

ÍNDICE

	Pág.
Agradecimentos	i
Resumo	iv
Abstract	vi
Símbolos e Abreviaturas	viii
Índice	xi

PARTE I - INTRODUÇÃO

1- Considerações Teóricas

1.1- A Parede Celular das Plantas

1.1.1- Definição e Importância	1
1.1.2- Estrutura	1

1.2- Composição da Parede Celular das Plantas

1.2.1- Principais Componentes da Parede Celular	3
1.2.2- Substâncias Pécnicas	6
1.2.3- Hemiceluloses	10
1.2.4- Celulose	12
1.2.5- Proteínas e Glicoproteínas	12
1.2.6- Compostos Fenólicos	13
1.2.7- Polímeros da Parede Celular de Tecidos Lenhificados	14
a) Glucuronoxilanas	14
b) Lenhina	15

1.3- Metodologia Aplicada ao Estudo das Paredes Celulares	
1.3.1- Preparação do Material das Paredes Celulares	16
1.3.2- Extracção e Isolamento dos Componentes das Paredes	
Celulares	18
a) Solubilização de Substâncias Pécnicas	18
b) Purificação de Substâncias Pécnicas	21
c) Solubilização de Hemiceluloses	21
d) Purificação de Hemiceluloses	22
1.4- A Azeitona	
1.4.1- Considerações Gerais	22
1.4.2- Tipos de Estrutura Celular	25
1.4.3- Métodos de Processamento	26
1.4.4- Variações de Textura Durante o Amadurecimento	28
1.5- Sumário e Âmbito do Trabalho	29

PARTE II - MATERIAL E MÉTODOS

2- Procedimento Experimental

2.1- Azeitonas Utilizadas na Presente Investigação	33
2.2- Equipamento	33

2.3- Ensaio com Resíduos Insolúveis em Álcool	
2.3.1- Preparação do AIR	35
2.3.2- Preparação de AIR's de Diferentes Camadas da Polpa	36
2.3.3- Preparação do CWM a partir do AIR (AIR/PAW)	37
2.3.4- Extracção Sequencial do AIR/PAW	37
2.4- Preparação do CWM da Polpa	
2.4.1- Azeitonas em Fresco	38
2.4.2- Azeitonas Processadas	39
a) Verdes	39
b) Pretas	41
2.5- Extracção Sequencial do CWM	
2.5.1- Azeitonas em Fresco	42
2.5.2- Azeitonas Processadas	46
2.6- Tratamento de RC2 com Clorito / Ácido Acético	46
2.7- Extracção do CWM com Água Quente	47
2.8- Preparação dos Tecidos Lenhificados do Carço	
2.8.1- Preparação do CWM (CWMst)	48
2.8.2- Deslenhificação do CWMst	49
2.8.3- Extracção Sequencial da Holocelulose	50
2.9- Extracção de Lenhina do CWMst com 1,4-dioxano	50

2.10- Precipitação Gradual com Etanol	
2.10.1- Amostras Solúveis em Água	53
2.10.2- Amostras Insolúveis em Água	54
2.11- Cromatografia em Coluna	
2.11.1- Cromatografia de Troca Aniônica	54
a) DEAE-Trisacryl M	55
b) DEAE-Sephacel	57
2.11.2- Cromatografia de Filtração em Gel	57
a) Sephacryl	58
b) Bio-Gel	58
2.12- Fraccionamento de Glucuronoxilanas	
2.12.1- Utilização de Soluções de Cu (II)	59
2.12.2- Variação do pH	59
2.13- Hidrólise Ácida Parcial da Glucuronoxilana	60
2.14- Tratamento de Complexos Xilana-Xiloglucana com Xilanase	61
2.15- Determinação de Açúcares	
2.15.1- Método Colorimétrico Utilizando Fenol/Ácido Sulfúrico	61
a) Adaptação do Método Colorimétrico às Fracções da Cromatografia em Coluna	61
b) Amostras Ricas em Compostos Fenólicos	62
2.15.2- Método Colorimétrico para Determinação de Ácido Urónico	62
2.16- Acetatos de Alditol	63
2.16.1- Adaptação do Método de Selvendran et al. (1979)	64
2.16.2- Adaptação do Método de Blakeney et al. (1983)	65

2.17- Análise por Metilação	66
2.17.1- Adaptação do Método de Hakomori (1964)	67
a) Preparação do Anião	67
b) Formação de Alcóxidos e Reacção de Metilação	68
c) Hidrólise, Redução e Acetilação	68
2.17.2- Adaptação do Método de Ciucanu e Kerek (1984)	69
a) Reacção de Metilação	70
b) Hidrólise, Redução e Acetilação	70
2.17.3- Redução de Grupos Carboxílicos	70
2.18- Quantificação de Hidroxiprolina	71
2.19- Análise da Proteína Total	72
2.20- Espectroscopia de RMN	72
2.21- Espectros de Absorção da Lenhina no Ultra-violeta	72

PARTE III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 - Isolamento e Análise dos Polímeros da Parede Celular da Polpa da Azeitona

3.1- Experiências Preliminares com o AIR, AIR/PAW e CWM	
3.1.1- Preparação do AIR	76
3.1.2- Análise de Diferentes Camadas da Polpa	77
3.1.3- Preparação do CWM a partir do AIR	77

3.1.4- Estudos Comparativos do CWM com o AIR/PAW	78
3.2- Preparação do CWM	80
3.3- Extracção Sequencial do CWM	82
3.3.1- Extracções com CDTA e Na ₂ CO ₃	84
3.3.2- Extracções com Soluções de KOH	85
3.3.3- Extracções a partir de RC1	86
3.4- Fraccionamento dos Extractos	86
3.4.1- Fraccionamento dos Extractos de CDTA e Na ₂ CO ₃	87
3.4.2- Fraccionamento dos Extractos de KOH e Clorito	91
3.5- Análise das Ligações Glicosídicas	97
3.5.1- Metilação do CWM, AIR-1 e AIR-4	97
3.5.2- Fracções Extraídas com CDTA e Na ₂ CO ₃	100
a) Espectroscopia de RMN de ¹³ C das Fracções NC1 e NC2	102
3.5.3- Fracções Extraídas com 1M KOH	104
a) Espectroscopia de RMN de ¹³ C da Xilana da Fracção K10	106
3.5.4- Fracções Extraídas com 4M KOH	107
3.5.5- Fracções do Resíduo Rico em Celulose (RC1)	109
3.6- Discussão Geral	111

4 - Estudo de Complexos da Parede Celular

4.1- Caracterização dos Polímeros do Extracto de SDS 0,5%	
4.1.1- Precipitação com Etanol	114
4.1.2- Fraccionamento dos Polímeros Precipitados em 65% de Etanol	115

4.1.3- Fraccionamento dos Polímeros Precipitados em 80% de Etanol	119
4.1.4- Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação	120
4.2- Investigação Detalhada de Complexos Xilana-Xiloglucana	
4.2.1- Fraccionamento do Extracto de 1M KOH 1°C (Hemicelulose B)	122
a) Precipitação com Etanol	122
b) Fraccionamento por Cromatografia de Troca Aniónica	124
c) Fraccionamento por Cromatografia de Exclusão em Gel	126
4.2.2- Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação	129
4.2.3- Tratamentos com Xilanase	131
a) Cromatografia de Exclusão em Gel de Sephacryl S-400	131
b) Análise das Ligações Glicosídicas	132
4.3- Discussão Geral	135

5 - Efeito do Processamento na Parede Celular da Azeitona

5.1- Preparação do CWM	139
5.1.1- Azeitonas Processadas em Verde	140
5.1.2- Azeitonas Processadas em Preto	141
5.1.3- Efeito do Processamento na Preparação do CWM	142
5.2- Extração Sequencial do CWM	
5.2.1- Azeitonas Processadas	144
a) Azeitonas Processadas em Verde	144
b) Azeitonas Processadas em Preto	145
c) Efeito do Processamento na Extração Sequencial do CWM	147
5.2.2- Extração do CWM de Azeitonas Frescas com Água Quente	150

5.3- Fraccionamento dos Extractos	
5.3.1- Fraccionamento de Extractos Ricos em Substâncias Pécnicas	151
a) Extractos de CDTA	151
b) Extracto Obtido com Água Quente	153
c) Extractos de 0,5% SDS	155
5.3.2- Fraccionamento dos Extractos Ricos em Glucuronoxilanas	156
5.3.2- Fraccionamento dos Extractos Ricos em Xiloglucanas	158
a) Azeitonas Processadas em Verde	158
b) Azeitonas Processadas em Preto	159
5.4- Análise das Ligações Glicosídicas	
5.4.1- Substâncias Pécnicas	160
5.4.2- Glucuronoxilanas	162
5.5- Discussão Geral	164
6 - Isolamento e Caracterização dos Polímeros das Paredes Celulares dos Tecidos Lenhificados do Carço da Azeitona	
6.1- Preparação do CWM	167
6.2- Deslenhificação do CWMst	
6.2.1- Tratamento do CWMst com Clorito / Ácido Acético	167
6.2.2- Tratamento do CWM com Dioxano:H ₂ O:HCl	169
6.2.3- Espectros de Absorção de Lenhina no Ultra-Violeta	171
6.3- Extracção Sequencial da Holocelulose	172

6.4- Fraccionamento dos Extractos	
6.4.1- Polímeros Solubilizados pelo Clorito	173
6.4.2- Polímeros Solubilizados com 1,4-Dioxano	175
6.4.3- Hemicelulose B da Fracção Extraída com 0,5M KOH	175
6.4.4- Hemicelulose A das Fracções Extraídas com 0,5M e 1M KOH	177
6.5- Análise das Ligações Glicosídicas	178
6.5.1- Metilação do CWM e da Holocelulose	179
6.5.2- Complexos Xilanas-Polissacarídeos Pécticos	181
6.5.3- Glucuronoxilanas	184
a) Hidrólise Ácida Parcial	185
6.5.4- Fracções da α -celulose	186
6.6- Discussão Geral	187
7 - Conclusões	189
PARTE IV - BIBLIOGRAFIA	196