligações covalentes entre hemicelulose e lignina, as quais foram confirmadas por MORRISON (86), em recente artigo, onde estudou um complexo de lignina-hemicelulose e outro de lignina polissacarídeo, extraídos tanto de folhas como de caule de Lo-

lium perenne. Quando o complexo lignina-hemicelulose foi extraído com dimetilsulfóxido verificou-se uma banda de absorção a 325 nm que é a banda característica da ligação éster. MORRISON (86) acrescentou ainda que não se deve rejeitar a possibilidade da existência dos complexos de lignina-pectina e lignina-proteína.

A parede primária é a parte da parede celular depositada por células jovens não-diferenciadas, que ainda estão em crescimento (112). A parede celular secundária é formada depois que a célula parou de crescer. As paredes primárias de muitas células de plantas superiores apresentam características comuns e devem, por isso, ter estruturas muito semelhantes. O mesmo não sucede com as paredes secundárias, onde a composição e a ultraestrutura variam consideravelmente de célula para célula (112). As paredes celulares primárias de uma grande variedade de plantas contém uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (112), que corresponde a 2-10 %, em peso, da parede celular. Segundo BOUNDY et al. (31), o polipeptídeo de hidroxiprolina está associado covalentemente com a hemicelulose, formando mucopolissacarídeos, cuja composição de açúcares é: D-xilose, D-glucose, D-galactose e L-arabinose (68).

A massa da parede primária consiste em material amorfo, envolvendo as fibrilas de celulose (104). Estes componentes não-celulósicos tem sido descritos como agentes cementantes que interligam as fibrilas e as microfibrilas, constituídas de moléculas de celulose com elevado grau de polimerização. Os polissacarídeos não-celulósicos tem sido definidos operacionalmente por sua presença nas frações obtidas por consecutiva extração química das paredes celulares. As duas principais frações polissacarídicas

não-celulósicas são a pectina e a hemicelulose. Aquela é obtida por extração das paredes celulares vegetais com água quente, com oxalato de amônio a 0,5 % ou com EDTA, ou com ácido diluído (14, 112). E esta é extraída, normalmente, com álcali. A natureza das hemiceluloses extraídas de diferentes tecidos vegetais varia consideravelmente (112). Juntamente com as substâncias pécticas, constituem a principal porção da parede primária, sendo que os xilanos, mananos e galactanos são os principais constituintes da parede secundária (16).

Após as generalidades sobre a parede celular vegetal, convém recordar algumas particularidades do tecido da folha. Segundo GOODMAN et al. (68), a parede celular epidérmica é um sistema de defesa externo, altamente complexo. As paredes de outros tipos de células (células reticuladas do parênquima, do floema, da endoderme da raiz) possuem certas camadas comuns, mas as células epidérmicas apresentam, em geral, o mais complexo arranjo de lamelas de diferentes compostos químicos. A superfície da célula epidérmica, em muitas espécies de plantas, apresenta projeções de cera. Imediatamente abaixo da superfície cérica, está o início da cutina de variada espessura, densamente impregnada com cera (68). À medida em que se penetra mais profundamente pela parede epidérmica a cera se adelgaça em plaquetas que estão mergulhadas em cutina. A cutina, por sua vez, também diminui de concentração, sendo eventualmente intersticiada por pectina. Este polissacarídeo ocorre, em algumas espécies, em camadas homogêneas que vão cedendo lugar a sempre maiores quantidades de celulose, que, finalmente, assume proporções de uma camada densa, conhecida como parede secundária. Na lamela interior da parede celulósica encontram-se

apreciáveis quantidades de proteína, cuja concentração aumenta à medida que a membrana de fosfolipídeo do plasma é atingida (68).

2.2. Conceito de hemicelulose.

Antes de ser abordado o conceito de hemicelulose convém definir ou descrever sucintamente os termos: "substâncias pécticas", "gomas de plantas" e "mucilagens de sementes e cascas" que estão intimamente associadas com as hemiceluloses. Os termos "celulose" e "polissacarídeos de reserva" são por demais conhecidos para merecerem destaque. Por isso, embora participem do complexo mundo de polissacarídeos vegetais nada será acrescentado além do que tenha sido alinhado acima.

2.2.1. Conceito de pectina (68).

Conforme ASPINALL (14), as pectinas ou substâncias pécticas são encontradas em todas as paredes celulares primárias de plantas terrestres e na lamela média das células. São mais abundantes nos parênquimas corticais como na casca do limão, nas maçãs (onde perfazem 30 % e 15 %, respectivamente), mas encontram-se também em pequenas proporções nos tecidos lenhosos. O termo "substâncias pécticas", geralmente, é usado, quando se quer designar o grupo de polissacarídeos complexos de plantas em que o ácido D-galacturônico é o principal constituinte; o termo "pectina" é usado em relação aos polissacarídeos solúveis em água, capazes de formar géis. Os polissacarídeos (14,16), em que uma parte do ácido D-galacturônico se encontra sob a forma de éster metílico (58 - 80 %) é designado de "ácido pectínico" (com grau de polimerização que varia de 1000 a 2000 unidades). Os polissacarídeos em que a este-

rificação não se verifica mas estão sob a forma de sais de cálcio, são chamados de "ácidos pécticos" (com grau de polimerização de cerca de 100). Embora o ácido D-galacturônico seja o principal constituinte das substâncias pécticas, proporções diferentes de outros açúcares, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose e traços de 2-O-metil-D-xilose (14,32) e 2-O-metil-L-fucose (14, 32) estão presentes.

2.2.2. Conceito de goma.

As gomas de plantas (13, 14) podem ser descritas como fluidos viscosos, exsudados que, após desidratação natural, dão origem a nódulos duros e claros, constituídos, principalmente, de polissacarídeos. Estes possuem estruturas complexas, altamente ramificadas, formadas de ácidos hexurônicos (ácido D-glucurônico e/ou ácido D-galacturônico) e dois ou mais açúcares neutros. Os resíduos ácidos estão, em a natureza, sob a forma de sais e alguns dos grupos hidroxílicos formam ésteres com o ácido acético.

2.2.3. Conceito de mucilagem.

A mucilagem (13, 14) de sementes e cascas, finalmente, pertencem a diferentes grupos estruturais nos quais se podem distinguir polissacarídeos ácidos e neutros. Sua função, provavelmente, é, segundo ASPINALL (14), a de reter água e assim proteger as sementes contra a desidratação. Os D-galacto-D-mananos e os D-glucos-D-mananos são, geralmente, os polissacarídeos mucilaginosos presentes nas sementes. Os L-arabino-D-xilanos e os D-xilo-L-arabanos ocorrem, frequentemente, associados com polissacarídeos ácidos.

2.2.4. "Definições" de hemicelulose.

Pelo visto acima, ao ser mencionado o termo hemicelulose, sua intelecção parecia estar completa. Mas o que se quer, realmente, entender, ao mencionar o termo hemicelulose, no campo da química dos carboidratos, não está nada claro.

Confrontando diferentes definições de hemicelulose, percebeu-se que não havia uniformidade entre elas e que cada autor definia este termo de um ponto de vista diferente, a ponto de WISE e RATLIFF (133) introduzirem, em seu artigo, um capítulo intitulado de "dificuldades semânticas", para trazerem um pouco mais de luz sobre o emaranhado de conceitos de polissacarídeos da parede celular vegetal.

Em 1959, WHISTLER & SANELLA (131) escreveram: "O maior problema de nomenclatura, aqui, pode ser o próprio nome hemicelulose. É tão pobremente definido que o "American Polysaccharide Nomenclature Subcommittee of the Carbohydrate Nomenclature Committee" não pôde chegar a um acordo sobre seu significado e por isso não fez nenhuma recomendação a respeito".

O termo hemicelulose foi adotado por SCHULZE, em 1891 (99, 100, 121, 132), para designar os componentes da célula vegetal solubilizável com álcali diluído ou aqueles que passassem facilmente para a solução sob a forma de açúcares simples, quando colocados em ácidos minerais diluídos, a quente. Mas segundo interpretação de CZAPEK (50), SCHULZE teria designado de hemiceluloses os polissacarídeos da parede celular vegetal que hidrolizavam mais facilmente, em meio ácido diluído, a quente, do que as ce-

luloses; e não menciona a solubilização em meio alcalino. Esta definição, evidentemente, não pode ser sustentada, sem negar seu valor histórico, porque soluções alcalinas diluídas não solubilizam apenas hemiceluloses, pectinas e polissacarídeos de reserva, mas também lignina e proteína. Além do mais, os polissacarídeos de reserva, as pectinas e as gomas também formam açúcares simples, quando aquecidos em meio ácido diluído.

ANDERSON e SANDS (6) colocaram as hemiceluloses num grupo de polissacarídeos que eles designaram de poliuronídeos, inclusão que obnubila o conceito, pois, os poliuronídeos são, para estes autores, polissacarídeos que possuem um ou mais grupos de ácidos urônicos em sua estrutura molecular. Em resumo, este grupo de polissacarídeos (poliuronídeos) incluiria todos os materiais pécticos, gomas de plantas, mucilagens, hemiceluloses, substâncias que formam géis e alguns polissacarídeos microbianos. Diante da colocação de ANDERSON e SANDS resta a pergunta: onde colocar os homopolímeros neutros como é o caso do xilano do capim esparto (Stipa tenacissima, L.) (43), ou os heteropolímeros neutros tais como arabinogalactanos (57), galactoglucomananos (36) que fazem parte do grupo das hemiceluloses? Ora estes homopolímeros e heteropolímeros neutros, mencionados acima, pertencem ao grupo das hemiceluloses. Logo, as hemiceluloses não são necessariamente polissacarídeos que possuem um ou mais grupos de ácidos urônicos (poliuronídeos), embora haja alguns componentes hemicelulósicos que se enquadrem na definição de poliuronídeos.

Dez anos mais tarde, POLGLASE (94) retomou o termo, restringindo-o ao xilano: "os poliuronídeos da polpa podem, por isso,

ser considerados como xilanos acídicos que estão originalmente presentes na madeira". Páginas adiante, na mesma revisão, POLGLASSE (94) designou os polissacarídeos, associados com a celulose da madeira, de "polioses", recordando, assim, o termo sugerido, anteriormente, por STAUDINGER & REINECKE (94). E entre as polioses coloca os xilanos, os mananos, etc.

Outra é a definição de KRATZL (83): "Por hemiceluloses entendem-se os polissacarídeos da madeira que possuem cadeia curta, vários heterogrupos (principalmente grupos carboxílicos) e constituídos, essencialmente, por pentoses (D-xilose). Por isso são designados como poliuronídeos ou pentosanos". Mais recentemente também GREMLI & JULIANO (70) identificaram as hemiceluloses com pentosanos.

Tudo parece indicar que o termo poliuronídeo provenha da antiga "teoria da descarboxilação", na qual se supunha que a celulose fosse oxidada a um poliglucoronídeo e este, por sua vez, descarboxilando, daria origem a um xilano; o termo pentosano, certamente, provém da semelhança estrutural entre hexosano e pentosano, polissacarídeos formados principalmente por resíduos de pentoses (D-xilose e L-arabinose). KRATZL, entretanto, segundo sua definição (83), exclui os mananos, os glucomanos, etc. Além do mais, serão os heterogrupos característica essencial das hemiceluloses? Não apresentam as pectinas, as gomas, as mucilagens o mesmo grupo carboxílico (heterogrupo)? Não existem, porventura, hemiceluloses também em outros tecidos de plantas, a saber, casca, raiz, folha, bainha, além do caule?

WHISTLER & SANELLA (131), depois de sublinharem o problema do conteúdo inerente ao termo hemicelulose, como vimos acima, e, depois de sugerirem, inclusive, a abolição do mesmo, escreveram: "o grupo de polissacarídeos que êle (o termo hemicelulose) representa, pode, simplesmente, ser designado como sendo o dos polissacarídeos não-celulósicos da parede celular". Para excluírem, porém, as pectinas, acrescentaram: as hemiceluloses são "polissacarídeos não-celulósico-não-pectínicos das paredes celulares de plantas superiores" (131, 134). Esta definição, embora retomada por HENDERSON & HAY (76), em 1972, por ser de caráter negativo, nada esclarece; por isso é falha e para ser completa deveria excluir todas as possibilidades, o que levaria a um número infinito de negações. Ora, os seres - no presente caso as negações - não se devem multiplicar ao infinito. Logo tal definição nada define e nega seu próprio conceito. Porisso gera dúvidas pois as mucilagens, as gomas, os polissacarídeos de reserva são tão "não-celulósico-não-pectínicos" quanto as hemiceluloses.

Neste mesmo ano (1959), entretanto, ASPINALL (12), numa revisão bibliográfica escreveu que o termo hemicelulose é aplicado aos polissacarídeos da parede celular que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente, em tecidos lignificados. Mais adiante, na mesma revisão, menciona explicitamente, tres grupos principais de polissacarídeos, do ponto de vista dos resíduos de açúcares constituintes que compõem o grande grupo das hemiceluloses: os xilanos (constituídos basicamente de D-xilose) os mananos e/ou glucomananos (constituídos de D-manose e/ou D-manose com D-glucose) e os galactanos (constituídos de D-galactose). Poucos anos mais tarde, ASPINALL (11) explicita, numa nova revisão,

a definição acima: "Na ausência de definições estritas, o termo hemicelulose será tomado no sentido de incluir aqueles polissacarídeos de origem vegetal que contém cadeias básicas de D-xilose, D-manose e D-glucose ou D-galactose, às quais podem estar ligadas outros resíduos de açúcares, muitas vezes em proporções substanciais, como cadeias laterais".

Tomando-se por base ainda outra revisão de ASPINALL (14), surge, novamente, a pergunta: os L-arabanos, os D-galactanos, os L-arabino-D-galactanos, os D-galacto-D-mananos, os L-arabino-D-xilanos e outros polissacarídeos semelhantes, extraídos de sementes ou tubérculos, são hemiceluloses ou são mucilagens? Pois, é o próprio ASPINALL (14) que coloca os polissacarídeos acima mencionados sob o título de "pectinas, gomas e outros polissacarídeos de plantas". E se não for esquecido o vasto campo das algas que também pertencem ao reino vegetal, ficar-se-á em dúvida sobre a classificação em que se devem incluir os D-xilanos e os D-mananos que também podem ser extraídos da parede celular das algas. E a incerteza de classificação aumenta, quando PERCIVAL (92), numa revisão sobre polissacarídeos de algas, faz apenas uma nebulosa menção das hemiceluloses: "Assim como as hemiceluloses de plantas superiores, outros polissacarídeos tais como D-xilanos e D-mananos parecem estar muito intimamente associados à celulose das algas".

Até 1970, o problema semântico não clareou, pois, neste mesmo ano, WHISTLER & RICHARDS (132) escreveram: "Muitos pesquisadores limitam o termo hemicelulose, para designar os polissacarídeos da parede celular de plantas terrestres, com exclusão da

celulose e da pectina, e os classificam segundo os tipos de resíduos que contém".

2.2.5. Definição de holocelulose.

O termo "holocelulose" foi introduzido por RITTER & KURTH (94), para designar o resíduo obtido de tecidos vegetais, a saber, caule, raiz, casca e folha, após sua delignificação por alternados tratamentos com cloro e álcool-piridina, ou por qualquer outro método de delignificação, após prévia remoção de lipídios e pectinas.

2.3. Classificação das hemiceluloses.

Embora a composição química das hemiceluloses seja constituída de diferentes polissacarídeos (D-xilanos, D-mananos, L-arabino-D-xilanos, etc.) usa-se, até hoje, a classificação das hemiceluloses em hemicelulose A e hemicelulose B. Esta classificação foi introduzida pela química O'DWYER (89), em 1926.

A hemicelulose A (61) é, normalmente, considerada como sendo a fração da hemicelulose total que precipita, quando o extrato alcalino de holocelulose (ou de paredes celulares de dicotiledôneas lenhosas não delignificadas) é neutralizado ou levado até pH 5,0-5,5. A hemicelulose B é obtida por precipitação etanólica do filtrado original da hemicelulose A. A hemicelulose B é uma mistura de diferentes polímeros quer lineares quer ramificados. A hemicelulose A, porém, é considerada homogênea, após repetidas precipitações, por neutralização, da solução alcalina (61).

Não eram passados dez anos, BUSTON (39) sugeriu, em 1935,

que já era tempo de modificar a classificação das hemiceluloses em A e B, na qual se usa o critério de solubilidade. Mas BUSTON não ficou apenas nisto. Propôs uma classificação das hemiceluloses nos seguintes tipos de compostos: (I) compostos com predominância de hexosanos; (II) compostos intermediários que compreenderiam os uronídeos de hexosanos, pentosanos, etc., podendo ter qualquer grau de oxidação; (III) compostos com predominância de pentosanos, tais como D-xilanos. Pelo visto, esta classificação não passou de mera sugestão. Diferentemente, aconteceu com a proposição de GAILLARD (60, 61) que não rejeitou a classificação de O'DWYER (89) mas ampliou sua chave (27), subfracionando a hemicelulose B em linear e ramificada. Este subfracionamento é feito através da dissolução da hemicelulose B em cloreto de cálcio concentrado e sendo o polissacarídeo precipitado com uma solução de iodo-iodeto de potássio. Os polímeros que precipitam, após a adição do iodo, constituem a fração linear (L) e os que permanecem em solução, recuperados por precipitação etanólica, constituem a fração ramificada (R). Desta forma a hemicelulose B é subdividida em fração ramificada (B.R) e linear (B.L).

Embora seja generalizado o uso da divisão da hemicelulose em A e B, segundo o critério acima explicitado, encontra-se, na literatura, outra classificação, pouco usada, que designa por hemicelulose A e hemicelulose B (133) os extratos alcalinos obtidos com diferentes concentrações de álcalis (5 % e 24%, respectivamente).

BLAKE et al. (28), recentemente, numa crítica ao fracionamen-

to convencional das hemiceluloses extraídas com álcalis, propuseram um método, que, segundo eles, é mais reprodutivo e possibilita a obtenção de três frações: A, B e C. A extração alcalina seria feita como sempre. Mas, em vez de neutralizar o extrato alcalino com ácido acético a 50 %, propuseram a neutralização com simultânea deionização por resina catiônica; a fração insolúvel seria a fração A; a fração B seria o precipitado etanólico obtido, usando três volumes de álcool etílico como agente precipitante; e a fração C seria a fração polissacarídica que permaneceu em solução, ao ser precipitada a fração B. A fração C seria recuperada por concentração em evaporador a vácuo e subsequente liofilização.

2.4. Composição das hemiceluloses (12, 121, 122, 132).

As hemiceluloses de plantas terrestres são constituídas por limitado número de resíduos de açúcares. Os principais, segundo TIMELL (121) são os seguintes: a D-xilose, a D-manose, a D-glucose, a D-galactose, a L-arabinose, o ácido 4-O-metil-D-glucurônico, o ácido D-galacturônico e o ácido D-glucurônico; e os menos frequentes são a L-ramnose, a L-fucose e vários açúcares neutros O-metilados. Isto não significa que se possam isolar tantos homopolímeros quantos são os resíduos de monoaçúcares obtidos na hidrólise das hemiceluloses. Pelo contrário, à cadeia principal dos polissacarídeos isolados de plantas (hemiceluloses) costumam estar ligados um ou mais heteroresíduos. Por isso os polissacarídeos hemicelulósicos costumam ser classificados segundo os tipos de resíduos de açúcar que contém. Servindo-se deste critério, ASPINALL (12), numa classificação ampla, menciona tres grupos prin-

cipais: xilanos, mananos e/ou glucomananos e galactanos. Mas WHIS-
tler & RICHARDS (132) observaram que os homoglicanos não ocorrem
em grandes proporções. "A maioria das hemiceluloses são heterogli-
canos, contendo dois a quatro e, raramente, cinco ou seis diferen-
tes tipos de resíduos de açúcar. Os heteroglicanos que comumente
ocorrem são L-arabino-D-xilanos, L-arabino-D-glucurono-D-xilanos,
4-O-metil-D-glucurono-D-xilanos, L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)
-D-xilanos, D-gluco-D-mananos, D-galacto-D-gluco-D-mananos e L-a-
rabino-D-galactanos"(132).

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. Materiais e métodos gerais.

O grau de pureza das diferentes frações polissacarídicas foram verificadas por eletroforese em papel acetilado (Cellologel), após coloração das mesmas com azul de Procion M-3G (Cia. Imperial de Indústrias Químicas do Brasil), segundo o método de DUDMAN & BISHOP (54), em tampão borato 0,2 M e pH 9,2. A eletroforese foi realizada em aparelho FANEM, com câmara de imersão CHEMETRON, aplicando-se uma diferença de potencial de 245 volts e uma corrente de 4-5 mA.

A rotação ótica foi determinada em polarímetro PERKIN ELMER, modelo 141, a 25°C e banda D de sódio.

Na análise por cromatografia gasosa (GLC), usou-se o cromatógrafo F&M, modelo 810 R-12, com detector de ionização de chama, utilizando-se como gás de arraste o hélio. Os seguintes tipos de coluna foram utilizados nesta análise. Coluna-a: 14% p/p LAC-4R-886 sobre "chromosorb W" de 80-100 mesh (DM SC), em tubo de cobre de 100 X 0,4 cm (d.i.), a 155°C, com detector a 225°C e câmara de injeção a 205°C e fluxo de hélio a 25 ml/min para açúcares metilados (108); coluna -b: 3% de ECNSS - M sobre Gás Chrom Q de 100-120 mesh, em tubo de cobre de 120 X 0,4 cm (d.i.) (111), a 170°C, com detector a 250 °C, a câmara de injeção a 230 °C e fluxo de hélio a 25 ml/min para analisar os produtos de hidrólise na forma de alditois acetilados das frações A, A.1, A.2, B, B.1, B.2, B.3, B.2.i, A.1.L.ins., A.1.L.sol., A.1.R, A.2.L.ins.,

A.2.L.sol., A.2.R, B.3.L e B.3.R. Na análise dos produtos da degradação de SMITH, na forma de alditois acetilados, a fração A.2.L.ins. e dos oligossacarídeos ácidos, obtidos por hidrólise parcial ácida desta mesma fração, trabalhou-se com a coluna-b, porém, com temperatura programada de 120-180 °C, com uma variação de 10 °C por minuto, estando a câmara de injeção a 230 °C e o detector a 250 °C. Os tempos de retenção relativos dos produtos de metanólise da fração A.2.L.ins. metilada (Cf. 3.2.10), foram calculados em relação ao β -0-metil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucopiranosídeo na coluna-a. A determinação quantitativa relativa dos derivados metilados foi feita por triangulação. A determinação quantitativa dos derivados acetilados, quer dos produtos da degradação de SMITH da fração A.2.L.ins, quer dos produtos de hidrólise das frações polissacarídicas acima mencionadas, foram feitos pelo método da triangulação, segundo SWARDEKER (111).

A cromatografia em papel foi feita pelo método ascendente, em papel Whatman N° 1, N° 4 e 3MM, usando-se os seguintes sistemas de solventes: A) benzeno:n-butanol:piridina:água (1:5:3:3, v/v, fase superior); B) n-butanol:etanol:água (4:1:5, v/v, fase superior). A visualização dos açúcares foi feita com nitrato de prata alcalino (123); o ftalato de anilina (90) foi usado para revelar açúcares redutores e para distinguir pentoses de hexoses; o cloridrato de p-anisidina (80) foi utilizado na visualização de açúcares redutores; as cetoses e as aldoses foram diferenciadas pelo reagente uréia-ácido clorídrico (17); e a presença de aminoácidos, nos hidrolizados das diferentes frações polissacarídicas, foi visualizada com nihidrina(93, 52).

As hidrólises totais das diferentes frações polissacarídicas foram feitas em ampola selada, com ácido clorídrico 0,5 N, em banho de água fervente, por oito horas. O ácido clorídrico era eliminado por simples evaporação a vácuo. Para completar a remoção do ácido clorídrico novas porções de água era adicionadas ao material hidrolizado, que em seguida também era removida no evaporador a vácuo. Todas as concentrações, no evaporador a vácuo, foram feitas em banho de água na temperatura de 40-45 °C. Mas os produtos de metanólise do polissacarídeo metilado, foram concentrados em banho de água de 20-25°C.

As precipitações alcoólicas eram feitas pela adição da solução polissacarídica a um volume medido de etanol (3-5 volumes). O precipitado era removido por centrifugação, suspenso em água e dializado contra água corrente num tubo de diálise (durante 24-48 h). Em seguida o polissacarídeo era recuperado através de nova precipitação etanólica e o precipitado era, em seguida, submetido a sucessivas lavagens com etanol a 95°C e acetona e secado ao ar.

As frações polissacarídicas bem como os padrões usados nas dosagens colorimétricas foram secados em aparelho de secagem a vácuo de Abderhalden.

As leituras espectrofotométricas foram feitas em aparelho Coleman Junior, Modelo 6 A.

As determinações do nitrogênio total, nas diferentes frações polissacarídicas, foram feitas pelo método do micro-Kjeldahl(91).

A metilação da fração A.2.L.ins. foi acompanhada por espec-

trometria de infravermelho no aparelho BECKMAN-IR-18-SPECTROPHOTOMETER.

Os acertos de pH eram feitos em aparelho CLAMANN & GRALMERT MV 85 (Dresden), quando havia necessidade de muita precisão; em caso contrário o papel indicadro "pHydrion papers 1-12" (B'klyn 10) e "Universalindikator pH 0-10" (Merck) davam precisão suficiente.

3.2. Materiais e métodos especiais.

3.2.1. Preparo do pó cetônico.

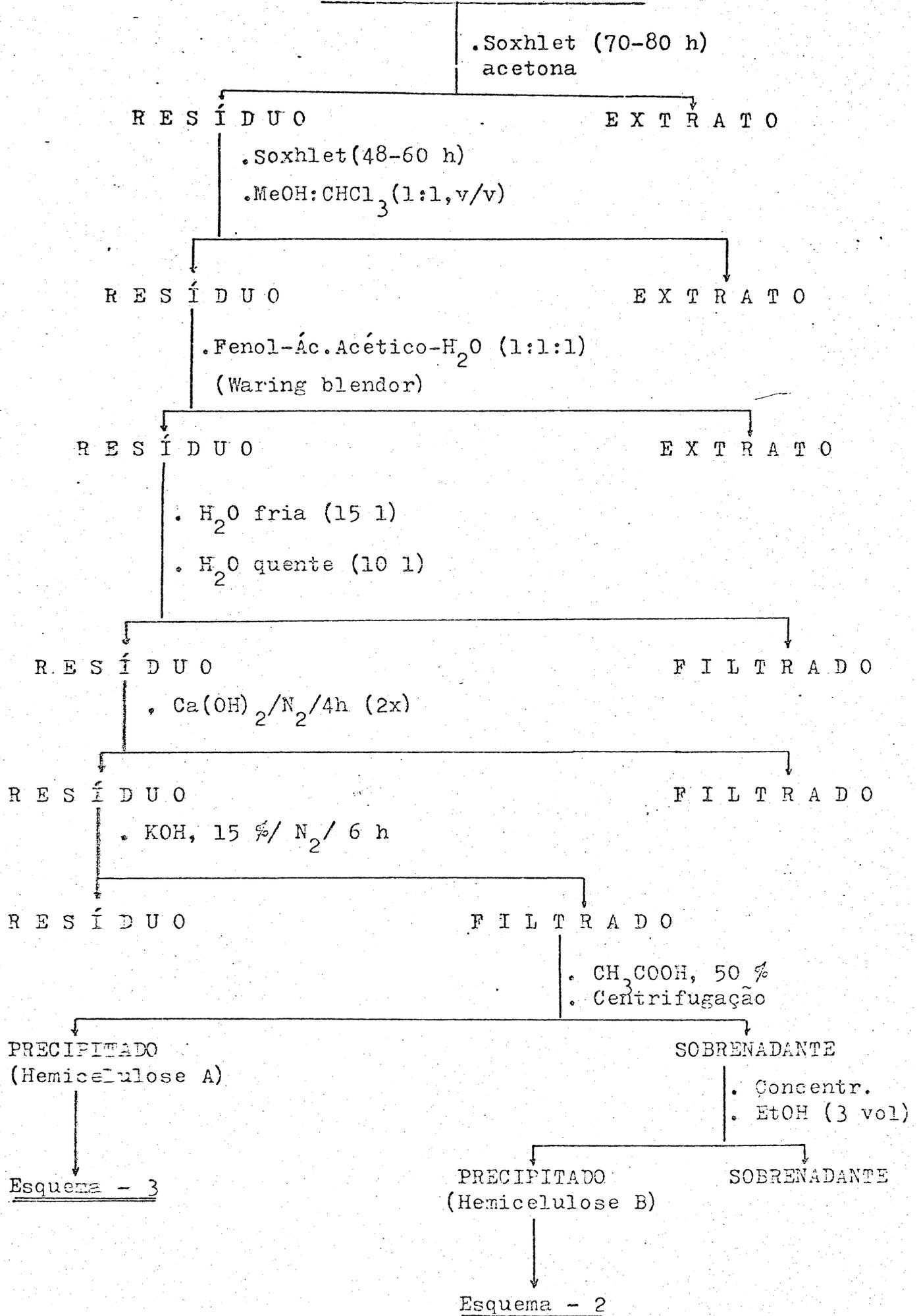
As folhas de cafeeiro, Coffea arabica Linné, var. Mundo Novo, foram colhidas em meados de julho de 1974, na Fazenda das Areias, no município de Boa Esperança, Minas Gerais. Após secagem ao ar, as folhas foram trituradas em moinho Wiley e submetidas ao processo de extração Soxhlet (Esquema-1), usando, primeiro, a acetona (76) como solvente, durante 80 horas; após secagem ao ar, o resíduo foi submetido a uma segunda extração, usando-se a mistura de clorofórmio e metanol (1:1, v/v) (76), por 48 horas. Estas duas extrações tiveram por finalidade remover pigmentos, lipídeos, ceras e açúcares livres.

3.2.2. Determinação do resíduo insolúvel por digestão ácida.

O teor de resíduo insolúvel por digestão ácida foi determinado pelo método descrito por ADAMS (3). Duas amostras de folha de cafeeiro, previamente lavadas com acetona e a mistura de clorofórmio e metanol (Cf. 3.2.1) foram rigorosamente pesadas (2,0 g) cujo teor de umidade era de 9,69 %. Após lavagem com etanol a

ESQUEMA - 1

FOLHA DE CAFEEIRO (PÓ DE)
MOÍDO EM MOINHO WILEY



95 %, em aparelho Soxhlet, por 4 h, e secagem ao ar, as amostras foram misturadas com 400 ml de água e aquecidas por 3 horas à temperatura de banho de água fervente. Após filtração e lavagem a amostra foi secada ao ar. Seguiu-se digestão da amostra com 15ml de ácido sulfúrico a 72 %, num banho-maria a 20 °C, por duas horas e com agitação. Em seguida, o ácido sulfúrico foi diluído para 3 % pela adição de 345 ml de água destilada e posto a refluxar por 4 horas. A mistura digestiva foi, em seguida, filtrada por funil de placa porosa F, previamente tarado. O resíduo retido foi lavado exaustivamente com água quente, para remover o ácido sulfúrico e secado em estufa (100-105 °C) até peso constante.

3.2.3. Isolamento e processos de fracionamento da hemicelulose da folha de cafeeiro.

O pó cetônico das folhas de cafeeiro (456,5 g) foi lavado com uma mistura de fenol-ácido acético glacial-água (1:1:1; p/v/v) (5,0 l), num "Waring blender", por 10 minutos (76, 15), para extrair as proteínas (Esquema - 1). Em seguida, a massa de folhas de cafeeiro triturada, agitada em "Waring blender", com o sistema de solventes desproteinizante, foi derramada num Büchner e filtrado através de pano. O resíduo de folhas foi lavado, então, com água fria (15,0 l) até desaparecimento do cheiro de fenol. O resíduo foi lavado, a seguir, com água a 80 °C (10,0 l), até teste negativo de Molish (76). Os filtrados e os líquidos de lavagem foram desprezados. O resíduo remanescente da lavagem com água quente foi submetido a duas extrações com água de cal, cada uma de quatro horas, à temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio (76). Os filtrados e os líquidos de lavagem foram novamente des-

prezados. O resíduo úmico foi submetido à extração com hidróxido de potássio a 15 %, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo contínuo) e à temperatura ambiente, durante seis horas (Esquema - 1).

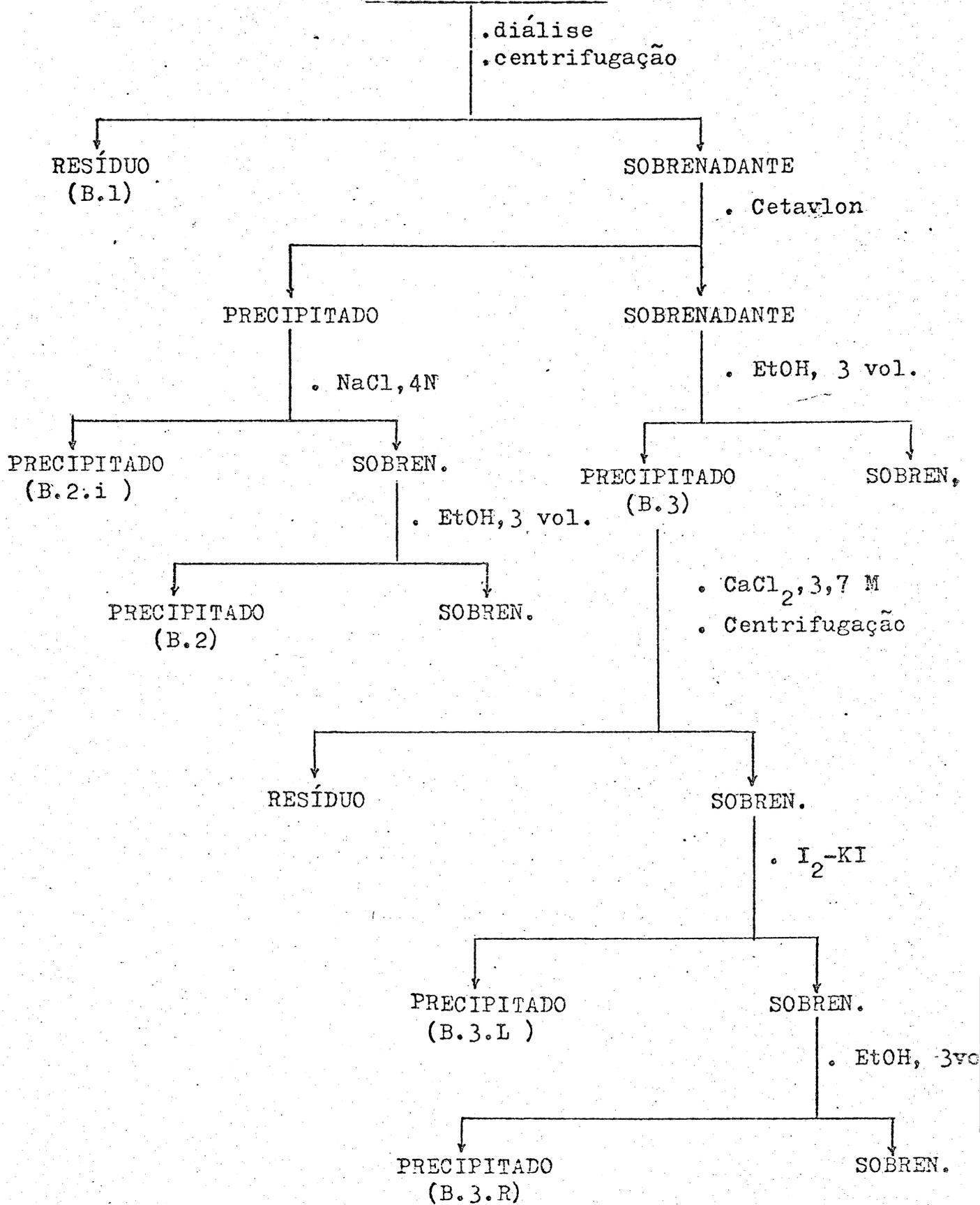
O extrato alcalino (4,0 l), após filtração em pano, mais os líquidos de lavagem (1,0 l), foram reunidos e, logo após, neutralizados com ácido acético a 50 % e o pH levado até 5,0. O resíduo remanescente da extração alcalina foi desprezado. A hemicelulose A precipitou com a acidificação do filtrado (pH 5,0) e a hemicelulose B permaneceu em solução. Após repouso de 24 horas as duas frações foram separadas por centrifugação. O sobrenadante foi concentrado até um volume de 800 ml e adicionado a três volumes de etanol para a precipitação da hemicelulose B que foi recuperada por centrifugação. O sobrenadante etanólico foi desprezado.

3.2.3.1. Fracionamento da hemicelulose B.

A hemicelulose B (Esquema - 2) foi suspensa em pequeno volume de água e dializada contra água corrente (48 horas). O material insolúvel do dializado foi removido por centrifugação e lavado exaustivamente com água. O sobrenadante e os líquidos de lavagem foram reunidos. O resíduo obtido nesta operação foi designado de fração B.1. Ao sobrenadante mais os líquidos de lavagem reunidos, após correção de seu pH para 7,0 com hidróxido de sódio 1,0 N, foi adicionado suficiente sulfato de sódio anidro até concentração final de 0,02 M deste sal (102). A esta solução foi adicionado lentamente, sob agitação, brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon) para separar os polissacarídeos ácidos dos neutros. Nesta operação de precipitação foram levadas em conta as concen-

ESQUEMA - 2

HEMICELULOSE - B



trações e proporções ótimas de polissacarídeo e de detergente (101, 102). Após repouso de uma noite o sobrenadante e o precipitado foram separados por centrifugação. O complexo polissacarídeo-detergente (precipitado) foi dissolvido em cloreto de sódio 4 N, permanecendo, porém, pequena porção insolúvel que foi removida por centrifugação e designada de fração B.2.i. A fração polissacarídica solúvel em cloreto de sódio foi precipitada com etanol (3 volumes) e centrifugada, desprezando-se o sobrenadante etanólico. O precipitado obtido foi denominado de fração B.2.

O sobrenadante da precipitação com Cetavlon foi adicionado a tres volumes de etanol e o precipitado obtido foi recuperado por centrifugado e denominado de fração B.3. O sobrenadante etanólico foi desprezado.

As frações B.2, B.2.i, e B.3 foram dissolvidas em água, dializadas, reprecipitadas com etanol e lavadas sucessivamente com etanol a 95 % e acetona. Em seguida, as frações foram secadas ao ar e depois no aparelho de secagem de Abderhalden. A fração B.3 foi, posteriormente, submetida ao fracionamento com iodo-iodeto de potássio (Cf.3.2.3.3).

3.2.3.2. Fracionamento da hemicelulose A.

A hemicelulose A, composta, principalmente, por resíduos de D-xilose e ácido urônico foi submetida , após diálise de 48 horas, a dez tratamentos desproteinizantes pelo método de Sevag (107), a pH neutro, para remover proteínas contaminantes (Esquema - 3).

Após a desproteinização com a mistura de Sevag (107), a fra-

ção polissacarídica foi suspensa em hidróxido de bário 0,05 N (500 ml), sob atmosfera de nitrogênio, na tentativa de separar o xilano de outros polissacarídeos contendo D-manose (84). O material foi parcialmente solubilizado e, em seguida, centrifugado. Obteve-se, assim, um resíduo e um sobrenadante. O resíduo, após exaustiva lavagem com hidróxido de bário 0,01 N, foi suspenso em água e dializado. Este resíduo foi denominado de fração A.2. O sobrenadante, mais os líquidos de lavagem, foram dializados e, em seguida, adicionados a etanol (3 volumes). O precipitado obtido foi denominado de fração A.1. Estas duas frações, assim obtidas, após lavagens sucessivas com etanol a 95 % e acetona, foram secadas ao ar e guardadas para posterior fracionamento com iodo-iodeto de potássio (Cf. 3.2.3.3).

3.2.3.3. Fracionamento com iodo das frações A.1, A.2 e B.3.

Na separação dos polissacarídeos lineares dos ramificados foi aproveitada a sugestão de GAILLARD (60, 61). As frações A.1, A.2 (Esquema - 3) e B.3 (Esquema - 2) foram escolhidas para sofrerem este fracionamento.

A fração A.2 (10,65 g) foi dissolvida em hidróxido de sódio 1,0 N (150 ml) sob atmosfera de nitrogênio. O material solubilizado e posteriormente neutralizado foi posto a dializar por 24 horas. Ao dializado (500 ml) de A.2 adicionou-se, em banho de gelo, cloreto de cálcio (162,15 g), para obter uma concentração de cerca de 32,4 % de sal (equivalente a 3,7 M). Após duas horas de agitação, a solução polissacarídica em cloreto de cálcio foi centrifugada a 10 000 r.p.m. por 5 minutos. Obteve-se, assim,

um resíduo e um sobrenadante (solução polissacarídica). O resíduo foi resuspenso em solução de cloreto de cálcio 3,7 M e, após duas horas de agitação, foi centrifugado como antes. O sobrenadante obtido foi reunido ao anterior. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. No final desta operação o resíduo foi desprezado. Aos sobrenadantes reunidos foi adicionado, sob agitação, uma solução de iodo-iodeto de potássio (3 % e 4 %, respectivamente), na proporção de 15 ml de solução de iodo-iodeto de potássio para 100 ml de solução polissacarídica em cloreto de cálcio.

Formou-se um complexo insolúvel de cor azul escura. Após duas horas de repouso a fração solúvel (ramificada) foi separada da insolúvel (linear) por centrifugação (10 000 r.p.m./10 min). O precipitado (fração linear) foi lavado tres vezes com uma mistura das soluções de cloreto de cálcio e iodo-iodeto de potássio nas mesmas proporções utilizadas na precipitação.

O sobrenadante, juntamente com os líquidos de lavagem, de cor marron-claro, após filtração em funil de placa porosa M e remoção do iodo livre remanescente pela reação com tiosulfato de sódio (solução saturada), foi derramada sobre etanol (5 volumes). O precipitado que se formou era constituído pelos polissacarídeos ramificados que compõem a fração A.2 e designada por fração A.2.R.

O precipitado de cor azul escuro, resultante da complexação da fração A.2 com iodo, foi suspensa em água quente para eliminar parte do iodo. O restante do iodo que formava o complexo iodo-polissacarídeo foi removido com solução saturada de tiosulfato. À suspensão polissacarídica de cor clara resultante, foi adicionada

a tres volumes de etanol e centrifugada. O precipitado, constituído pelo polissacarídeo linear, foi denominado de fração A.2.L. Esta fração, após suspensão em ácido clorídrico 0,1 N, seguida de neutralização foi adicionada a etanol (3 volumes). O precipitado, separado por centrifugação, foi suspenso em pequeno volume de água e dializado contra água corrente; este tratamento teve em mente eliminar íons de cálcio ligados e ocluídos. A suspensão dializada foi, em seguida, centrifugada. O precipitado obtido denominado de fração A.2.L.ins. e o sobrenadante, depois de adicionado a etanol (3 volumes) deu um precipitado que foi denominado de fração A.2.L.sol.

As frações A.2.R, A.2.L.ins. e A.2.L.sol. foram, depois, lavadas sucessivamente com etanol a 95 % e acetona, a fim de facilitar a secagem ao ar e, finalmente, a vácuo no aparelho de Abderhalden.

As frações A.1 (Esquema - 3) e B.3 (Esquema - 2) foram submetidas ao mesmo processo de fracionamento que A.2. Houve, porém, uma alteração operacional com a fração B.3, ou seja, adição de maior quantidade de iodo-iodeto de potássio na reação de complexação devido à dificuldade de precipitação do complexo formado nesta fração. Obtiveram-se, desta forma, as seguintes subfrações: A.1.L.ins., A.1.L.sol., A.1.R, B.3.R e B.3.L.

3.2.4. Composição relativa, em monosacarídeos, das diferentes frações polissacarídicas.

As frações polissacarídicas (cerca de 10 mg): A, A.1, A.2, A.1.L.ins., A.1.L.sol., A.1.R, A.2.L.ins., A.2.L.sol., A.2.R, B,

B.1, B.2, B.3, B.3.L, B.3.R e B.2.i, foram hidrolizadas com ácido clorídrico (0,5 N), em ampolas seladas, em banho de água fervente, durante 8 horas. Após a hidrólise, evaporaram-se os hidrolizados, previamente centrifugados, em evaporador a vácuo, até secura; aos hidrolizados concentrados foi feita uma adição de água que também foi evaporada, a fim de completar a remoção do ácido clorídrico. Os hidrolizados foram, em seguida, reduzidos com boroidreto de sódio, em excesso, pelo período de uma noite. O excesso de reagente redutor foi decomposto pela adição de ácido acético (2 N), até pH 5-6. As frações foram deionizadas por resina trocadora de íons (coluna de 6 X 2 cm, DOWEX 50 W-X8, 200-400 mesh, forma H⁺, usando água como eluente). Os eluatos da coluna (cerca de seis vezes o volume do leito da resina), contendo a mistura de alditois, após evaporação a vácuo, até secura, foram desboratados pela adição de metanol. O excesso de reagente esterificante e o borato de metila formado foram removidos por evaporação no concentrador a vácuo. Após a quinta adição de metanol os alditois foram secados o melhor possível no evaporador a vácuo, a fim de serem submetidos ao processo de acetilação, como vem descrito em 3.2.5.

Outras porções das frações polissacarídicas: A.1.L.ins., A.1.L.sol., A.1.R, A.2.L.ins., A.2.L.sol., A.2.R, B.3.L e B.3.R (cerca de 10 mg) foram hidrolizadas da mesma forma como acima foi descrito e os hidrolizados resultantes foram, finalmente, aplicados em papel Whatman Nº1, para cromatografia preparativa, solvente A. Duas tiras laterais e uma central do cromatograma desenvolvido foram reveladas com nitrato de prata alcalino (123), a fim de localizar os diversos componentes de açúcares. Os açúcares foram,

então, eluídos, individualmente do papel, com água, por capilaridade. Os eluatos recolhidos foram doseados com fenol-ácido sulfúrico (53). O mesmo foi feito com uma faixa de papel de cromatografia que não continha nenhum resíduo de açúcar, das mesmas dimensões, para servir de branco. As leituras das densidades óticas foram feitas a 480 nm, na determinação quantitativa de pentoses e ácidos urônicos, usando como padrão de referência D-xilose (40 γ /ml); o teor de hexoses foi determinado pela leitura da densidade ótica a 490 nm, usando como padrão de referência a D-glicose (40 γ /ml).

3.2.5. Acetilação.

Os derivados acetilados foram obtidos pelo método que usa o ácido perclórico como catalizador (139). Os alditois resultantes da redução com boroidreto de sódio dos monossacarídeos obtidos por hidrólise total das diferentes frações polissacarídicas (Cf. 3.2.4) foram acetilados com uma mistura de anidrido acético: ácido perclórico (70 %), na proporção de 14:0,1 (v/v). Foram usados cerca de 7 ml da mistura acetilante para cada fração polissacarídica hidrolizada. A mistura reacionante foi deixada em repouso durante uma noite, à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se gelo, sob agitação, à mistura reacionante e os produtos acetilados foram extraídos com duas porções de clorofórmio. O extrato clorofórmico foi lavado até a neutralidade com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e depois com água destilada. Após concentração do extrato clorofórmico, em corrente de ar, os alditois acetilados foram cromatografados em GLC, usando a coluna-b. As proporções relativas dos diferentes açúcares que compõem as

frações polissacarídicas foram calculadas por triangulação (111).

3.2.6. Determinação da natureza do ácido urônico ligado à cadeia principal da fração A.2.L.ins.

Uma alíquota da fração A.2.L.ins. (60 mg) foi hidrolizada com ácido clorídrico 1,0 N, em banho de água fervente, por seis horas. O material hidrolizado, após concentração no evaporador a vácuo, até secura, foi metanolizado com 20 ml de metanol anidro, contendo 3 % de cloreto de hidrogênio. Após 10 horas de refluxo, a mistura metanolizante foi neutralizada com carbonato de chumbo. O precipitado salino foi removido por centrifugação. Ao sobrenadante foi adicionado boroidreto de sódio em excesso, a fim de reduzir a função éster dos resíduos metilglucoronosídeos. A redução efetuou-se por um período de 12 horas e à temperatura ambiente, após o qual o excesso de boroidreto foi decomposto com ácido acético 2 N (até pH 5-6). Em seguida a solução foi deionizada e desboratada segundo processo descrito em 3.2.4. Após a desboratação, os metilglicosídeos foram hidrolizados, a refluxo, com ácido clorídrico 0,5 N, por três horas e, em seguida, concentrados até consistência de xarope. Várias adições de água e subsequente remoção da mesma, no evaporador a vácuo, permitiu obter um xarope livre de ácido clorídrico. O material resultante foi cromatografado, em duplicata, em papel Whatman Nº1, no solvente A. Um dos cromatogramas foi revelado com nitrato de prata alcalino(123) e outro com cloridrato de p-anisidina. A mancha correspondente aos ácidos urônicos desaparecera para dar origem a outra com $R_G=1,46$ (onde R_G = migração relativa à D-glucose). O cromatograma revelado com cloridrato de p-anisidina também evidenciou a mancha com $R_G = 1,46$,

indicando tratar-se de um açúcar redutor. O material foi, posteriormente, recromatografado preparativamente em papel Whatman Nº 1 no solvente A. A mancha de açúcar com $R_G = 1,46$ foi eluída com água, por capilaridade; este eluato foi, em seguida, concentrado no evaporador a vácuo e submetido ao processo de demetilação descrito por HOUGH et al. (80). A cromatografia em papel Whatman Nº 1, solvente A, do açúcar demetilado evidenciou o desaparecimento do açúcar com $R_G = 1,46$, para dar origem a outra mancha com $R_G = 1,0$.

3.2.7 Variação da densidade ótica, a 610 nm, de diferentes frações hemicelulósicas após complexação com iodo (64,6)

Na comparação da variação da densidade ótica, a 610 nm, com crescentes concentrações de polissacarídeos dissolvidos em cloreto de cálcio (3,7 M) e complexadas com iodo, tomaram-se cinco frações polissacarídicas, a saber: duas frações polissacarídicas da folha de cafeeiro, i.é, as frações A.2.L.ins., e B.3.L (Cf.3.2.3.3) duas frações polissacarídicas extraídas da Mimosa bracaatinga Hoehne, a saber, a hemicelulose A, insolúvel em água (fração B.A.L) e uma fração linear da hemicelulose B, solúvel em água e subfracionada por complexação com iodo (fração B.B.L); e a hemicelulose A do sabugo de milho (Zea mays), obtida por extração alcalina (KOH 15 %, sob nitrogênio, Cf. 3.2.3), fração S.M.A.L.

As frações polissacarídicas (25 mg) previamente desidratadas no aparelho de secagem a vácuo de Abderhalden, foram dissolvidos em 10 ml de hidróxido de sódio 1 N, neutralizadas com ácido clorídrico 1 N e o volume completado para 25 ml. Destas soluções foram pipetadas alíquotas de 0,1 a 0,7 ml e os volumes completa-

dos para 10 ml com solução de cloreto de cálcio 3,7 M, contendo 0,05 % de iodo e 0,21 % de iodeto de potássio, de modo que as concentrações finais de polissacarídeo variavam de 0,001 % a 0,007 % Trinta minutos após a homogenização (complexação) efetuou-se a leitura das densidades óticas a 610 nm, contra um branco. Todas estas operações foram efetuadas à temperatura ambiente (Figura-1).

3.2.8. Espectros de absorção das frações A.2.L.ins. e B.A.L complexadas com iodo (63,64,20).

Para determinar o $\lambda_{\text{máx.}}$, i.é, o comprimento de onda em que a densidade ótica é máxima, procedeu-se da seguinte forma: a 0,2 ml das "soluções" polissacarídicas A.2.L.ins e B.A.L (Cf. 3.2.7) (0,1 %) foram adicionados 9,8 ml de uma solução de cloreto de cálcio 3,7 M, contendo 0,21 % de iodeto de potássio e 0,05 % de iodo (64). Os espectros foram traçados com o auxílio do aparelho Varian Techtron, modelo 635 D, numa faixa de comprimento de onda de 360nm a 800 nm, conforme figura - 2.

3.2.9. Determinação do grau de polimerização da fração A.2.L.ins. (74, 124).

Uma alíquota da fração A.2.L.ins (304,65 mg) foi dissolvida em 5 ml de hidróxido de sódio 0,5 N e reduzida com excesso de boridreto de sódio (40, 74), durante 48 h, à temperatura ambiente. O excesso de reagente redutor foi decomposto pela adição de ácido acético 2 N até pH 5-6. Adicionou-se, em seguida 1 ml de periodato de sódio 1 M e completou-se o volume até 10 ml (concentração final de periodato 0,1 M). A oxidação do polissacarídeo foi efetuada no escuro e à temperatura ambiente. Como o padrão de refe-

rência foi utilizada uma solução de manitol de título conhecido (0,001 M) e oxidado nas mesmas condições. Aliquotas de 2 ml das soluções oxidantes foram retiradas após 48 horas e 60 horas de reação e transferidos para tubos de ensaio (em triplicata). O iodato e o periodato foram precipitados com 3 ml de solução saturada de acetato de chumbo. Nestes tubos de ensaio (que continham as alíquotas das misturas oxidantes) foram introduzidos tubos de diálise, contendo 5 ml de água destilada. Os tubos de ensaio foram fechados com parafilme e processou-se a diálise durante 12 horas, com agitação ocasional. Tendo a diálise atingido o equilíbrio, determinou-se quantitativamente o formaldeído liberado, utilizando-se o método do ácido cromotrópico (74, 124). Aliquotas de 1 ml do dializado, do interior do tubo de diálise , foram transferidos para tubos de centrífuga, às quais foram adicionadas 10 ml de ácido cromotrópico (74). O acetato de chumbo precipitado foi removido por centrifugação. Os sobrenadantes, foram transferidos, cuidadosamente, para tubos com rolha esmerilhada e aquecidos em banho-maria (96-100 °C), por 30 minutos, na ausência de luz. As misturas reacionantes foram, a seguir, esfriadas até temperatura ambiente e as densidades óticas foram lidas a 570 nm, contra um branco. Como as leituras espectrofotométricas das amostras colhidas às 48 horas e às 60 horas fossem iguais, considerou-se que a reação estivesse completa. O grau de polimerização foi calculado através da seguinte fórmula (74):

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

onde Y = peso do polissacarídeo , em gramas; X = peso do formaldeído, em gramas, fornecido pelo padrão de referência (manitol);

e n= número de mois de formaldeído liberado por grupo redutor terminal (no caso de xilano, n = 1).

3.2.10. Processos de metilação da fração A.2.L.ins.

3.2.10.1. Processo de Haworth (45, 79).

A fração A.2.L.ins. (130 mg) foi submetida, inicialmente, ao processo de metilação de HAWORTH (45,79). O polissacarídeo foi dissolvido em hidróxido de sódio 1 N, neutralizado com ácido clorídrico 1 N e dializado contra água corrente. Após a diálise, a suspensão polissacarídica foi concentrada até um volume de 25 ml, à qual foram adicionados 20 ml de acetona. Sob agitação vigorosa adicionou-se, lentamente, gota a gota, 15 ml de hidróxido de sódio a 40 % e 7,5 ml de sulfato de dimetila. A adição destes reagentes durou 4 horas, ao final das quais a mistura reacionante foi agitada por mais 8 horas. Todo este tratamento foi conduzido à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura metilante foi neutralizada com ácido sulfúrico 6 N, em banho de gelo. Removida a acetona, por evaporação a vácuo, a fração polissacarídica, parcialmente metilada, foi dializada contra água corrente (24 horas). O dializado foi concentrado num evaporador a vácuo e liofilizado. Este processo de metilação foi repetido mais duas vezes, utilizando-se, agora, o tetraidrofurano como solvente.

3.2.10.2. Método de Srivastava (106).

O polissacarídeo parcialmente metilado (Cf. 3.2.10.1), foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) redestilado (30 ml). A esta solução foram adicionados 5 g de hidróxido de sódio pulverizado (5 porções), enquanto o sulfato de dimetila (7,5 ml) gotejava len-

tamente (durante 5 horas) sobre a mistura reacionante vigorosamente agitada. Durante as duas primeiras horas, a reação foi conduzida à temperatura de 20 °C (banho de água), sob atmosfera de nitrogênio. Depois, a reação foi continuada, à temperatura ambiente, por mais 10 horas. Após este período, a mistura metilante foi aquecida por cerca de uma hora, num banho-maria (96 °C), para destruir o excesso de éster inorgânico. Foram adicionados, então, 20 ml de água para dissolver os eletrólitos em suspensão. O excesso de hidróxido de sódio foi neutralizado com ácido sulfúrico 6 N, em banho de gelo. Tentou-se, em seguida, extrair o polissacarídeo parcialmente metilado, com sucessivas porções de clorofórmio. Como a extração não fosse bem sucedida e houvesse dificuldade em eliminar o sulfóxido de dimetila no evaporador a vácuo, dializou-se o material contra água corrente (48 horas). Após a diálise, a suspensão polissacarídica foi concentrada no evaporador a vácuo e liofilizada. A seguir o polissacarídeo parcialmente metilado foi submetido a novo processo de metilação.

3.2.10.3. Processo de metilação com sulfato de dimetila e hidróxido de sódio pulverizado em tetraidrofurano.

O polissacarídeo parcialmente metilado pelos processos anteriores foi dissolvido em 50 ml de tetraidrofurano e tratado com 5 g de hidróxido de sódio pulverizado (adicionado em 5 porções), enquanto o sulfato de dimetila (7,5 ml) era adicionado lentamente (45,79). A mistura reacionante foi deixada à temperatura ambiente, sob forte agitação, durante 12 horas. Após este período de reação, adicionaram-se 50 ml de água para dissolver os eletrólitos em suspensão. O excesso de hidróxido de sódio foi neutralizado com ácido

sulfúrico 6 N, em banho de gelo. Removido o tetraidrofurano, por evaporação a vácuo, a mistura reacionante foi dializada por 24 horas, contra água corrente. Depois da diálise, a suspensão polissacarídica foi concentrada a vácuo até a secura e o processo de metilação foi repetido mais tres vezes.

3.2.10.4. Metilação pelo processo de PURDIE (45, 79).

O polissacarídeo , parcialmente metilado, foi dissolvido em 5 ml de iodeto de metila e 5 ml de acetona, num balão de 50 ml. Esta mistura foi aquecida a refluxo por 6 horas, na ausência de luz e em ambiente anidro. Óxido de prata (700 mg) foi adicionado (em 5 porções) periodicamente, durante o refluxo. Em seguida filtrou-se a mistura reacionante num funil de placa porosa F e o resíduo foi lavado exaustivamente com 7 porções de clorofórmido. O filtrado e os líquidos de lavagem foram reunidos e concentrados a vácuo. Como não se tivesse formado prata coloidal na solução clorofórmica, nenhum tratamento posterior foi feito. Após esta última metilação o polissacarídeo metilado não mais apresentava pico de absorção na região de 3.500 cm^{-1} do espectro do infravermelho.

3.2.10.5. Metanólise do polissacarídeo metilado.

Uma parte do polissacarídeo metilado (cerca de 40 mg) foi misturada com 30 ml de metanol anidro, contendo 3 % de cloreto de hidrogênio e refluxada por 6 horas. Após a neutralização do HCl, com carbonato de prata, a solução foi filtrada em funil de placa porosa F e o resíduo lavado com cinco porções de 10 ml de clorofórmio. O filtrado e os líquidos de lavagem foram reunidos, concen-

trados a vácuo para redução de volume e passado em coluna de sílica gel (10 X 1 cm, d.i.) para despigmentar o produto de metanólise. O eluato clorofórmico, após concentração no evaporador a vácuo, foi analisado por GLC, coluna - a (108).

3.2.11. Oxidação com periodato de sódio da fração A.2.L.ins.

A fração polissacarídica A.2.L.ins (64,224 mg) foi submetida à oxidação com periodato de sódio (0,05 M; 80 ml) na ausência de luz, durante oito dias, à temperatura de 28-30 °C (banho de água) (71, 75, 82). Em paralelo foi feito um branco nas mesmas condições. A diferentes intervalos de tempo foram retiradas alíquotas (1,0ml) da mistura oxidante e do branco, para determinação do consumo de periodato (87), pelo método do tiosulfato de sódio (69), que foi calculado da seguinte forma:

$$\text{molaridade da solução oxidante} = \frac{(B - A) \cdot N \text{ (do tiosulfato)}}{\text{ml da alíquota} \cdot 2}$$

$$\frac{\text{mois de periodato}}{\text{mois de pentose anidra}} = \frac{\text{vol. total da solução oxidante} \cdot 1395 \cdot X}{\text{gramas de polissacarídeo} \cdot 1000}$$

onde B = ml de tiosulfato gastos na titulação do branco; A = ml de tiosulfato gastos na titulação da amostra; N = normalidade.

Do gráfico representativo (mois de periodato/mol de pentose anidra contra tempo), foi extrapolado o valor do consumo de periodato para o tempo zero (Figura - 5).

O ácido fórmico liberado na oxidação do polissacarídeo foi determinado pelo método da titulação com hidróxido de sódio 0,01 N, sob atmosfera de nitrogênio e usando a fenolftaleína como indicador. No cálculo de mois de ácido fórmico liberados por mol de pen-

tose anidra foi usada a seguinte equação:

$$\frac{\text{mois de ácido fórmico}}{\text{mois de pentose anidra}} = y$$

$$y = \frac{\text{ml de NaOH. N (de NaOH). volume solução oxidante. 139,5}}{\text{ml da amostra. gramas de polissacarídeo. 1000}}$$

3.2.12. Degradação de SMITH da fração A.2.L.ins (1, 74).

A uma alíquota do polissacarídeo (26,84 mg) oxidado com periodato de sódio (oito dias, cf. 3.2.11) adicionou-se 1 ml de etileno glicol, para decompor o excesso de periodato de sódio. Após 30 minutos de reação, na ausência de luz, o polialdeído foi submetido à diálise (24 horas) contra água corrente. Em seguida adicionou-se boroidreto de sódio (20 mg) à solução do polialdeído para reduzir os grupos carbonílicos até função álcool (1, 69). A redução ocorreu durante o período de uma noite e à temperatura ambiente. Após destruição do excesso de boroidreto de sódio com ácido acético (2 N) até pH 5-6, o poliálcool foi dializado contra água corrente, para eliminar o ácido bórico e acetato de sódio. O material foi, em seguida, concentrado até securo e submetido à hidrólise com ácido clorídrico 1 N, em banho-maria de água fervente, em ampola selada, por 7 horas. O ácido clorídrico foi, a seguir, removido no concentrador a vácuo. O material hidrolizado foi, então, submetido à redução com boroidreto de sódio (20 mg), por 24 horas, e o excesso do agente redutor foi decomposto com ácido acético (2 N), até pH 5-6. A solução foi, a seguir, deionizado com resina trocadora de íons (coluna de 6 X 2 cm, DOWEX 50W - X8, 200-400 mesh, forma H⁺, usando água como eluente) e o eluato (oito vezes o volume do leito da resina) foi concentrado a vácuo. O ácido bórico foi, em seguida, removido na forma de éster metílico

pela adição e evaporação de sucessivas porções de metanol. Os alditóis assim obtidos foram acetilados com anidrido acético e ácido perclórico (Cf.3.25). Os alditolacetatos foram, posteriormente, analisados por GLC, na coluna -b (Cf. 3.1).

3.2.13. Degradação de SMITH dos oligossacarídeos ácidos resultantes da hidrólise parcial da fração A.2.L.ins.

3.2.13.1. Hidrólise parcial ácida e separação dos oligossacarídeos ácidos.

Submeteu-se a fração polissacarídica A.2.L.ins. (100 mg) à hidrólise parcial com ácido sulfúrico 0,5 N, em banho de água fervente, por 4,30 horas (em ampola selada). Após neutralização com solução saturada de hidróxido de bário até pH 4-5, centrifugação e concentração do sobrenadante num evaporador a vácuo, a mistura de açúcares ácidos e neutros foi aplicada numa coluna trocadora de íons (coluna de 6 X 2 cm, DOWEX 1-X8, 200-400 mesh, forma HCOO⁻ a fim de separar os açúcares ácidos dos neutros. Após eluição dos açúcares neutros com água (seis vezes o volume do leito da resina) eluíram-se os açúcares ácidos (aldobiourônicos, aldotriurônicos, etc.) com ácido fórmico 2 N (10 vezes o volume do leito da resina). O eluato, contendo os oligossacarídeos ácidos, foi concentrado no evaporador a vácuo, a fim de remover o ácido fórmico. A completa remoção de ácido fórmico foi realizada por sucessivas adições de água seguidas de evaporação no concentrador a vácuo. Finalmente, os oligossacarídeos ácidos foram dissolvidos em água e neutralizados com hidróxido de amônio para, em seguida, serem submetidos à oxidação com o periodato de sódio.

3.2.13.2. Oxidação com periodato de sódio e degradação de SMITH dos oligossacarídeos ácidos.

A mistura de oligossacarídeos ácidos foi posta a oxidar com periodato de sódio (0,05 M; 20 ml) à temperatura ambiente, na ausência de luz, durante tres dias. O excesso periodato foi decomposto pela adição de etileno glicol (2 gotas) , deixando-se a mistura reacionante , no escuro, por 30 minutos. Os produtos oxidados foram, então, reduzidos com boroidreto de sódio, hidrolizados e novamente reduzidos com boroidreto de sódio (Cf.3.2.12). Os alditois resultantes foram acetilados (Cf.3.2.5) e analisados por GLC (coluna-b) , usando-se o treitol-tetraacetato como padrão de referência.

3.2.14. Espectro de absorção no ultravioleta.

Traçou-se o espectro de absorção da fração A.2.L.ins., dissolvida em hidróxido de sódio 1 N e A.2.L.ins. metilado, dissolvido em clorofórmio. Ambas as frações polissacarídicas estavam na concentração de aproximadamente 0,01 %. Os espectros foram traçados com o auxílio do aparelho Varian Techtron, modelo 635 D, numa faixa de comprimento de onda de 200 nm até 400 nm (Figuras 3 e 4).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Extração, fracionamento e purificação da hemicelulose da folha de cafeeiro.

A extração da folha de cafeeiro com acetona e a mistura de metano:clorofórmio (1:1, v/v) (76), em aparelho Soxhlet, teve por finalidade a remoção de pigmentos, clorofilas, ceras vegetais, lípidios e açúcares livres.

No processamento (76) do resíduo da folha de cafeeiro com a mistura de solventes: fenol-ácido acético glacial-água (1:1:1, p/v/v), a finalidade precípua foi a remoção de proteínas, método utilizado por BAGDASARIAN et al. (15) para extrair polipeptídeos de folhas de Vicia faba. O teor de nitrogênio da folha de cafeeiro (2,53 %) passou, após a desproteínização, para 1,83 %. Portanto, 0,70 % do nitrogênio total da folha foi removido. Mesmo que se tivesse repetido o processo de desproteínização (15, 76) seria vã a esperança de remover toda a proteína. Esta afirmação se baseia no trabalho de HENDERSON & HAY (76) em que apresentam e discutem os resultados obtidos em seu estudo das hemiceluloses de folhas de Berberis vulgaris. Apesar de estes autores se terem servido de processos como "derivatização" e complexação dos polissacarídeos, conseguiram obter apenas uma fração, das muitas que isolaram, livre de proteína. Verificaram ainda que, quando uma das frações polissacarídicas foi submetida à digestão proteolítica pela tripsina, apresentou uma alteração do teor de proteína de 6,9 % para 5,5 %. Segundo os mesmos autores, preparações polissacarídicas de diversas fontes vegetais, contendo de 5 % a 10 % de protei-

na, vêm atraído sempre mais interesse, à medida que se vai evidenciando não ser esta proteína completamente removível pelos processos de fracionamento disponíveis. Pela Tabela - 1 pode-se observar que, também no presente trabalho, apareceu uma fração isenta de proteína, embora não se tenha recorrido ao processo de purificação via transformação dos polissacarídeos em seus derivados acetilados ou metilados. O teor de nitrogênio da fração de hemicelulose A, apesar de ter sido submetida a dez extrações pela mistura de Sevag (107), não manifestou alteração sensível após esse tratamento. Isto pode ser verificado, confrontando-se o teor de nitrogênio da fração A, antes do tratamento com a mistura de Sevag (107), com o teor de nitrogênio após Sevag, apresentado pelas frações A.1 e A.2 (Tabela - 1). A complexação com iodo demonstrou ter havido sensível diminuição nos níveis de nitrogênio das diferentes subfrações de A.1 e A.2 (Tabela -1 e Esquema -3). Tudo indica, pois, que uma parte do nitrogênio foi eliminada pela rejeição do resíduo após solubilização das frações polissacarídicas A.1 e A.2 em cloreto de cálcio (3,7 M), o que também parece evidenciar-se nas subfrações B.3.L e B.3.R (Tabela - 1), resultantes do fracionamento com iodo (60, 61). Os resultados permitem concluir com HENDERSON & HAY (76) que existe uma possível ligação covalente entre as hemiceluloses e a proteína.

Com referência ao sistema de solventes: fenol-ácido acético glacial-água (1:1:1, p/v/v), utilizado na remoção de proteínas, convém acrescentar, que este sistema ostenta ainda as seguintes vantagens: possui pequena tendência de dissolver os polissacarídeos bem como baixa tendência em hidrolizá-los (15). Além do mais,

Tabela - 1: Rendimento e teor de nitrogênio das frações polisacarídicas da hemicelulose de folha de cafeeiro.

Frações	Rendimento em g		%	
	Extrato bruto	Carboidrato total*	N ₂	Proteína**
A	24,45	15,45	5,73	35,81
A.1	3,97	2,63	5,41	33,81
A.1.L.ins.	0,26	0,13	7,70	48,10
A.1.L.sol.	0,318	0,29	1,57	9,81
A.1.R	0,03	0,03	n.d. [†]	n.d. [†]
A.2	12,08	7,61	5,92	37,00
A.2.L.ins.	1,71	1,54	2,27	14,18
A.2.L.sol.	0,194	0,19	1,19	7,43
A.2.R.	0,02	0,02	n.d. [†]	n.d. [†]
B	9,13	n.d. [†]	n.d. [†]	n.d. [†]
B.1	2,29	2,19	0,67	4,18
B.2	1,24	0,97	3,53	22,06
B.3	5,53	3,61	5,53	34,56
B.3.L	1,83	1,72	0,92	5,75
B.3.R	0,67	0,67	0,00	0,00
B.2.i	0,15	0,12	3,58	22,37

* Determinação de carboidrato total no extrato bruto pelo método do fenol-ácido sulfúrico(53).

** Admite-se que todo o nitrogênio seja de origem proteica.

† n.d. = não determinado.

este sistema de solventes extrai também taninos, glicosídeos, flavonas e precursores de lignina (15).

Quanto à dupla extração com água de cal (76) (Esquema - 1) teve-se em vista a remoção de mais material proteico. Este tratamento, entretanto, não exclui a possibilidade de se terem extraído pequenas quantidades de hemicelulose, fato que é sugerido por WHISTLER & FEATHER (129).

O resíduo de folhas, depois de ter sido lavado exaustivamente com água (Esquema - 1), foi submetido à extração direta com hidróxido de potássio pelas seguintes razões: a) os xilanos são isoláveis por extração direta, sem prévia delignificação, das dicotiledôneas lenhosas (angiospermas) (121), pois esta extração permite remover 80-95 % dos xilanos nelas presentes; b) por outra parte, nos processos de delignificação pode haver perda de polissacarídeos da ordem de 10-20 % pela solubilização dos mesmos (121); c) como o processo de delignificação usa agentes oxidantes enérgicos os xilanos podem sofrer oxidações até grupamento ácido nos pontos em que se ligam covalentemente com a lignina (94); d) embora a delignificação prévia do material, do qual se pretende extrair hemicelulose, facilite sua remoção, sempre há uma parcela de hemiceluloses que continua em mistura com a α -celulose, hemicelulose essa que é chamada de "pentosanos ou xilanos resistentes" (94); e) finalmente, como a Coffea arabica L., var. Mundo Novo pertence ao grupo das dicotiledôneas lenhosas, optou-se pela extração direta, embora não se possa afirmar, sem prévia confirmação, que os tecidos do caule (madeira) e da folha apresentem o mesmo comportamento frente às soluções alcalinas. O que, porém, parece

certo é que a extração alcalina também extrai linhina como o demonstrou MORRISON (85, 86).

A utilização do hidróxido de potássio, em vez do hidróxido de sódio, não se deve apenas ao fato de o acetato de potássio, formado na neutralização do extrato alcalino da hemicelulose, ser mais solúvel em álcool etílico do que o acetato de sódio (121), mas também porque o hidróxido de potássio tem maior poder solubilizador sobre o xilano do que sobre os glucomananos (121).

Como a extração alcalina foi conduzida foi conduzida à temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio, as transformações químicas sofridas pela hemicelulose da folha de cafeeiro foram reduzidas ao mínimo, com excessão da de-O-acetilação (121). As transformações químicas, porém, possíveis de ocorrer na hemicelulose, durante a extração alcalina, podem ser as seguintes: a) deesterificação dos polissacarídeos parcialmente acetilados (grupos acetila ligados, normalmente, ao C-3 do resíduo de D-xilose); b) degradação alcalina iniciada pela ponta redutora (reação de poda); c) hidrólise alcalina de ligações glicosídicas; d) e rompimento de ligações químicas entre hemicelulose e outros componentes da parede celular (12, 85,86, 121).

Das considerações acima conclui-se que não se consegue extrair toda a hemicelulose e nem ter uma idéia absolutamente exata da composição polissacarídica da parede celular vegetal. Além do mais, não se consegue extrair a hemicelulose e, particularmente, o xilano, tal como se encontra em a natureza. O uso de álcali causa ou pode causar as transformações já mencionadas acima; outros sol-

ventes que já foram testados, tais como sulfóxido de dimetila (73, 121), trazem a vantagem de extrair o polissacarídeo intacto. Infelizmente, porém, este solvente só consegue extrair mais ou menos quantitativamente a hemicelulose, após prévia delignificação, processo drástico, que provoca alterações químicas. Como se pode ver, não existe processo de extração que não apresente suas desvantagens. Cabe observar, finalmente, que os rendimentos apresentados na Tabela - 1 tem valor relativo, pois não se pretendeu extrair toda a hemicelulose, a ponto de o resíduo final (desprezado) ficar reduzido à α -celulose.

Como durante o processo de purificação da fração A se detectasse fracamente, por cromatografia em papel (papel Whatman Nº4, solvente A), a presença de resíduos de açúcar cujo R_f equivalia aos R_f da D-glucose e/ou D-manose, tentou-se remover os polissacarídeos constituídos por resíduos de D-manose através do fracionamento com hidróxido de bário (84). Na posterior análise, por GLC, da composição em resíduos de açúcar sob a forma de alditois acetilados não se detectou a presença do resíduo de D-manose nas frações A, A.1 e A.2, mas sim D-glucose. O resíduo de D-manose, porém, apareceu na análise da composição de açúcares, por GLC, em algumas das frações resultantes de A.1 e A.2, por complexação com iodo (Cf.3.2.3.3). O seu teor é, porém, mais acentuado nas subfrações de A.2, o que é um indicativo do fracionamento parcial pelo hidróxido de bário. Aparece mesmo como contaminação na fração A.2.L.ins. Convém, porém, ter em mente que ao analisar a Tabela-2, não se deve perder de vista a Tabela-1, que fornece os correspondentes rendimentos.

Tabela-2: Composição, em monoaçúcares, das frações polissacarídicas da hemicelulose da folha de cafeeiro (Coffea arabica L., var.M.Novo) determinado por GLC na forma de alditois peracetilados.

Frações	% de L-ramnose	% de L-arabinose	% de D-xilose	% de D-manose	% de D-galactose	% de D-glucose	% de ácido urônico	% Total
A ⁺	2,43	4,41	89,33	nd	nd	3,82	—	99,99
A.1 ⁺	nd	10,09	80,16	nd	nd	9,90	—	100,15
A.1.L.ins.	nd	3,66	83,24	nd	3,77	1,36	7,96	99,99
A.1.L.sol.	nd	5,13	73,42	nd	nd	8,87	12,57	99,99
A.1.R	7,92	8,61	11,99	9,32	11,84	11,94	38,47	100,09
A.2 ⁺	2,92	4,49	90,14	nd	1,46	0,83	—	99,84
A.2.L.ins.	nd	nd	85,65	0,90	nd	nd	13,45	100,00
A.2.L.sol.	nd	2,93	75,18	7,33	0,88	3,76	9,91	99,99
A.2.R	13,68	15,18	23,7	13,70	19,33	9,75	4,67	100,01
B ⁺	2,08	11,08	36,82	9,05	16,71	24,22	—	99,96
B.1 ⁺	1,00	1,52	97,71	nd	nd	nd	—	100,23
B.2 ⁺	3,31	8,21	79,60	nd	3,78	5,08	—	100,03
B.3 ⁺	1,00	16,16	30,14	9,32	9,41	33,94	—	99,97
B.3.R	1,82	24,21	18,41	8,53	17,11	27,53	2,38	99,99
B.3.L	1,68	7,82	37,91	10,60	0,94	53,25	7,77	99,98
B.2.i ⁺	9,65	13,46	35,93	7,97	9,71	23,25	—	99,97

⁺ Relativa, apenas aos açúcares neutros.

Calculado por diferença de dosagem, pelo método do fenol-ácido sulfúrico (53), entre açúcares neutros totais e ácidos urônicos, separados por cromatografia preparativa em papel (Cf.3.2.4).

nd = não detectado

A fração B.1, removida por centrifugação, após diálise da hemicelulose B (Tabela - 2), tem todas as características da hemicelulose A (insolubilidade em água e elevado teor de D-xilose (Tabela -2)). Esta fração, provavelmente, passou para a hemicelulose B na acidificação do extrato alcalino, devido à força iônica do meio (28).

As frações B.2 e B.3, resultantes da complexação com Cetavlon da hemicelulose B (após remoção de B.1, Cf. Esquema -2), apresentam boa diferenciação apesar de não ter sido determinado o teor de ácido urônico. Mesmo assim, se se tiver em mente que o xilano da folha de cafeeiro possui grupos singulares de ácido metilglucurônico ligados à cadeia principal (Cf. 3.2.6 e Tabela -2), então se explica perfeitamente a presença do alto teor de D-xilose na fração polissacarídica ácida (B.2), teor que é bem menor na fração B.3 (fração polissacarídica neutra).

O teor de ácido urônico encontrado na hidrólise total de A.2.L.ins. foi de 13,45 % (Tabela - 2) em relação aos resíduos de monoaçúcares neutros; este teor é bem mais elevado que o dado fornecido pela análise dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado (Tabela - 4). Uma explicação plausível para esta discordância seria ou a hidrólise total incompleta do polissacarídeo (fração A.2.L.ins.) ou a metanólise incompleta do polissacarídeo metilado (formação de ácidos aldobiourônicos, altamente resistentes à hidrólise ácida e à metanólise)

Devido à forte pigmentação escura, apresentada pelas diferentes frações polissacarídicas, não foi possível a determinação das correspondentes rotações óticas específicas. Apenas a fração A.2.

L.ins. apresentou condições satisfatórias para esta determinação, sendo seu $[\alpha]_D^{25} = -92,7$ (c 2,25 % em NaOH 1 N). Convém acrescentar que a solução polissacarídica desta fração não foi submetida, anteriormente, nem a aquecimento nem a baixas temperaturas. Esta observação cabe aqui, porque, na determinação polarimétrica dos xilanos, é necessário dar-se o histórico térmico das soluções por causa da agregação molecular (27) que altera o seu grau de rotação ótica.

O único teste físico para determinar o grau de homogeneidade foi o da eletroforese. Apenas a fração A.2.L.ins. mostrou-se homogênea nas condições eletroforéticas especificadas em materiais e métodos (Cf. 3.1).

4.2. Resíduo insolúvel da digestão com ácido sulfúrico.

Na determinação do resíduo insolúvel da folha de cafeeiro, por digestão ácida (Cf. 3.2.2) encontrou-se o valor de 31,42 %. Este resíduo insolúvel é tido como teor de lignina (3). Embora o valor encontrado (31,42 %) esteja dentro da faixa de teor de lignina atribuído às madeiras (até 37 % (121)) e embora sua existência tenha sido comprovada em paredes celulares epidérmicas de algumas plantas (68), parece, contudo, ser muito elevado por tratar-se de um tecido foliar. Por isso foi feita uma determinação de nitrogênio total do resíduo insolúvel, encontrando-se um teor de 3,8% de nitrogênio. Admitindo-se ser este nitrogênio de origem proteica, pode-se supor ter ocorrido, durante a digestão ácida, uma reação de condensação (semelhante à reação de formilação) entre os grupos $-NH_2$ livres da proteína e os grupos aldeídicos dos resíduos de açúcar (ou seus derivados de furfural). O produto resultante

desta reação também é insolúvel em ácido e resiste à sua ação hidrolítica(81). Isto explicaria, em parte, o elevado teor de resíduo insolúvel. Por outra parte, este resíduo (o que convém ter bem presente) contém realmente lignina pelo fato de dar reação positiva com floroglucinol (reação de WIESNER (126)).

4.3. Grau médio de polimerização da fração A.2.L.ins.

Na determinação do grau médio de polimerização (\overline{DP}_n) de um polissacarídeo - no presente caso um xilano - que envolva a redução de um grupo terminal a um resíduo alditol, seguido da oxidação com periodato e da determinação do formaldeído produzido (método do ácido cromotrópico) (40, 74, 124) deve-se ter em mente os dois seguintes pressupostos (121): a) que o resíduo terminal redutor não possua um substituinte em C-2; b) que o álcali usado na extração da hemicelulose não tenha transformado quimicamente este grupo (121).

Como se verá nas discussões posteriores, é muito difícil haver substituintes localizados em C-2, pois se mostrará que os resíduos de ácido metil-glucurônico estão ligados ao C-3. Por outra parte as condições de extração foram relativamente suaves (tempo breve, atmosfera de nitrogênio, temperatura ambiente) para terem alterado quimicamente as extremidades redutoras do polissacarídeo em questão. Donde se presume que o $\overline{DP}_n = 58,3$, encontrado para o xilano que constitui a fração A.2.L.ins., seja fidedigno para as condições de isolamento deste polissacarídeo.

O grau de polimerização desta fração polissacarídica foi também calculado, através do relacionamento de áreas, a partir dos

produtos de metanólise do polissacarídeo metilado, analisados por GLC, tendo sido encontrado um $\overline{DP}_n = 49-50$, valor relativamente próximo ao encontrado pelo método químico (ácido cromotrópico). Esta diferença é compreensível considerando-se os efeitos degradativos ocorridos durante os processos de metilação. Semelhante efeito foi também demonstrado por CHEETHAM et al (41), num estudo crítico, quando determinaram o peso molecular médio (M_n) de xilanos extraídos de Setaria sphacelata, e Cynodon plectostachyus, através de osmometria em fase de vapor, destes polissacarídeos metilados por diferentes processos. Os resultados por eles obtidos encontram-se relacionados na seguinte tabela (Tabela - 3):

Tabela - 3 (41): Pesos moleculares médios (M_n) e \overline{DP}_n dos polissacarídeos de Setaria sphacelata e Cynodon plectostachyus.

Métodos de metilação(41)	M_n		$\overline{DP}_n = \frac{M_n}{132}$	
	Setaria	Cynodon	Setaria	Cynodon
Haworth, seguido de PURDIE.	9300 \pm 350	6700 \pm 300	70,45 \pm 2,6	50,75 \pm 2,2
NaH-DMSO-CH ₃ I, completado c/PURDIE	9400 \pm 350	7500 \pm 300	71,21 \pm 2,6	56,81 \pm 2,2
NaOH-DMSO-DMS, completado c/PURDIE	8500 \pm 350	5300 \pm 300	64,39 \pm 2,6	40,15 \pm 2,2

O processo de avaliação do \overline{DP}_n por filtração em peneira molecular (em Sephadex G-200, por exemplo), é impraticável no caso de xilanos por causa de sua agregação molecular em soluções aquosas (27,85); pela mesma razão não se pode utilizar o método da ultracentrifugação.

4.4. METILAÇÃO

"Os estudos de metilação continuam a exercer um papel importante na determinação de estrutura" de polissacarídeos (41). STEPHEN (108), entretanto, acrescenta ser evidente que a análise por GLC dos produtos de metanólise de polissacarídeos metilados não substitui inteiramente os outros métodos clássicos de determinação de estrutura destas macromoléculas.

Os dados da análise por GLC dos produtos da metanólise da fração A.2.L.ins. metilada (Cf. 3.2.10) se encontram na Tabela-4. Os açúcares metilados foram identificados através de seus tempos retenção em relação ao β -0-metil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-gluco-piranosídeo. Estes foram comparados com os da tabela de STEPHEN (108), uma vez que a coluna e as condições de operação foram as mesmas (Cf. 3.1). Os dados da metilação oferecem forte evidência de que se trata de um xilano basicamente linear, em que os resíduos de D-xilose estão ligados por ligações do tipo (1-4), devido ao elevado teor de 2,3-di-0-metil-D-xilopiranosídeo (68.68 %). Este tipo de ligação foi também evidenciado pela complexação com iodo (63). Estes dados, juntamente com o do elevado grau de rotação óptica negativa $[\alpha]_D^{25} = -92,7$ (c 2,25 %, em NaOH 1 N), oferecem forte evidência de que as ligações glicosídicas entre os resíduos de D-xilose sejam do tipo β , i.é, β -(1-4). A elevada proporção de 2-0-metil-D-xilopiranosídeo em relação ao 2,3,4-tri-0-metil-D-gluco-piranosílonato de metila não significa, necessariamente, que haja ramificações de D-xilose ligados ao C-3 dos resíduos de D-xilose da cadeia principal, por tratar-se de um xilano basicamente linear. Além disso, o baixo teor de 2,3,4-tri-0-metil-D-xi-

Tabela - 4: Tempos de retenção dos O-metilglicosídeos resultantes da metanólise da fração A.2.L.ins. metilada em relação ao β -O-metil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucopiranosídeo.

O-metil-glicosídeos	Tempos de retenção		mois %
	Produtos de metanólise	padrões ⁺	
2,3,4-tri-O-metil-D-xilopiranosídeo.	0,46 0,60	0,44 0,59	2,73
2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-glucopiranosídeo.	1,00 ----	1,00 -----	---
2,3-di-O-metil-D-xilopiranosídeo.	1,70 2,10	1,75 2,20	68,68
2,3,4-tri-O-metil-D-glucopiranosiluronato de metila	2,80 3,76	2,78 3,72	5,18
2-O-metil-D-xilopiranosídeo.	6,20 9,30	5,88 9,35	23,39
3-O-metil-D-xilopiranosídeo.	--- ---	5,00 8.12	---

+ Tempos de retenção de produtos de metanólise tabulados por STEPHEN et al. (108).

lopiranosídeo e a informação oferecida pela complexação com iodo (Figura - 3) sugerem ser esta fração mais linear que o próprio xilano do sabugo de milho segundo interpretação de GAILLARD (64).

O elevado teor de monometilxilose poderia ser oriundo, em parte, da metilação incompleta e/ou da demetilação durante o processo de metanólise (108, 34). A possibilidade da metilação incompleta, no entanto, ficou excluída pela ausência de absorção em 3500 cm^{-1} do espectro infravermelho do polissacarídeo metilado. Uma possível justificativa para o elevado teor de 2-O-metil-D-xilopiranosídeo seria o bloqueio do C-3 de resíduos de D-xilose por grupos agliconas (lignina, proteína, etc.), problema atualmente em estudo no laboratório e sugerido pelos espectros de absorção na região do ultravioleta da fração A.2.L.ins intacta e na forma de seu derivado metilado (banda de absorção de absorção na região dos 280 nm) (Figuras 3 e 4). Esta banda de absorção e a reação positiva com o reagente de LOWRY (83a) do polissacarídeo metilado, bem como a análise cromatográfica específica para amino-ácidos (52, 93) após hidrólise ácida do polissacarídeo(A.2.L.ins.) e de seu derivado metilado, indicaram que o grupo aglicona fosse uma proteína.

As revisões bibliográficas sobre hemiceluloses (12,121,130, 131) dão conta de que os resíduos de ácidos urônicos, que metilados quer não, encontram-se ligados glicosidicamente à cadeia principal do xilano, na maioria dos casos, ao C-2 do resíduo de D-xilose. Há, contudo, xilanos em que o ácido urônico ou seu éter metílico encontra-se ligado ao C-3 da D-xilose, entre os quais estão os xilanos isolados da cabeça de girassol (30), de um pinho

("Monterey pine") (131) e da palha de trigo (*Triticum vulgare* (29)) Pelo fato de não ser detectado a presença de nenhum resíduo de 3-O-metil-D-xilopiranosídeo por GLC dos produtos de metanólise da fração A.2.L.ins metilada o xilano da folha do cafeeiro pode-se enquadrar neste pequeno grupo de polissacarídeos que possuem os resíduos singulares de ácidos urônicos ligados ao C-3 da D-xilose.

O resíduo de ácido metil-glucurônico constitui uma ramificação singular, porque, na análise por GLC (coluna -a) dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado, o único éster detectado foi o 0-metil-2,3,4-trimetil-D-glucopiranosiluronato de metila.

4.5. Oxidação com periodato de sódio.

O consumo de periodato, quando extrapolado para o tempo zero (figura-5) foi de 0,95 moles por mol de pentose anidra (com simultânea liberação de 0,162 moles de ácido fórmico / mol de pentose anidra). Este resultado indica que a fração polissacarídica em estudo (A.2.L.ins) foi oxidada quase completamente. Que sua oxidação seja difícil conclui-se a partir das condições de temperatura utilizadas: 28-30 °C. Isto foi confirmado por uma tentativa feita para determinar o consumo de periodato a baixa temperatura (0-2 °C); nestas condições, o consumo de agente oxidante, após 700 h, atingira apenas o valor de 0,46 moles de periodato/mol de pentose anidra; este consumo subiu mais, quando a mistura reacionante foi deixada à temperatura ambiente. A dificuldade de oxidação com periodato destes polissacarídeos (xilanos), a baixas temperaturas, também foi constatada por BARNOUD et al. (22), ao conduzirem a oxidação de um xilano isolado da cana de Arundo donax, a 4 °C, durante 120

horas; o consumo de oxidante, neste caso, foi de 0,71 moles/pentose anidra. Tal comportamento, frente à oxidação com periodato, pode ser explicado a partir do fato de os xilanos (designação genérica) formarem agregados moleculares (27), enrolando-se em α -hélice (95,132).

4.6. Degradação de SMITH.

Os produtos que podem originar-se por oxidação com periodato e subsequente degradação de SMITH de um xilano são vários.

Com os resíduos de D-xilose na forma piranosídica, poderiam ocorrer as seguintes possibilidades: a ligação entre os resíduos de D-xilopiranosose estariam interligados glicosidicamente através de ligações do tipo (1-3). Neste caso, o produto principal da degradação de SMITH deveria ser o xilitol, o que não sucedeu, como se verá abaixo. Além do mais, o produto principal da metanólise do polissacarídeo metilado deveria ser o 2,4-di-O-metil-D-xilopiranosídeo, derivado que não foi detectado. A outra possibilidade seria a ligação do tipo (1-2) entre os resíduos de D-xilopiranosose. Neste caso os principais produtos da degradação de SMITH seriam o glicerol, xilitol e etileno glicol, os quais também são formados na degradação de SMITH do xilano formado por resíduos de D-xilopiranosose interligados através de ligações glicosídicas do tipo (1-4). A ligação do tipo (1-2), porém, excluiria a possibilidade de formação de derivados metílicos de D-xilopiranosose, com o grupo metoxi ligado em C-2, durante a metilação do polissacarídeo. A análise por GLC, no entanto, evidenciou que os produtos de metanólise deste polissacarídeo metilado, são justamente o 2,3-di-O-metil-D-xilopiranosídeo (68,68 %) e o 2-O-metil-D-xilopiranosídeo,

(23,39 %). Resta a última possibilidade, ou seja, a interligação dos resíduos de D-xilopirranose por ligações glicosídicas do tipo (1-4). Este tipo de ligação é confirmado pela complexação com iodo (63) e pela análise, em GLC, dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado, onde o principal produto é o 2,3-di-O-metil-D-xilopiranosídeo (68,68 %). Este dado é confirmado pelos produtos da degradação de SMITH, pois o produto principal desta é o glicérol, o etileno glicol e o xilitol, além de outros produtos não identificados.

Por outro lado, a possibilidade de os resíduos de D-xilose deste polissacarídeo estarem na forma furanosídica fica excluída pelas seguintes razões: a) alta insolubilidade deste polissacarídeo em água; b) por sua maior resistência à hidrólise ácida (24, 105); c) pelos dados da complexação com iodo que exige ligação do tipo (1-4) (63); d) pela análise, em GLC, dos produtos da metanólise do polissacarídeo metilado na qual dever-se-ia ter encontrado um derivado com um grupo metoxi em C-5; ora este derivado não apareceu na presente análise. Logo, a possibilidade de o presente xilano em estudo ser constituído por resíduos de D-xilofuranose (incluindo as razões acima mencionadas) fica excluída.

O consumo teórico de periodato de sódio para a fração A.2.L. ins., calculado a partir do \overline{DP}_n (58,3) seria de 1,03 moles de periodato/mol de pentose anidra. O valor experimental, entretanto, foi de 0,95 moles do agente oxidante por pentose anidra. Logo, 0,08 moles de periodato deixaram de ser consumidos o que corresponde a cerca de 4,6 unidades de D-xilose, por cadeia linear que deixaram de ser oxidadas. Confrontando-se este resultado com o da análise

por GLC dos produtos da degradação de SMITH da fração A.2.L.ins, na forma de alditois peracetilados, na qual 82,4 % correspondia ao glicerol e 17,60 % ao xilitol, verificou-se que havia maior percentagem de D-xilose resistente à oxidação com periodato do que era de se esperar. Estes dados, juntamente com os do elevado teor de 2-0-metil-Dxilopiranosídeo parecem confirmar a hipótese de que resíduos aglíconas estejam ligados à cadeia principal do xilano, possivelmente, no C-3 (Cf. 4.4: detecção de material de origem proteica no polissacarídeo metilado, extraído com clorofórmio).

A análise dos produtos de degradação de SMITH do polissacarídeo em estudo não informou, porém, se os resíduos de ácido urônico estão ligados aos C-2 ou C-3 do resíduo de D-xilopiranosose da cadeia principal. Mas a análise dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado sugere ligações do tipo (1-3) para esta ramificação singular.

Este resultado foi confirmado pela análise dos produtos de degradação de SMITH dos oligossacarídeos ácidos, obtidos por hidrólise parcial ácida do polissacarídeo. Esta hidrólise pode dar origem a uma série de oligossacarídeos (Cf. Figura - 6), uns menos prováveis (A_{iii} , A_{iv} , B_{iii} e B_{iv}) e outros mais prováveis (A_i , A_{ii} , B_i e B_{ii}) A série de fórmulas relacionadas na figura -5 leva em conta as duas possibilidades de ligações do ácido metil-glucurônico aos resíduos de D-xilopiranosose da cadeia principal: ligação ao C-3 (série A) e ligação ao C-2 (série B). Confrontando estas oito fórmulas e analisando os produtos de degradação de SMITH possíveis de cada oligossacarídeo (Tabela -5), vê-se que apenas dois oligômeros da série A, ou seja, A_i e A_{ii} , podem dar origem ao

Figura - 6: Possíveis oligossacarídeos ácidos resultantes da hidrólise parcial ácida da fração A.2.L.ins.

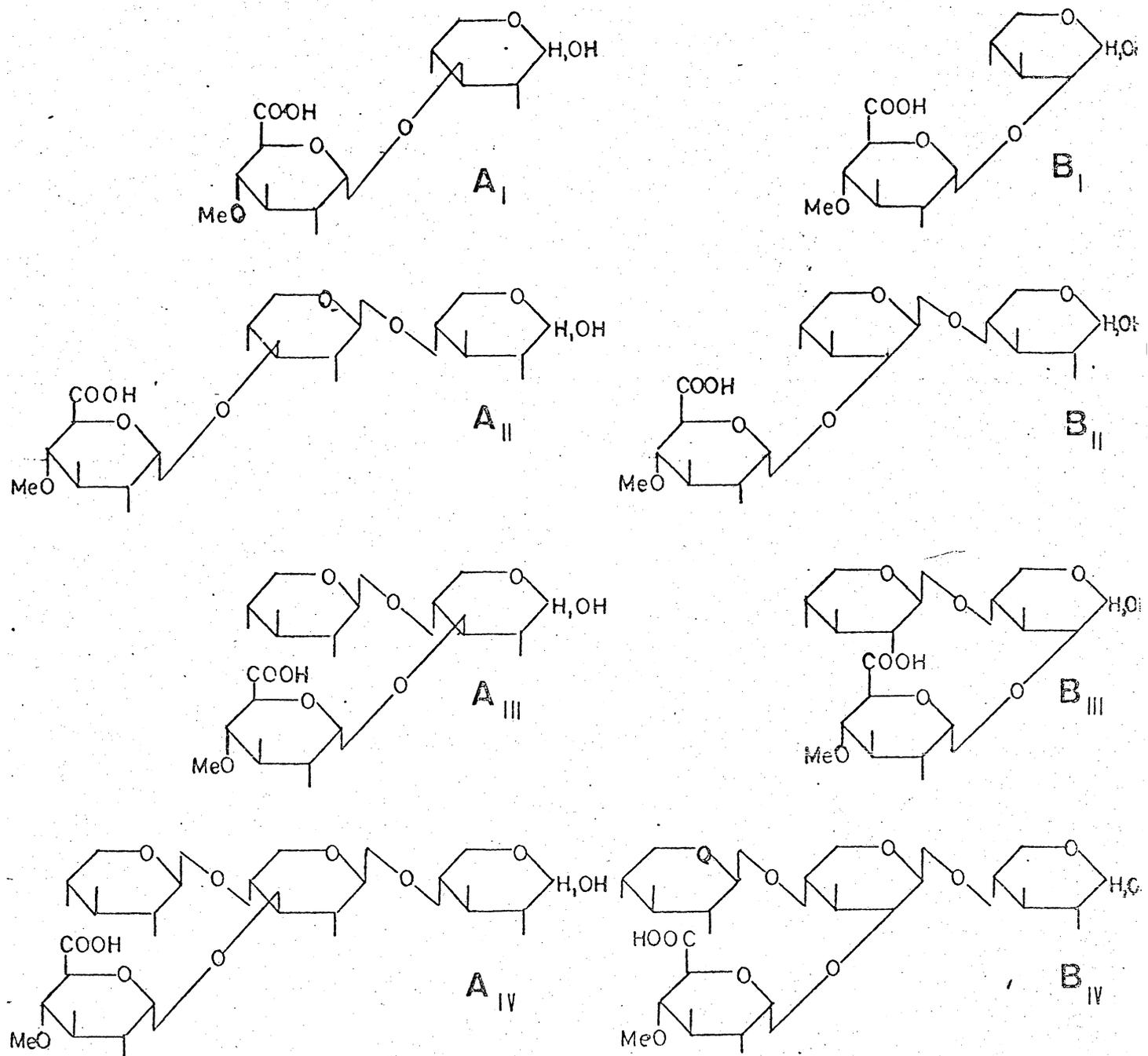


Tabela -5: Possíveis produtos da degradação de SMITH dos oligossacarídeos ácidos (Cf. Figura- 6).

	Etileno glicol	Glicerol	Xilitol	Treitol	A.M.B.*
A _I	+	-	-	+	+
A _{II}	+	+	+	-	+
A _{III}	+	-	-	+	+
A _{IV}	+	+	+	-	+

	Etileno glicol	Glicerol	Xilitol	Treitol	A.M.B.*
B _I	+	+	-	-	+
B _{II}	+	+	-	-	+
B _{III}	+	-	+	-	+
B _{IV}	+	+	+	-	+

*Ácido 3-metoxi-2,4-dihidroxi-butanoico.

treitol. Este produto da degradação não pode surgir de nenhum componente da série B, supondo, para ambas as séries que o grupo metoxi do ácido glucurônico, esteja na posição C-4 (pois a *Coffea arabica* pertence às dicotiledôneas lenhosas). Ora, pela análise, em GLC, dos peracetatos de alditois resultantes desta degradação foi detectada a presença de treitol tetraacetilado (identificado pelo tempo de retenção comparado com um padrão). Este resultado sugere que a ligação glicosídica entre os resíduos singulares do ácido metil-glucurônico e a cadeia principal do xilano seja do tipo (1-3).

4.7. Complexação de hemiceluloses com iodo.

GAILLARD (60, 61) e GAILLARD et al. (62,63,64,65) mostraram que muitos polissacarídeos lineares apresentam a capacidade de formar complexos de cor azul com iodo (cor devida aos íons $3I_2-2I^-$) (20), quando dissolvidos em soluções de cloreto de cálcio, embora não ostentem a mesma propriedade em soluções isentas de sal. Limitado grau de ramificação no polissacarídeo não é impecilho para a formação de complexos coloridos de azul (63). A natureza dos resíduos de açúcar que constituem a cadeia principal do polissacarídeo linear não é decisivo (63) na complexação com iodo; por isso encontram-se polissacarídeos lineares constituídos de D-glucose, D-manose e D-xilose que dão reação positiva com iodo; o que, porém, é essencial na formação do complexo azul é que estes resíduos estejam interligados através de ligações glicosídicas do tipo (1-4) e apresentem apenas pequeno grau de ramificação (63). Mas o que talvez seja mais importante que a ligação do tipo (1-4) é a semelhante configuração que a D-glucose, a D-manose e a D-xi-

lose possuem em torno do C-4 (63).

Mesmo que se saiba que um polissacarídeo possua outros tipos de ligações glicosídicas, a formação de um precipitado pela de iodo é um forte indício da presença de seqüências de ligações glicosídicas do tipo (1-4). Além do mais, para haver uma reação positiva com iodo, é necessária a existência de uma espira formada de pelo menos seis unidades de açúcar interligados através de (1-4), quer na cadeia principal quer numa ramificação (63).

Comparando as densidades óticas de diferentes xilanos de procedências diversas, isto é, da folha de cafeeiro (fração A.2.L.ins.), do caule de Mimosa bracaatinga, Hoehne (fração B.A.L) e do sabugo de milho (fração S.M.A.L) foi verificado que a variação da densidade ótica a 610 nm, a concentrações crescentes dos diferentes polissacarídeos, mantendo fixo o título dos outros reagentes, obedece à lei de Lambert e Beer, dentro de uma determinada faixa de concentração de polissacarídeo, como se pode ver no gráfico da Figura - 1. Analizando-se o afastamento da linearidade da densidade ótica, verifica-se que esta ocorre nas concentrações elevadas de polissacarídeo, quando existe uma tendência maior de formar precipitado (que realmente apareceu após 24 h de repouso). Interpretando o gráfico da Figura-1, conclui-se que os xilanos isolados e purificados, provenientes da hemicelulose A das três fontes acima indicadas, quais sejam, as frações A.2.L.ins, B.A.L e S.M.A.L, não são muito diferentes entre si, quanto ao grau de ramificação (64). O xilano menos ramificado seria o da hemicelulose A do sabugo de milho (fração S.M.A.L) e o mais ramificado seria o da hemicelulose A da bracaatinga (fração B.A.L), ocupando a fração

A.2.L.ins. um lugar intermediário. Comparando, agora, a fração B.A.L. com a fração B.B.L vê-se que esta última é mais ramificada que aquela (o que já fora sugerido por sua maior solubilidade na água).

Com respeito à fração polissacarídica extraída da hemicelulose B da folha do cafeeiro seria de se esperar que apresentasse um alto grau de ramificação. Isto realmente foi confirmado pela ausência (ou quase ausência) de absorbância a 610 nm por esta fração (figura - 1). Curiosamente, porém, a fração B.3.L praticamente não apresentou absorbância a 610 nm, embora tenha sido complexada com iodo (Cf. 3.2.7). A formação de cor azul bem como do precipitado dependem, além de outros fatores (tipos e concentração de cátion e ânion dos sais (64)), da concentração de iodo-iodeto utilizado. A falta de reação com iodo, aqui, se deve, talvez, ao fato de esta fração ter sido precipitada com maiores quantidades de iodo-iodeto do que o recomendado pela técnica (60, 61).

Talvez a variação da densidade ótica, dúvida que vem a ser uma velada crítica à interpretação unilateral de GAILLARD (64), mantidas todas as condições de reação, não dependa apenas do grau de ramificação e dos grupos ligados à cadeia principal do xilano, mas dependa também do grau de polimerização. É o que sugerem observações do próprio GAILLARD, em outro trabalho: a) de que sejam necessários pelo menos seis resíduos de açúcar sequenciados para que se possa formar um complexo entre "polissacarídeo" e iodo (63) b) outra observação seria a de que o xilano complexa com o iodo de uma forma semelhante à amilose (63). Ora, os "oligômeros" de

amilose, quando complexados com iodo, possuem diferentes espectros de absorção (19,20), dependendo de seu grau de polimerização, isto é, para cada comprimento de cadeia existe um $\lambda_{\text{máx.}}$. Deve-se levar em conta, ainda, que GAILLARD (964) efetuou todas as determinações de densidade ótica a 610 nm, não tomando em consideração os $\lambda_{\text{máx.}}$ individuais de cada polissacarídeo, complexado com iodo, em estudo. Logo, as diferenças de absorbância que se observam na figura - 1 não podem ser atribuídas apenas ao grau de ramificação e tipos de resíduos ligados à cadeia principal.

Tendo em vista estas observações, determinaram-se os $\lambda_{\text{máx.}}$ das frações polissacarídicas A.2.L.ins e B.A.L (Cf. 3.2.8), quando complexadas com iodo (Figura -2) - 635 nm e 670 nm, respectivamente. Conhecendo-se o \overline{DP}_n de A.L.2.ins (58,3) e o \overline{DP}_n de B.A.L (71,3) verificou-se que a hipótese acima parece confirmar-se, i.é, de que as densidades óticas lidas a 610 nm a diferentes concentrações polissacarídicas (figura - 1) não se devem apenas ao grau de ramificação e aos grupos ligados à cadeia principal (64), pois existe uma certa relação entre o $\lambda_{\text{máx.}}$ e o \overline{DP}_n .

Isto leva a crer, finalmente, que a relação existente entre os \overline{DP}_n dos oligômeros de amilose e seu $\lambda_{\text{máx.}}$, quando complexados com iodo (20), seja semelhante nos xilanos. Com base nos raciocínios acima poder-se-ia desenvolver um método de fácil execução para determinar-se o \overline{DP}_n dos xilanos, o qual consistiria em medir o $\lambda_{\text{máx.}}$ do xilano complexado com iodo em solução de cloreto de cálcio e introduzir este valor na isoterma de absorção de LANGMUIR, cuja expressão é a seguinte (20):

$$\frac{1}{\lambda_{\text{máx.}}} = \frac{1}{A} + \frac{B}{A(DP_n)}$$

onde A e B são constantes. O que se pode, porém, adiantar é que os valores dos parâmetros A e B, a serem determinados para os xilanos devem ser bastante diferentes dos valores encontrados para os oligômeros de amilose (20). Na determinação dos valores de A e B dever-se-ia traçar um gráfico de $1/\text{máx.} \times 1/\overline{DP}_n$ a partir de "oligômeros" de xilano que estivessem distribuídos ao longo de toda a faixa de comprimentos de cadeia, provenientes, de preferência, de uma mesma fonte vegetal.

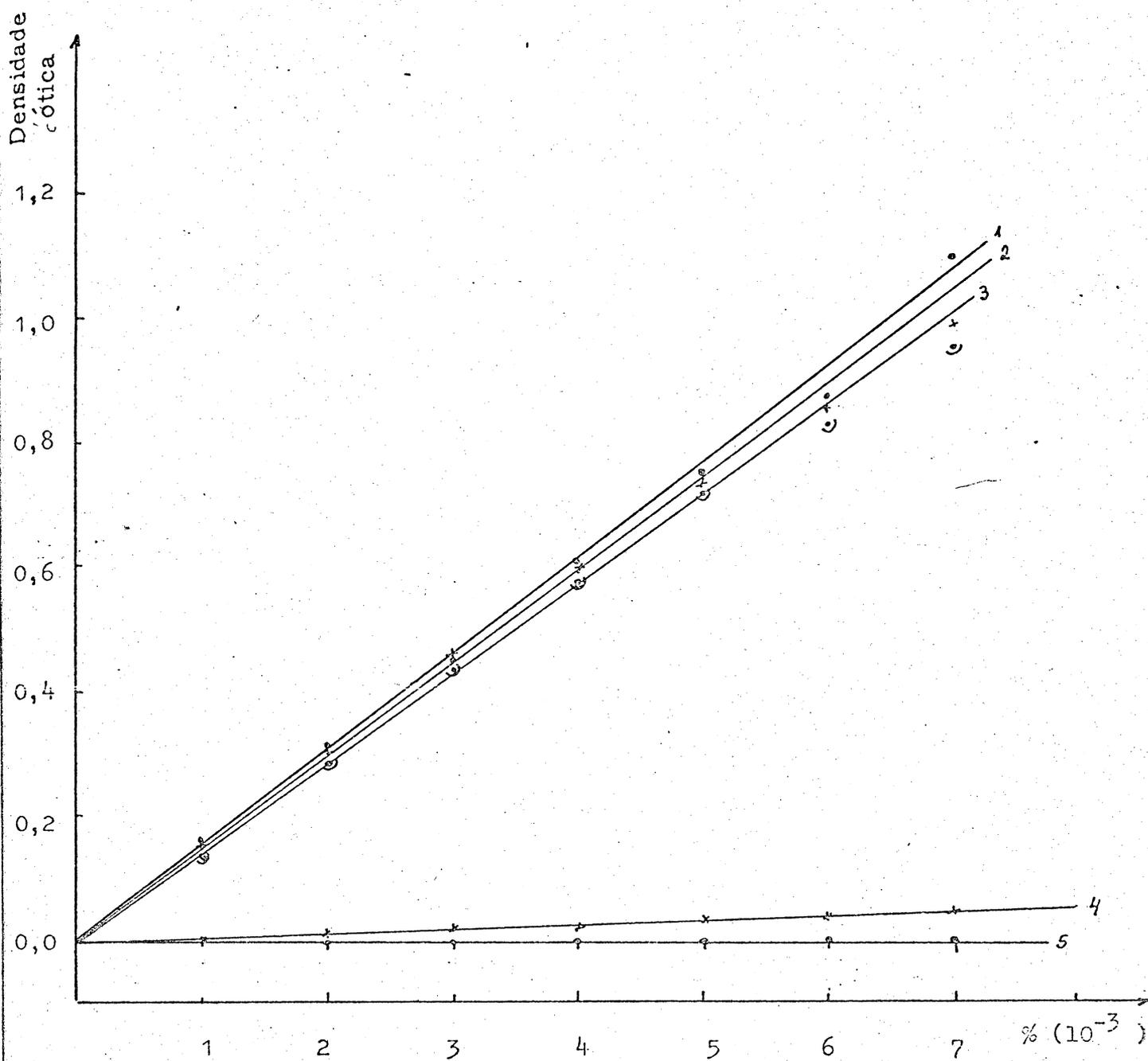


Figura - 1: Variação da densidade ótica a 610 nm com crescentes concentrações de polissacarídeo em cloreto de cálcio 3,7 M, contendo 0,05 % de iodo e 0,21 % iodeto de potássio. 1) Hemicelulose A do sabugo de milho (Zea mays), fração S.M.A.L; 2) hemicelulose A de folha de cafeeiro (Coffea arabica L., var.Mundo Novo), subfracionada com iodo, fração A.2.L.ins.; 3) hemicelulose A da madeira de Mimosa bracaatinga H., insolúvel em água, fração B.A.L; 4) hemicelulose B de Mimosa bracaatinga H., subfracionada por complexação com iodo, solúvel em água, fração B.B.L; hemicelulose B, fração polissacarídica neutra, subfracionada por complexação com iodo, fração B.3.L.

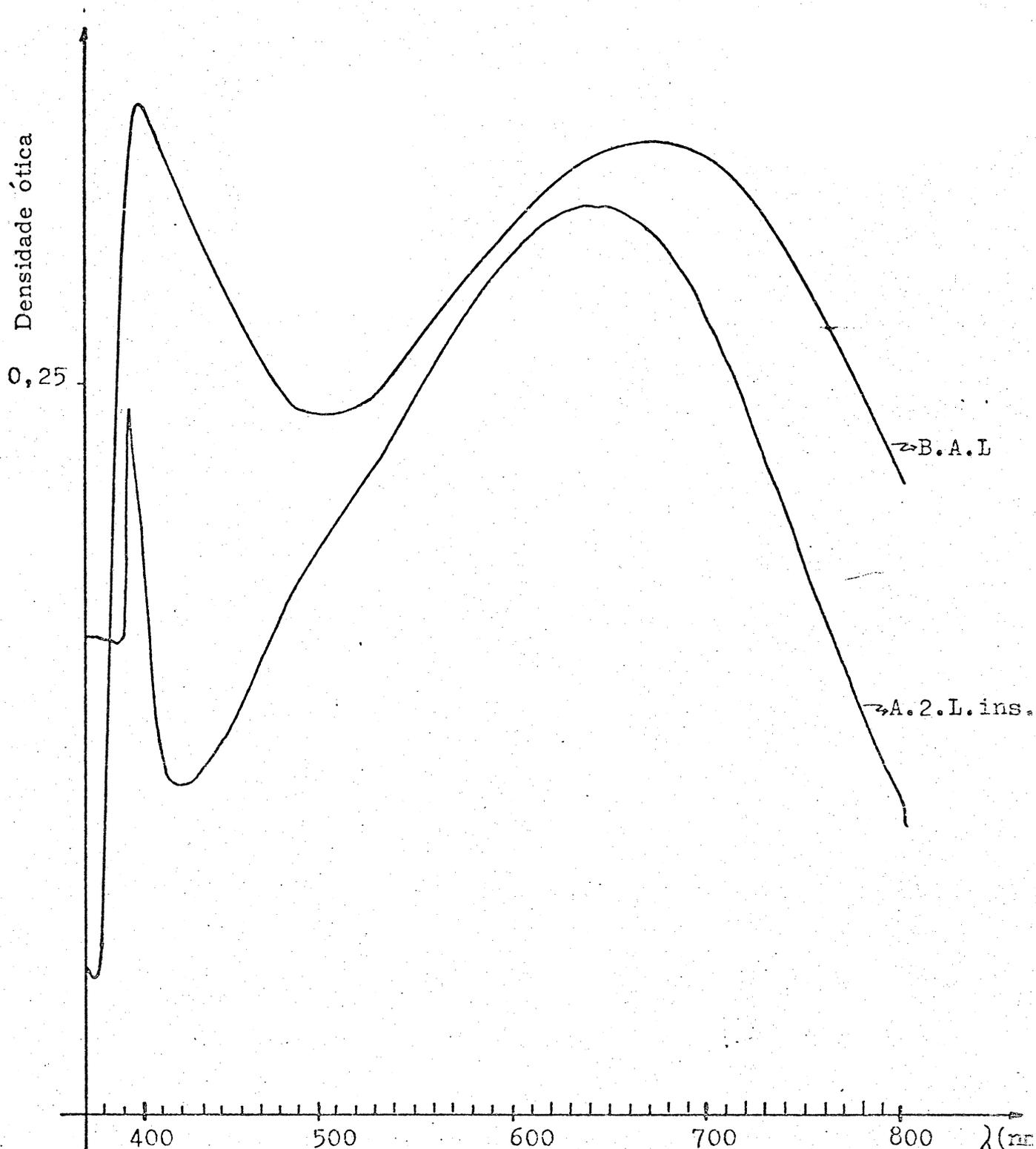


Figura -2: Espectro de absorção das frações polissacarídicas A.2.L.ins. ($\overline{DP}_n = 58,3$) e B.A.L ($\overline{DP}_n = 71,3$) provenientes da folha de cafeeiro (Coffea arabica L., var.Mundo Novo) e da madeira da bracatinga (Mimosa bracaatinga H.), respectivamente. A concentração final de polissacarídeo em CaCl_2 3,7 M, contendo 0,05 % de I_2 e 0,21 % de KI era de 0,002 %. O espectro foi traçado com o aparelho VARIAN TECHTRON, Modelo 635 D, com uma velocidade de varredura de 100 nm/min e velocidade de papel de 3 1/3 cm/min (atenuação 50 mV).

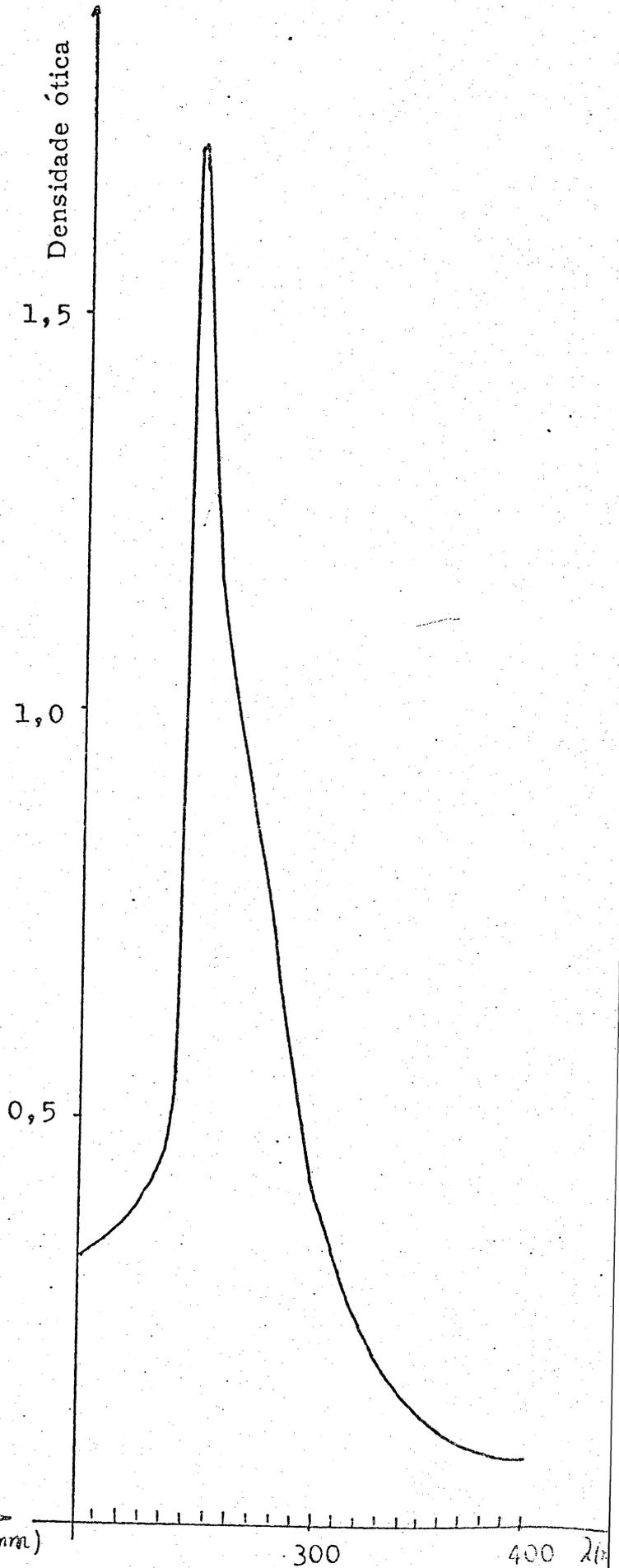
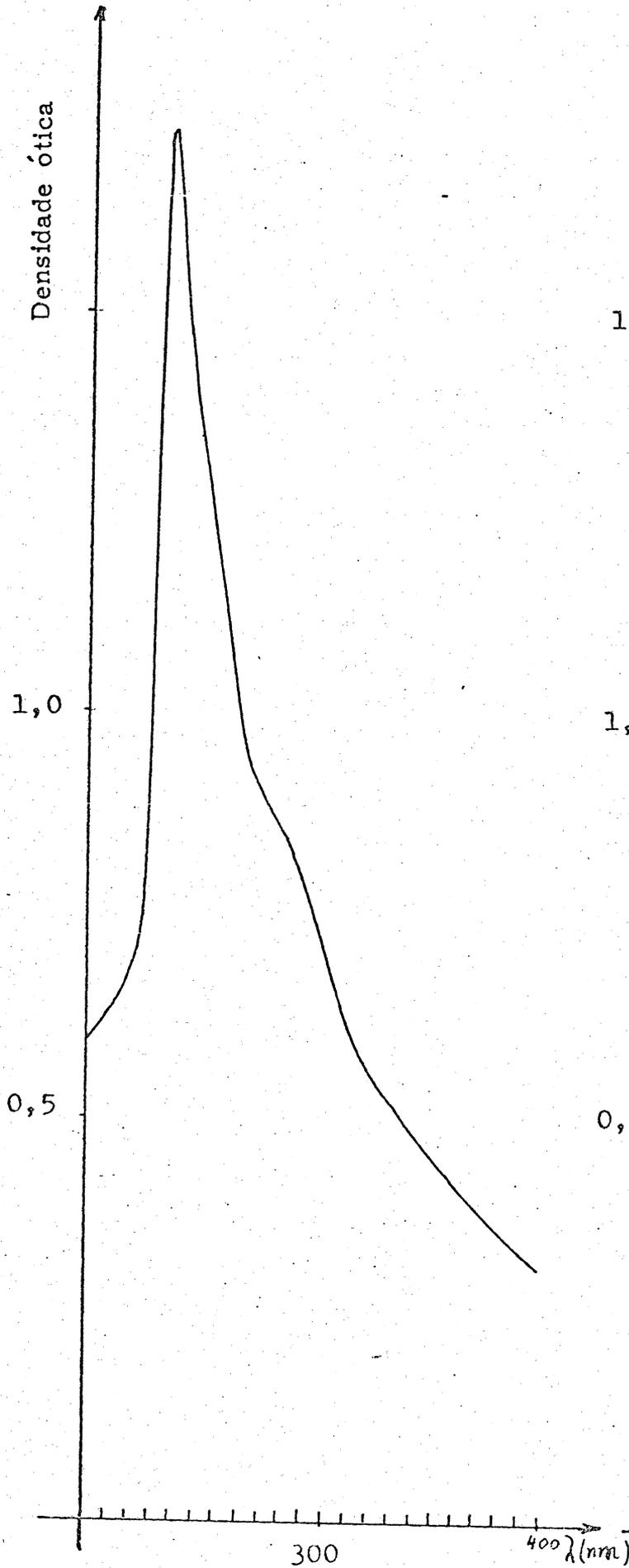


Figura-3: Espectro ultra-violeta da fração A.2.L.ins. dissolvida em NaOH 1 N.*

Figura -4: Espectro ultravioleta da fração A.2.L.ins. na forma de seu derivado metilado dissolvido em clorofórmio.*

*Ambos os espectros foram traçados com o aparelho VARIAN TECHTRON, Modelo 635 D, com uma velocidade de varredura de 100 nm/min e velocidade de papel de 3 1/3 cm/min (atenuação de 200 mV). A concentração de polissacarídeo era de cerca de 0,02 %.

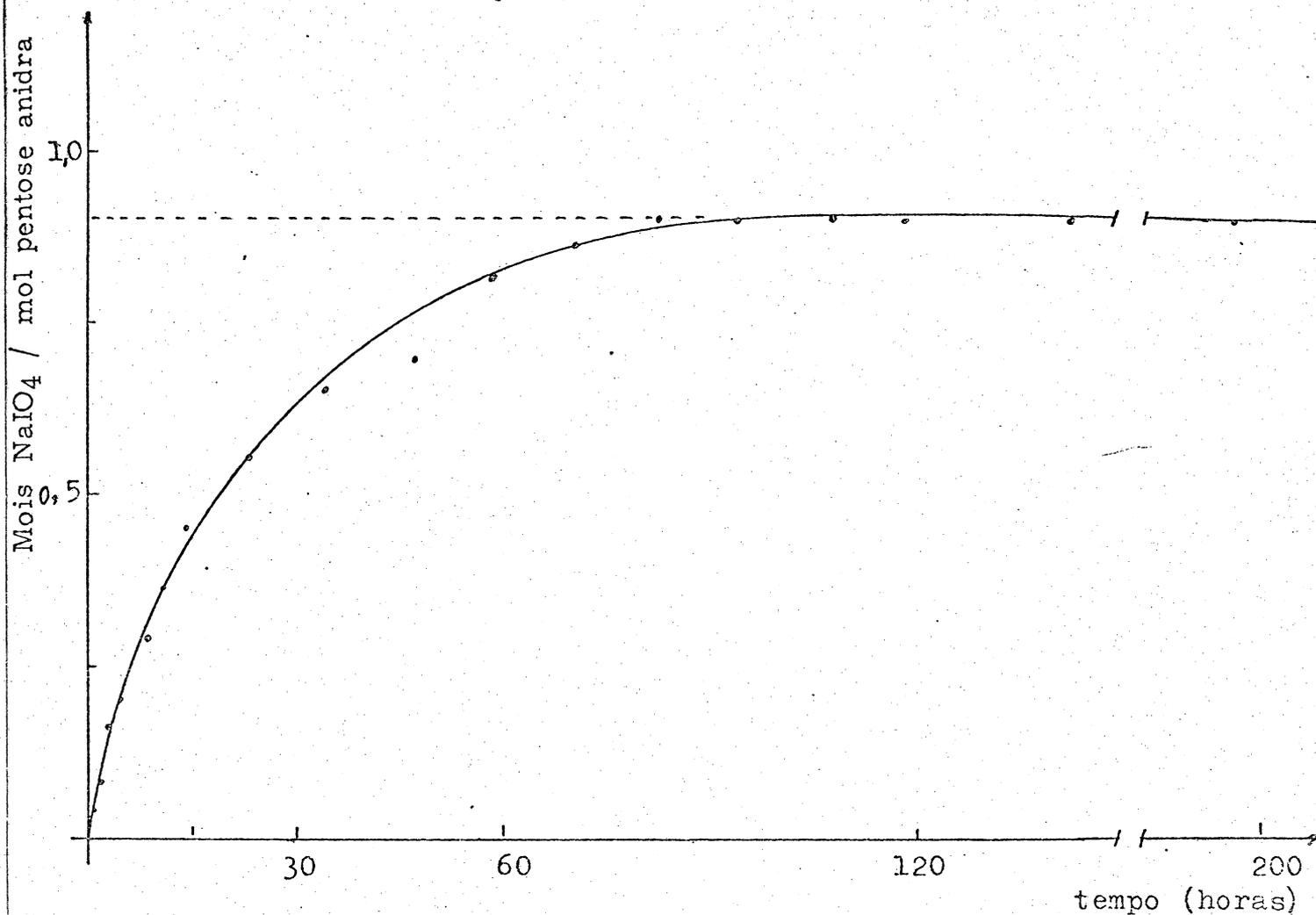


Figura - 5: Determinação do consumo de periodato da fração A.2.L.ins.
 Uma amostra (64,224mg) foi oxidada com periodato de sódio 0,05 M (80ml) à temperatura de 28-30 °C. A diferentes intervalos de tempo foram retiradas alíquotas de 1,0 ml para a determinação do periodato (87) pelo método do tiosulfato de sódio (69); e os valores obtidos foram extrapolados para o tempo zero.

CONCLUSÕES

1. Da folha de cafeeiro, Coffea arabica L., var. Mundo Novo, isolaram-se, por extração alcalina, após remoção das pectinas, várias frações polissacarídicas, cuja composição em resíduos de monoaçúcares é a seguinte: L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose e ácido O-metil-glucurônico.
2. Entre os diversos polissacarídeos existentes na folha de cafeeiro estudou-se um heteropolissacarídeo ácido composto de resíduos de D-xilose (86,55 %) e ácido O-metil-glucurônico (13,45 %).
3. Os dados de metilação indicaram que o polissacarídeo em estudo (O-metil-glucuronoxilano) é um polissacarídeo linear, possuindo ramificações singulares de ácido O-metil-glucurônico ligados ao C-3 da D-xilose. A confirmação da ligação glicosídica do ácido O-metil-glucurônico ao C-3 do resíduo de D-xilose foi obtida pela análise dos produtos de degradação de SMITH dos oligossacarídeos ácidos obtidos por hidrólise parcial ácida deste polissacarídeo.
4. Os dados de metilação, periodato e degradação de SMITH, juntamente com o da determinação de nitrogênio total nas diferentes etapas de fracionamento bem como a reação positiva da ninhidrina com os produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado indicam que existem grupos agliconas, de caráter proteico, ligados ao polissacarídeo estudado.
5. Estudos de complexação com iodo confirmaram a linearidade da cadeia principal do O-metil-glucuronoxilano; além disso indicaram a possibilidade da determinação do \overline{DP}_n , através da medida do $\lambda_{\text{máx}}$ e introdução de seu valor na isoterma de absorção de LANGMUIR.

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Dr. João Batista Chaves Corrêa pelo apoio constante, presença amigã e orientação segura.

- Ao Dr. Carlos Henrique Montanha Viana pela colaboração nas análises do nitrogênio.

- À Companhia de Jesus, nas pessoas de seus superiores, PP. Leopoldo Adami, S.J. e Paulo Englert, S.J., provincial e vice-provincial, respectivamente.

- À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Convênio com o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico/Fundo Técnico Científico (BNDE/FUNTEC) pelo suporte financeiro propiciado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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: 4970-4971, 1952.
2. ADAMS, G.A., Constitution of a polyuronide hemicellulose from wheat leaf, Can. J. Chem., 32: 186-194, 1954.
3. ADAMS, G.A., Lignin determination, In: WHISTLER, R. L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York - London, Acad. Press, 1955, p. 185-187.
4. ADAMS, D.F. & EMERSON, M.T., Variations in starch and total polysaccharide content of pinus ponderosa needles with fluoride fumigation, Plant Physiol., 36: 261-265, 1961.
5. ANDERSON, J. D., ANDREWS, P. & HOUGH, L., Occurrence of 2-O-metil-L-fucose as a constituent of plum leaf polysaccharides, Chem. & Ind. (London), 1453, 1957.
6. ANDERSON, E. & SANDS, L., A discussion of methods of value in research of plant polyuronides, In: PIGMAN, W.W. & WOLFROM, M.L., (Ed.), Adv. Carbohyd. Chem., I, New York, Acad. Press, 1945, p. 329-344.
7. ANDREWS, P. & HOUGH, L., The isolation of 2-O-methyl-D-xylose from plum leaf hemicellulose, Chem. & Ind. (London), 1278, 1956.
8. ANDREWS, P. & HOUGH, L., The biosynthesis of polysaccharides, Part I. The composition of plum-leaf polysaccharides, J. Chem. Soc., 4476-4483, 1958.
9. ANDREWS, P., HOUGH, L. & STACEY, B., Polysaccharide composition of leaves, Nature, 185: 166-167, 1960.
10. ARCHBOLD, H. K. & BARTER, A.M., A fructose anhydride from the leaves of the barley plant, Biochem. J., 29: 2689-2693, 1935.
11. ASPINALL, G.O., Chemistry of the carbohydrates, Annual Review

- of Biochemistry, 31: 79-102, 1962.
12. ASPINALL, G.O., Structural chemistry of the hemicelluloses, In: WOLFROM, M. L. & TIPSON, R.S., (Ed.), Adv. Carbohyd. Chem., XIV, New York - London, Acad. Press, 1959, p.429-468.
 13. ASPINALL, G. O., Gums and mucilages, In: WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S., Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., XXIV, New York, London, Acad. Press, 1969, p. 333-379.
 14. ASPINALL, G.O., Pectins, plant gums and other plant polysaccharides, In: PIGMAN, W. & HORTON, D. (Ed.), The carbohydrates - Chemistry and Biochemistry, II B, New York, Acad. Press, 1970, p. 515-536.
 15. BAGDASARIAN, M., MATHESON, N. A., SYNGE, R. L. M. & YOUNGSON, M.A., New procedures for isolation polypeptides and proteins from tissues - Metabolic incorporation of L-(C¹⁴)-valine into fractions of intermediate molecular weight in broad-bean (*Vicia faba*, L.) leaves, Biochem. J., 91: 91-104, 1964.
 16. BAILEY, S.T., Cell walls in plants, Mc Graw Hill Encyclopedia of Science and Technology, II, New York, McGraw Hill, 1960, p.615-620.
 17. BAILEY, R.W., Carbohydrates, In: DAWSON, R.M.C., ELLIOTT, D. C., ELLIOTT, W.H. & JONES, K.M. (Ed.), Data for Biochemical Research 2nd Edition, Oxford, Clarendon Press, 1972, p. 539-550.
 18. BAILEY, R.W. & CONNOR, H.E., Structural Carbohydrates in the arundinoid genus Cortadeira, Phytochemistry, 12: 1197-1198, 1973.
 19. BAILEY, J.M. & WHELAN, W.J., Physical properties of starch. I. Relationship between iodine stain and chain length, J. Biol. Chem., 236: 969-973, 1961.
 20. BANKS, W., GREENWOOD, C.T. & KHAN, K.M., The interaction of linear amylose oligomers with iodine, Carbohyd. Res., 17: 25-33, 1971.

21. BARKER, S.A., STACEY, M. & ZWEIFEL, G., The separation of neutral polysaccharides, Chem. & Ind. (London), 330, 1957.
22. BARNOUD, F., DUTTON, G.G.S. & JOSELLEAU, J.P., La D-xylanne du roseau *Arundo donax*, Carbohyd. Res., 27: 215-223, 1973.
23. BARTH, F.W. & TIMELL, T.E., The constitution of a hemicellulose from Milkweed (*Asclepias Syriaca*) Floss, J. Am. Chem. Soc., 80: 6320-6325, 1958.
24. BEMILLER, J.N., Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides, In : WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S., Adv. Carbohyd. Chem., XXII, New York- London, Acad. Press, 1967, p.25 -108.
25. BLACK, M. & WILKIE, K.C.B. (to be published), Apud: BUCHALA, A.J. & WILKIE, K.C.B., Total Hemicelluloses from wheat at different stages of growth, Phytochemistry, 12: 499-505, 1973.
26. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N., An examination of some methods for fractionation of plant hemicelluloses, Carbohyd. Res., 17: 253-268, 1971.
27. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N., Evidence for molecular aggregation in hemicelluloses, Carbohyd. Res., 18: 11-21, 1971.
28. BLAKE, J.D., MURPHY, P.T. & RICHARDS, G.N., Isolation and A/B classification of hemicelluloses, Carbohyd. Res., 16: 49-57, 1971.
29. BISHOP, C.T., Isolation of the aldobiuronic acid, 3-(xylopyranosyl)-D-glucopyranoside, from wheat straw hemicellulose and synthesis of its β -isomer, Can. J. Chem., 31: 134-144, 1953.
30. BISHOP, C.T., Carbohydrates of sunflower heads, Can. J. Chem., 33: 1521-1529, 1955.
31. BOUNDY, J.A., TURNER, J.C. & DIMBER, R.J., Hydroxyproline containing mucopolysaccharide from corn pericarp, Federation Proceedings, 24: 607, 1965.
32. BOURNE, E.J., PRIDHAM, J.B. & WORTH, H.G.J., Pectic substances

- in cured and uncured tobacco, Phytochemistry, 6: 423-431, 1967.
33. BOUVENG, H. & LINDBERG, G., Studies on arabinogalactans. II. Fractionation of the arabino-galactan from *Larix occidentalis* Nutt. A methylation study of one of the components. A. Chem. Scand., 12: 1977-1984, 1958.
 34. BOUVENG, H.O., GAREGG, P.J. & LINDBERG, B., Position of the O-acetyl groups in Birch xylan, A. Chem. Scand., 14: 742-748, 1960.
 35. BUCHALA, A.J., An arabinogalacto(4-O-methylglucurono)-xylan from the leaves of *Hordeum vulgare*, Phytochemistry, 12: 1373-1376, 1973.
 36. BUCHALA, A.J. & MEIER, H., A galactoglucomannan from the leaf and stem tissues of red clover (*Trifolium pratense*), Carbohyd. Res., 31: 87-92, 1973.
 37. BUCHALA, A.J. & WILKIE, K.C.B., The ratio of β -(1-3) to β -(1-4) glucosidic linkages in non-endospermic hemicellulosic β -glucans from oat plant (*Avena sativa*) tissues at different stages of maturity, Phytochemistry, 10: 2287-2291, 1971.
 38. BUCHALA, A.J. & WILKIE, K.C.B., Total hemicelluloses from wheat at different stages of growth, Phytochemistry, 12: 499-505, 1973.
 39. BUSTON, H.W., Observations on the nature distribution and development of certain cell-wall constituents of plants, Biochem. J., 29: 196-218, 1935.
 40. CEREZO, A.S., LEZEROVICH, A. & LABRIOLA, R., A xylan from the red seaweed (*Chaetangium fastigiatum*), Carbohyd. Res., 19: 289-296, 1971.
 41. CHEETHAM, N.W.H. & McILROY, R.J., Polysaccharide methylation studies, Carbohyd. Res., 11: 187-191, 1969.

42. CHEETHAM, N.W.H. & McILROY, R.J., Polysaccharides of tropical grass species. I. Grant star grass (*Cynodon plectostachyus*), Carbohydr. Res., 21: 201-210, 1972.
43. CHANDA, S.K., HIRST, E.L., JONES, J.K.N. & PERVIVAL, E.G.V., The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*, L.), J. Chem. Soc., 1289-1297, 1950.
44. COLEMAN, R.J., LENNEY, J.F., CASCIA, A.T. & DiCARLO, F.J., Pectic acid from the mucilage of coffee cherries, Arch. Biochem. Biophys., 59: 157-164, 1955.
45. CORRÊA, J.B.C., Metilação, In: _____, Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos, Curitiba, 1971, p. 39-49 (Monografia didática).
46. CORRÊA, J.B.C., Identificação e determinação parcial da estrutura de um galactoarabano do material péctico de frutos de café cereja, Curitiba, 1969 (TESE de Doutorado).
47. CORRÊA, J.B.C. & FONTANA, J.D., Polysaccharide from epicarp and mesocarp of coffee cherries, Part I. Some structural studies of neutral galactorabane, An. Acad. Brasil. Ciênc., 43: 803-812, 1971.
48. CORRÊA, J.B.C., ODEBRECHT, S. & FONTANA, J.D., Polissacarídeos do epicarpo e mesocarpo de café cereja. Parte II. Fracionamento e hidrólise ácida parcial da pectina solúvel em água, An. Acad. Brasil. Ciênc. (No prelo).
49. CORRÊA, J.B.C., ODEBRECHT, S. & FONTANA, J.D., Polysaccharide from epicarp and mesocarp of coffee cherries. Part III. Structural features of pectic acid, An. Acad. Brasil. Ciênc., (no prelo).
50. CZAPEK, F., Biochemie der Pflanzen, Jena Verlag von Gustav Fischer, I, 1905, p. 536.
51. DELVIN, R.M., La célula vegetal: estructura y funcionamiento de sus partes, In: _____, Fisiologia vegetal, Barcelona, Edi-

ciones Omega, 1970, p. 13-31.

52. DENT, C.E., A study of the behaviour of some sixty amino-acids and other nihydrin-reacting substances on phenol-'collidin' filter-paper chromatogram with notes as to the occurrence of some of them in Biological fluids, Biochem. J., 43:169-180, 1948.
53. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem., 28: 350-356, 1956.
54. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T., Electrophoresis of dyed polysaccharides on cellulose acetate, Can. J. Chem., 46: 3079-3084, 1968.
55. DUTTON, G.G.S. & KABIR, M.S., A comparison of the xylans from corn leaves and stalks, Phytochemistry, 11: 779-785, 1972.
56. FISCHER, F.G. & DÖRFEL, H., Z. Physiol. Chem. 297:164, 1954, Apud: REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B., An acidic Glactoarabinoxylan and other pure hemicelluloses in oat leaf, Phytochemistry, 8:2053-2058, 1969.
57. FORD, C.W., Arabinogalactan from Phaseolus atropurpureus leaves, Phytochemistry, 11: 2559-2562, 1972.
58. FRASER, C.G. & WILKIE, K.C.B., A hemicellulosic glucan from oat leaf, Phytochemistry, 10: 199-204, 1971.
59. FRASER, C.G. & WILKIE, K.C.B., β -glucans from oat leaf tissues at different stages of maturity, Phytochemistry, 10: 1539-1542, 1971.
60. GAILLARD, B.D.E., Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes, Nature, 191: 1295-1296, 1961.
61. GAILLARD, B.D.E., Separation of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families, Phytochemistry, 4: 631-634, 1965.

62. GAILLARD, B.D.E. & BAILEY, R.W., Distribution of galactose and mannose in the cell-wall polysaccharides of red clover (*Trifolium pratense*) leaves and stems, Phytochemistry, 7: 2039-2044, 1968; Apud: Chem. Abstr., 70: 873 g, 1969.
63. GAILLARD, B.D.E. & BAILEY, R.W., Reaction with iodine of polysaccharides dissolved in strong calcium chloride, Nature, 212: 202-203, 1966.
64. GAILLARD, B.D.E. & THOMPSON, N.S., Interaction of polysaccharide with iodine. Part II. The behavior of xylans in different salt solutions, Carbohyd. Res., 18: 137-146, 1971.
65. GAILLARD, B.D.E., THOMPSON, N.S. & MORAK, A.J., The interaction of polysaccharides with iodine, Part I. Investigation of the general nature of the reaction, Carbohyd. Res., 11: 509-519, 1969.
66. GILSON, E., La Cellule, Tome XI. p. 19, 1895, Apud: CZAPEK, F., Biochemie der Pflanzen, I, Jena, Verlag von Gustav Fischer, 1905, p. 537.
67. GLOMAUD, J.Cl., PERCHERON, F. & COURTOIS, J.E., Teneurs comparés en oligosaccharides de quelques variétés de café vert. Étude préliminaire des polysaccharides extractibles par l'eau, Communication présentée au Second Colloque International sur la Chimie des Cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, Paris, 1965, p. 39-41.
68. GOODMAN, R.N., KIRÁLY, Z. & ZAITLIN, M., Cell wall composition and metabolism, In: _____, The Biochemistry and Physiology of infections plant disease, Princeton, D. Van Nostrand Company, 1967, p. 107-150.
69. GOLDSTEIN, I.J., HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F., Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1965, p. 361-370.

70. GREMLI, H. & JULIANO, B.O., Studies on alkali-soluble rice-bran hemicelluloses, Carbohyd. Res., 12:273-276, 1970.
71. GUTHRIE, R.D., Periodate oxidation. Experimental conditions, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., I, New York, Acad. Press, 1962, p. 432-435.
72. GUTHRIE, R.D., Periodate oxidation. Determination of periodate, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., I, New York, Acad. Press, 1962, p. 435-441.
73. HAGELUND, E., LINDBERG, B. & McPHERSON, J., Dimethylsulphoxide, a solvent for hemicelluloses, A. Chem. Scand., 10:1160-1164, 1956,
74. HAY, G.W., LEWIS, B.A., SMITH, F. & UNRAU, A.M., Determination of reducing end-groups by periodate oxidation, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1965, p.251-253.
75. HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F., Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1965, p. 357-361.
76. HENDERSON, 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, Carbohyd. Res., 23: 379-398, 1972.
77. HIRT, L. & STOLKOWSKI, J., *Biologie cellulaire*, Paris, Press Universitaires de France, 1966, p.183.
78. HERNAN, C.V., Methods of extraction of pectins from coffee, Cenicafe, 13: 69-74, 1962, Apud: Chem. Abstr., 59:8055 e, 1953.
79. HIRST, E.L. & PERCIVAL, E., Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1965, p. 287-296.

80. HOUGH, L., JONES, J.K.N. & WADMAN, W.H., Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatography, J.Chem. Soc., 1702-1706, 1950.
81. JONES, J.K.N., Comunicação pessoal.
82. JONES, J.K.N., PURVES, C.B. & TIMELL, T.E., Constitution of a 4-O-methylglucuronoxylan from the wood of tremblin aspen (*Populus tremuloides* Michx.), Can. J. Chem., 39: 1059-1066, 1961.
83. KRATZL, K., Biochemie des Holzes. Ein Bericht über Symposium II, In: AUERSWALD, W. (Ed.), Transactions of the plenary sessions, Proceedings of the IVth International Congress of Biochemistry (Vienna), XIV, London, Pergamon Press, 1959, p. 102-140.
- 83a. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, J.Biol. Chem., 193: 265-275.
84. MEIER, H., Fractionation with barium hydroxyde, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press 1965, p.45-46.
85. MORRISON, I.M., Isolation and analysis of lignin-carbohydrate complexes from *Lolium multiflorum*, Phytochemistry, 12: 2979-2984, 1973.
86. MORRISON, I.M., Lignin-carbohydrate complexes from *Lolium perenne*, Phytochemistry, 13: 1161, 1165, 1974.
87. NEUMULLER, G. & VASSEUR, E., The influences of pH on the periodate oxidation of carbohydrates, Arkiv För Kemi, 5: 235-245, 1953.
88. OFFORD, R.E., Detection of biochemical compound: amino acids, peptides and proteins, In: DAWSON, R.M.C., ELLIOT, D.C.,

- ELLIOTT, W.H. & JONES, K.M. (Ed.), Data for Biochemical Research, 2nd. edition, Oxford, Clarendon Press, 1972, p.525-535.
89. O'DWYER, M.H., The hemicelluloses. Part IV. The hemicelluloses of beech wood, Biochem. J., 20: 656-664, 1926.
90. PARTRIDGE, O. A., Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars, Nature, 164: 443, 1949.
91. OHLWEILER, O.A., Teoria e prática da análise quantitativa inorgânica, IV, Brasília, Editora Universidade de Brasília, 1968, p. 1001-1004.
92. PERCIVAL, E., Algal polysaccharides, In: PIGMAN, W. & HORTON, D. (Ed.), The Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry, II B, New York, Acad. Press, 1970, p. 537-568.
93. PICTET, F.A. & MOREAU, A., Carbohydrates of green coffee, their solubilization in water and their assay, Colloq. Int. Chim. Cafés Verts Torrefiés Leurs Deriv., 4th, 1969, 75-84, Apud: Chem. Abstr., 74: 98281 t, 1971.
94. POLGLASE, W.J., Polysaccharides associated with wood cellulose, In: WOLFROM, M.L. & TIPSON, R.S., Adv. Carbohyd. Chem., X, New York, Acad. Press, 1955, p. 283-333.
95. REES, D.A. & SKERRETT, R.J., Conformational analysis of cellobiose, cellulose and xylan, Carbohyd. Res., 7: 334-348, 1968.
96. REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B., Polysaccharides of the oat plant in relationship to plant growth, Phytochemistry, 8: 2045-2051, 1969.
97. REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B., An acidic galactoarabinoxylan and other pure hemicelluloses in oat leaf, Phytochemistry, 8: 2053-2058, 1969.
98. REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B., Total hemicelluloses from oat plants at different stages of growth, Phytochemistry, 8: 2059-2065, 1969.

99. SANELLA, J.L. & WHISTLER, R.L., Hemicellulose, In: McGraw Hill Encyclopedia of Science and Technology, VI, 1960, 398-399.
100. SCHULZE, E., Ber. Chem. Ges., Bd. XXIV, p. 2277, 1891, Apud: CZAPEK, F., Biochemie der Pflanzen, Jena, Verlag von Gustav Fischer, 1905, p. 536.
101. SCOTT, J.E., Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides, In: GLICK, D. (Ed.), Methods Biochem. Anal., VIII, New York, Interscience Publishers, 1960, p. 145-197.
102. SCOTT, J.E., Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1965, p. 38-44.
103. SHADAKSHARASWAMY, M., Acid soluble polysaccharide of coffee seeds, Curr. Sci., 37: 583-584, 1968, Apud: Chem. Abstr., 70: 9345 u, 1969.
104. SHAFIZADEH, F & MCGINNIS, G.D., Morphology and biogenesis of cellulose and plant cell-walls, In: TIPSON, R.S. & HORTON, D., Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., XXVI, New York, Acad. Press, 1971, p. 297-349.
105. SILBERMAN, H.C., Reactions of sugars in the presence of acids: a chromatographic study, J. Org. Chem., 26: 1967-1969, 1961.
106. SRIVASTAVA, H.C., SINGH, P.P., HARSCHE, S.N. & VIRK, K., Methylation of polysaccharides with dimethylsulfate, Tetrahedron Letters, No 10: 493-498, 1968.
107. STAUB, A.M., Removal of proteins. Sevag Method, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1965, p. 5-6.
108. STEPHEN, A.M., KAPLAN, M., TAYLOR, G.L. & LEISENGANG, E.C., Application of gas-liquid chromatography to the structural investigation of polysaccharides, Tetrahedron Supplement, 7: 233-240, 1966.

109. STEWART, C.R., Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark, Plant Physiology, 48: 792-794, 1971.
110. STEWART, C.R., MORRIS, C.J. & THOMPSON, J.F., Changes in amino-acid content of excised leaves during incubation. II. Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves, Plant Physiology, 41:1585-1590, 1966.
111. SWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H. & JEANES, A., Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography, Anal. Chem., 37:1602-1604, 1965.
112. TALMAGE, K.W., KEEGSTRA, K., BAUER, W.D. & ALBERSHEIM, P., The structure of plant cell walls, I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides, Plant Physiology, 51:158-173, 1973.
113. THALER, H., Soluble mannan of roasted coffee, Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch., 106: 128-132, 1957, Apud: Chem. Abstr., 52: 610 c, 1958.
114. THALER, H., Coffee and Coffee. II. Extraction of coffee with cold and hot water, Deut. Lebensm. Rundschau, 53: 49-51, 1957, Apud: Chem. Abstr. 52:5695 i, 1958.
115. THALER, H., Coffee and coffee substitutes. III. Alcohol precipitates in coffee, Deut. Lebensm. Rundschau, 53:146-148, 1957, Apud: Chem. Abstr., 52: 5696 a, 1958.
116. THALER, H., Coffee and coffee substitutes. V. Quantitative determination of soluble mannan in coffee infusions and extracts, Z. Lebensm.-Untersuch. u. Forsch., 110: 442-449, 1959, Apud: Chem. Abstr., 54: 4961 c, 1960.
117. THALER, H. & ARNETH, W., Coffee and coffee substitutes. XI. Polysaccharides of green coffee arabica beans, Z. Lebensm.-Untersuch. u. Forsch., 138: 26-35, 1968, Apud: Chem. Abstr., 69: 75743 c, 1968.

118. THALER, H. & ARNETH, W., Coffee and coffee substitutes. XIII. Behavior of polysaccharide complexes of raw arabica coffee during roasting, Z. Lebensm.-Untersuch. u. Forsch., 140: 101-109, 1969, Apud: Chem. Abstr., 71: 48488 h, 1969.
119. THALER, H. & ARNETH, W., Highly polymerized carbohydrates of green and roasted coffee, Int. Colloq. Chem. Caffee, 3rd, 1967, p.127-136, Apud: Chem. Abstr., 70:86396 p, 1969.
120. THALER, H. & ARNETH, W., Coffee and coffee substitutes, XII. Polysaccharides of roasted arabica coffee, Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch., 138: 137-145, 1968, Apud: Chem. Abstr. 70: 19023 b, 1969.
121. TIMELL, T.E., Wood hemicelluloses. Part I, In: WOLFROM, M.L. (Ed.), Adv. Carbohyd. Chem., XIX, New York, Acad. Press, 1964, p. 247-302.
122. TIMELL, T.E., Wood hemicelluloses. Part II, In: WOLFROM, M.L., (Ed.), Adv. Carbohyd. Chem., XX, New York, Acad. Press, 1965, p. 409-483.
123. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S., Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents, Nature, 166:444-445, 1950.
124. UNRAU, A.M. & SMITH, F., A chemical method for the determination of the molecular weight of certain polysaccharides, Chem.&Ind. (London), 330-331, 1957.
125. VICKERY, H.B., The effect of temperature on the behavior of malic acid and starch in leaves of *Bryophyllum calycinum* cultured in darkness, Plant Physiol., 29: 385-392, 1954.
126. WIESNER, J., Note über das Verhalten des Phloroglucins und einiger verwandter Körper zur verholzten Zellmembranen, Sitzber Wien. Akad., 1878, LXXVII, 60: TUNNMAN, O. & ROSENTHALER, L., Die Zellmembranen, In: ____, Pflanzenmikrochemie, 2^a ed., Berlin, Verlag von Gebrüder Bornträger, 1931, p. 884-1011.
127. WHISTLER, R.L., Xylan, In: HUDSON, C.S. & CANTOR, S.M. (Ed.),

- Adv. Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1950, p.269-290.
128. WHISTLER, R.L. & DESZYCK, J., General composition of Switch grass, Panicum virgatum, Archiv. Biochem. Biophys., 44: 484-491, 1953.
129. WHISTLER, R.L. & FEATHER, M.S., Hemicelluloses. Extraction from annual plants with alkaline solutions, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., V, New York, Acad. Press, 1965, p. 144-145.
130. WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L., Hemicelluloses, In: PIGMAN, W. & HORTON, K. (Ed.), The carbohydrates - Chemistry and Biochemistry, II A, New York, Acad. Press, 1970, p. 447-469.
131. WHISTLER, R.L. & SANELLA, J.L., Hemicelluloses, In: HOFFMAN-OSTENHOF, O. & WOLFROM, M.L. (Ed.), Carbohydrate Chemistry of substances of biological Interest, Proceedings of IVth International Congress of Biochemistry (Vienna), I, London, Pergamon Press, 1959, p. 1-14.
132. WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L., Hemicelluloses, In: PIGMAN, W. & HORTON, D. (Ed.), The Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry, II A, New York, Acad. Press, 1970, p. 447-469.
133. WISE, L.W. & RATLIFF, E.K., Quantitative isolation of hemicelluloses and the summative analysis of wood, Anal. Chem., 19: 459-462, 1947.
134. WOLFROM, M.L., Carbohydrate Chemistry of substances of biological interest. A report on Symposium I, In: AUERSWALD, W. (Ed.), Transactions of the Plenary Sessions, Proceedings of the IV th International Congress of Biochemistry (Vienna), XIV, London, Pergamon Press, 1959, p. 89-101.
135. WOLFROM, M.L. & PATIN, D.L., Isolation and characterization of cellulose in the coffee bean, J. Agr. Food Chem., 12: 376-378, 1964, Apud: Chem. Abstr., 61: 6283 d, 1964.

136. WOLFROM, M.L., LAVER, M.L. & PATIN, D.L., Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and Characterization of a mannan, J. Org. Chem., 26:4533-4535, 1961.
137. WOLFROM, M.L. & ANDERSON, L.E., Polysaccharides from instant coffee powder, J. Agr. Food Chem., 15: 685-687, 1967.
138. WOLFROM, M.L. & PATIN, D.L., Carbohydrates of the coffee bean. IV. Arabinogalactan, J. Org. Chem., 30: 4060-4063, 1965.
139. WOLFROM, M.L. & THOMSON, A., Acetylation, In: WHISTLER, R.L. (Ed.), Methods Carbohyd. Chem., II, New York, Acad. Press, 1963, p.211-215.

E R R A T A

Página	Onde se lê:	leia-se:
9	... dos precipitados etanólicos obtidos dos extratos de café torrado com água quente e fria, consistindo...	...dos precipitados etanólicos, obtidos dos extratos aquosos (a quente e a frio) de café torrado, consistindo...
26	foram verificadas	foi verificado
29	processo de extração Soxhlet	processo de extração em aparelho Soxhlet
34	denomido centrifugado	denominado centrifugação
37	...suspensão polissacáridica de cor clara resultante, foi	... suspensão polissacáridica resultante, de cor clara, foi
44	O acetato de chumbo precipitado foi removido...	O acetato de chumbo precipitado, sob a forma de sulfato, foi removido...
56	Como a extração alcalina foi conduzida foi conduzida à temperatura...	Como a extração alcalina foi conduzida à temperatura...
59,66	grupos singulares	cadeias laterais simples
64	padrões	dados da literatura
67,68,70	etileno glicol	glicaldeído
70	possíveis produtos	produtos teóricos
80	...em estudo (O-metil-glucuronxilano) é um polissacarídeo linear, possuindo ramificações singulares de ácido O-metil-glucurônico ligados ao C-3 da D-xilose. A confirmação...	...em estudo apresenta uma cadeia principal linear, formada de resíduos de D-xilose, à qual estão ligadas cadeias laterais simples, formadas por ácido O-metil-D-glucurônico. O ponto de ramificação deste polissacarídeo ocorre no C-3 do resíduo de D-xilose. A confirmação...