

1.1 - A Parede Celular das Plantas

1.1.1 - Definição e Importância

As paredes celulares dos tecidos parenquimatosos e dos imaturos são os principais componentes estruturais das células das plantas, as quais envolvem e dão forma aos protoplastos. São compostas por polissacarídeos e pequenas quantidades de proteínas e compostos fenólicos que vão sofrendo alterações ao longo da vida das células. São estruturas muito complexas que possuem uma grande diversidade de funções durante a vida da planta: proporcionam às células robustez mecânica, mantêm a sua morfologia, controlam a expansão celular e o transporte intercelular, protegem a célula contra a maioria dos organismos potencialmente patogénicos e predadores, participam na comunicação intercelular e contribuem em alguns casos como reserva alimentar (Northcote, 1972; Brett e Waldron, 1990).

1.1.2 - Estrutura

Os tecidos parenquimatosos das plantas dicotiledóneas possuem paredes celulares primárias e camadas intercelulares (lamela média) ricas em substâncias pécticas mergulhadas num meio aquoso.

Segundo o modelo clássico, a parede celular primária é constituída por duas fases, uma microfibrilar e outra matricial. A fase microfibrilar distingue-se da matricial pelo alto grau de cristalinidade visível ao microscópio electrónico e por possuir uma composição química relativamente homogénea. É composta por estruturas longas e finas designadas microfibrilas, constituídas por moléculas de celulose associadas entre si por pontes de hidrogénio e alinhadas paralelamente ao longo das microfibrilas. Co-existindo com as zonas cristalinas encontram-se nas microfibrilas zonas amorfas em que as fibras de celulose não têm orientação regular. A fase matricial consiste numa variedade de polissacarídeos, glicoproteínas e compostos fenólicos, variando a sua composição com as diferentes camadas da parede, tipos de células e diferentes fases do ciclo celular.

Recentemente, técnicas melhoradas de espectroscopia electrónica têm permitido visualizar uma estrutura ordenada por camadas em que todos os componentes da parede se apresentam como

longas fibras cilíndricas (McCann *et al.*, 1990), pondo-se em causa a existência de verdadeiras zonas amorfas.

Em algumas células especializadas em que ocorreu lenhificação, a parede celular apresenta-se muito mais espessa devido à deposição de celulose, hemiceluloses e lenhina. A lenhificação tem o seu início na região da parede celular primária e estende-se quer para o exterior, em direcção à lamela média, quer para o interior, onde se desenvolve a parede celular secundária. As células com parede celular secundária encontram-se geralmente mortas. Podem ser muito alongadas (fibras) e terem funções de suporte, como as células de esclerênquima, ou serem isodiamétricas (escleritos) e terem funções de protecção, como nas sementes. Os escleritos podem também ocorrer em pequenos grupos de células, como nas pêras, sendo as responsáveis pela textura por vezes "arenosa" que a polpa apresenta (Selvendran e Robertson, 1990).

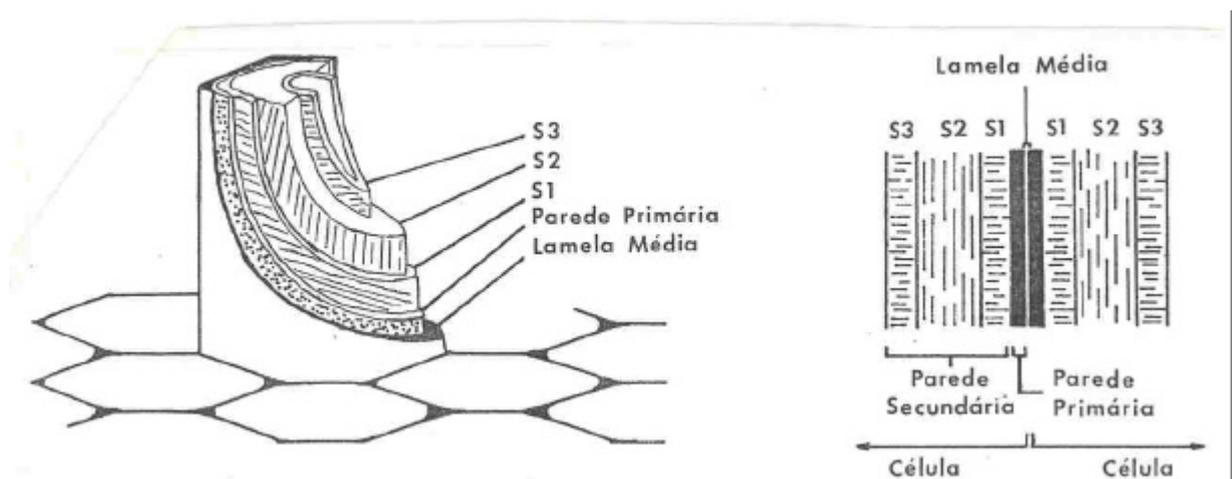


Figura 1.1 - Secção longitudinal de uma parede celular secundária.
 a) Representação tridimensional (Brett e Waldron, 1990);
 b) Representação planar (Selvendran, 1983).

As paredes celulares secundárias contêm tipicamente 3 camadas distintas, S1, S2 e S3 (Figura 1.1), que diferem em espessura, orientação de microfibrilhas e composição. A camada exterior (S1) e a interior (S3) possuem microfibrilhas orientadas aproximadamente de maneira transversal; a camada intermédia (S2) é muito mais grossa que as outras duas e apresenta microfibrilhas orientadas longitudinalmente em relação ao comprimento da célula. Esta orientação proporciona à célula grande resistência à tensão e à compressão (Fengel e Wagener, 1984).

Numa célula com parede celular secundária a camada que compreende a lamela média e a parede celular primária (Figura 1.1) é rica em substâncias pécicas quando comparada com o restante material; S3 e a parte interior de S2 têm um conteúdo em celulose mais elevado enquanto S1 e a camada exterior de S2 são relativamente ricas em hemiceluloses (glucuronoxilanas) (Selvendran, 1983).

A maior ênfase deste capítulo introdutório irá ser dada às paredes celulares das plantas comestíveis com a exceção dos cereais. As paredes celulares dos cereais são muito diferentes das dos restantes tecidos; em geral, e como exemplo, as paredes celulares do endosperma não possuem polissacarídeos pécicos (Selvendran, 1985), não sendo comparáveis às das plantas dicotiledóneas como a azeitona.

1.2 - Composição das Paredes Celulares das Plantas

1.2.1 - Principais Componentes das Paredes Celulares

A composição da parede celular varia consideravelmente com o tipo de tecido, podendo a comparação entre os polissacarídeos de cada grupo ser útil à compreensão das propriedades das paredes celulares. Os polissacarídeos não celulósicos das paredes celulares são geralmente classificados de acordo com os métodos de extracção em substâncias pécicas e hemiceluloses. Esta - classificação torna-se conveniente devido à sua simplicidade, no entanto, é demasiado genérica e pouco selectiva. A classificação que tem sido adoptada é baseada no modo de extracção complementada com base na organização estrutural dos polissacarídeos.

Na Tabela 1.1 apresentam-se os polímeros existentes em vários dos tecidos mais representativos; na Tabela 1.2 são salientadas algumas características estruturais de alguns polissacarídeos que ocorrem nas paredes celulares das plantas.

Tabela 1.1- Polímeros componentes da parede celular de diferentes tipos de tecidos.

	Tipo de Tecido	Principais Constituintes	Referências
Frutos e Legumes	Células em Crescimento e Tecidos Parenquimatosos	Celulose, Substâncias Pécnicas, Hemiceluloses (xiloglucanas) e Glicoproteínas	Stevens e Selvendran, 1984 a,b,c,d; Ryden e Selvendran, 1990 a,b
	Tecidos Lenhificados	Celulose, Lenhina, Hemiceluloses (glucuronoxilanas), pequenas quantidades de Glicoproteínas e Substâncias Pécnicas	Selvendran e King, 1989
Cereais	Endosperma	Hemiceluloses (arabinoxilanas e β -D-glucanas), Celulose, Ésteres Fenólicos e Proteoglicanas	Selvendran, 1983, 1984 Carpita, 1984
	Tecidos Lenhificados	Hemiceluloses (glucuronoarabinoxilanas), Celulose, Lenhina, Ésteres Fenólicos e Proteoglicanas	Ring e Selvendran, 1980; Dupont e Selvendran, 1987
Sementes excepto cereais (ex. leguminosas)	Tecidos Parenquimatosos	Celulose, Hemiceluloses (xiloglucanas), Substâncias Pécnicas e Glicoproteínas	Talbott e Ray, 1992
	Células de endosperma (parede secundária não lenhificada)	Hemiceluloses (galactomananas), Celulose, Substâncias Pécnicas e Glicoproteínas	Selvendran, 1983, 1984 Reid, 1985
	Tecidos Lenhificados	Celulose, Substâncias Pécnicas, Xilanas Ácidas, Xiloglucanas	Aspinall <i>et al.</i> , 1967
Monocotiledóneas suculentas	Tecidos Parenquimatosos	Celulose, Substâncias Pécnicas, Hemiceluloses (xiloglucanas) e Glicoproteínas	Redgwell e Selvendran, 1986; Jarvis <i>et al.</i> , 1988; Waldron e Selvendran, 1990a,b, 1992
	Tecidos Lenhificados	Celulose, Lenhina, Hemiceluloses (xilanas), (glico)proteínas e pequenas quantidades de Pectinas	Waldron e Selvendran, 1990a
Gimnospérmicas	Tecidos Parenquimatosos	Celulose, Substâncias Pécnicas, Hemiceluloses (xiloglucanas, xilanas e arabinogalactanas)	Lorences <i>et al.</i> , 1987; Lorences <i>et al.</i> , 1990
	Tecidos Lenhificados (árvores de madeira mole)	Celulose, Hemiceluloses (galactoglucomananas e arabinoglucuronoxilanas) e Lenhina	Timell, 1964b Fengel e Wegener, 1984
Árvores de madeira dura	Tecidos Lenhificados	Celulose, Lenhina e Hemiceluloses (glucuronoxilanas e pequenas quantidades de glucomanas)	Timell, 1964a Fengel e Wegener, 1984
Tecidos de Cultura em Suspensão	Dicotiledóneas	Substâncias Pécnicas, Hemiceluloses (xiloglucanas e xilanas), Glicoproteínas e Polifenóis	Darvill <i>et al.</i> , 1980a
	Cereais (Monocotiledóneas)	Hemiceluloses (glucuronoarabinoxilanas e β -D-glucanas), Celulose, Substâncias Pécnicas, Fenóis e Proteoglicanas	Thomas <i>et al.</i> , 1989a,b
	Gimnospérmicas	Celulose, Substâncias Pécnicas, Hemiceluloses (xiloglucanas)	Thomas <i>et al.</i> , 1987

Tabela 1.2 - Características glicosídicas dos principais polímeros constituintes das paredes celulares das plantas.

Polímero	Monossacarídeos		Características Estruturais	Referências
	Cadeia Principal	Cadeias Laterais		
<i>1 - Subst. Pécnicas</i>				
Pectinas e Ácidos Pécnicos	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-GalpA $\alpha(1\rightarrow2)$ -L-Rhap	$\alpha(1\rightarrow5)$ -L-Araf $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-Galp	O GalA pode-se encontrar como éster metílico; Ara e Gal podem ocorrer como cadeias laterais; podem apresentar acetilação através do C-4 da Rha;	Aspinall, 1980, 1981 Colquhoun <i>et al.</i> , 1990
RG-I	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-GalpA $\alpha(1\rightarrow2)$ -L-Rhap	$\alpha(1\rightarrow5)$ -L-Araf $\beta(1\rightarrow4)$ -D-Galp	Polímero proveniente das pectinas; o GalA e a Rha encontram-se intercalados em estrutura linear; 50% da Rha é ramificada em C-4.	Darvill <i>et al.</i> , 1980a York <i>et al.</i> , 1985 O'Neill <i>et al.</i> , 1990
RG-II	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-GalpA	L-Rhap (α,β), α -L-Fucp (2-Me), L-Ara (α,β) (<i>f,p</i>), 2-Me- α -D-Xylp, Apif, α -D-Galp, β -D-GlcpA, D-GalpA (α,β), β -L-Acef, D-KDOP, D-DHAp	Polímero proveniente das pectinas; cadeias laterais contendo 2 heptassacarídeos diferentes e vários oligossacarídeos mais pequenos associados directamente à cadeia principal de GalA.	York <i>et al.</i> , 1985 O'Neill <i>et al.</i> , 1990
Arabinanas	$\alpha(1\rightarrow5)$ -L-Araf	α -L-Araf	Polímero constituído só por resíduos de Araf; muito ramificado geralmente em C-3; ocorre como cadeias laterais de pectinas e ácidos pécnicos.	Aspinall, 1980, 1981 Selvendran e O'Neill, 1987
Galactanas	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-Galp	α -D-Galp	Polímero constituído só por resíduos de Galp; ramificado em C-6 por resíduos de Galp terminais.	Aspinall, 1980, 1981
Arabinogalactanas (AG-I)	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-Galp	$\alpha(1\rightarrow5)$ -L-Araf	A cadeia principal encontra-se substituída pontualmente em C-3 da Gal com pequenas cadeias de Araf.	Aspinall e Cottrell, 1971
<i>2 - Hemiceluloses</i>				
Xiloglucanas	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-Glcp	α -D-Xylp, β -D-Galp α -L-Fucp, α -L-Araf β -D-Xylp	Os resíduos de Xyl encontram-se ligados ao C6 de cerca de 50% dos resíduos de Glc; a Xyl pode ser substituída em C2 com Gal e esta, em C2 com Fuc; Ara encontra-se ligada ao C2 da Glc ou C3 da β -Xyl; os resíduos de Galp encontram-se acetilados.	O'Neill e Selvendran, 1987; York <i>et al.</i> , 1988; Hisamatsu <i>et al.</i> , 1992
Glucomananas	$\beta(1\rightarrow4)$ -D-Manp $\beta(1\rightarrow4)$ -D-Glcp	α -D-Galp	A Gal, se presente, ocorre ligada ao C-6 da Man ou Glc. A razão Man/Glc é geralmente 3:1.	Sjöstrom, 1981
Mananas	$\beta(1\rightarrow4)$ -D-Manp	α -D-Galp	Polímero linear; pode ocorrer Gal no C6 da Man.	Aspinall, 1980, 1981
Glucuronoxilanas	$\beta(1\rightarrow4)$ -D-Xylp	α -D-GlcpA (4-Me), α -L-Araf	Os resíduos de GlcpA são o principal substituinte da C2 da Xyl em tec. lenh. de dicotiledóneas; Araf em C2 e C3 substituem as xilanas em gimnospéricas e em monocotiledóneas.	Aspinall, 1980, 1981 Darvill <i>et al.</i> , 1980a Bacic <i>et al.</i> , 1988 Sjöstrom, 1981
β -D-Glucanas	$\beta(1\rightarrow4)$ -D-Glcp $\beta(1\rightarrow3)$ -D-Glcp		Razão (1 \rightarrow 4)/(1 \rightarrow 3) entre 2:1 e 3:1; polímero muito abundante em cereais.	Fry, 1988
Calose	$\beta(1\rightarrow3)$ -D-Glcp		Polímero linear; ocorre em poros celulares.	Brett e Waldron, 1990
<i>3 - Celulose</i>				
	$\beta(1\rightarrow4)$ -D-Glcp		Polímero linear com d.p entre 500 e 14.000.	Fengel e Wegener, 1984
<i>4 - Glicoproteínas</i>				
Glicoprot.ricas arabinogalact.	(1 \rightarrow 3)-D-Galp	(1 \rightarrow 6)-D-Galp L-Araf	A arabinogalactana surge como cadeia lateral da glicoproteína e tem estrutura igual à da AG-II.	Fincher <i>et al.</i> , 1983
Glicoprot.estrutricas em Hyp	$\beta(1\rightarrow2)$ -L-Araf		Tri ou tetra-arabinosídeos ligados à Hyp como cadeias laterais. α -D-Galp em ligação à Ser.	Lampert e Catt, 1981

Nos tecidos parenquimatosos dos frutos e legumes, os polímeros mais abundantes são a celulose e as substâncias pécnicas; também são encontradas hemiceluloses, geralmente xiloglucanas e glicoproteínas.

Em geral, sementes de leguminosas e os tecidos parenquimatosos das monocotiledóneas suculentas, das Gimnospérmicas e dos tecidos de cultura em suspensão de dicotiledóneas e Gimnospérmicas possuem uma composição em polissacarídeos muito semelhante à descrita para os tecidos parenquimatosos de frutos e legumes.

Os tecidos lenhificados dos frutos e legumes possuem composição semelhante aos das árvores de madeira dura, em que os principais constituintes da parede celular são celulose, lenhina e glucuronoxilanas; nos tecidos lenhificados dos cereais as glucuronoarabinoxilanas são o polissacarídeo hemicelulósico mais abundante e nas árvores de madeira mole (Gimnospérmicas) predominam as galactoglucomanas.

1.2.2 - Substâncias Pécnicas

As substâncias pécnicas são os polissacarídeos extractáveis com agentes quelantes, água quente ou ácidos diluídos mais os polissacarídeos que apesar de não serem extractáveis com estes agentes são quimicamente semelhantes aos primeiros, ou seja, polissacarídeos ricos em ácido galacturónico, os polissacarídeos componentes das suas cadeias laterais e polissacarídeos quimicamente semelhantes. São substâncias pécnicas os polímeros em que o ácido galacturónico se encontra metil-esterificado (pectinas), os polímeros em que este se encontra desesterificado (ácidos pécnicos) e os polissacarídeos neutros que apesar de não possuírem uma cadeia de ácido galacturónico se encontram geralmente em associação com as pectinas (arabinanas, galactanas e arabinogalactanas).

As pectinas são compostas por cadeias lineares de ácido D-galacturónico em ligação α -(1 \rightarrow 4), interrompidas pontualmente por resíduos de L-ramnose em ligação α -(1 \rightarrow 2); grande parte dos resíduos de ácido galacturónico encontram-se esterificados com metanol (Tabela 1.2). As cadeias laterais são compostas principalmente por arabinose e galactose; zonas muito e pouco ramificadas coexistem na mesma molécula (deVries *et al.*, 1982, 1983). Os principais pontos de ramificação são as posições C-4 dos resíduos de ramnose, havendo também cadeias laterais ligadas directamente ao C-2 ou C-3 de resíduos de ácido galacturónico (Aspinall, 1981; Stevenson *et al.*, 1988b).

As pectinas da lamela média encontram-se associadas por pontes de Ca^{2+} sendo solubilizadas por extracção com agentes quelantes como o CDTA (Jarvis *et al.*, 1981, Jarvis, 1982). Na

Figura 1.2 encontram-se representadas algumas das características estruturais das pectinas provenientes da lamela média e da parede celular primária, podendo-se observar que as pectinas provenientes da lamela média são menos ramificadas e possuem cadeias laterais mais curtas do que as da parede celular primária.

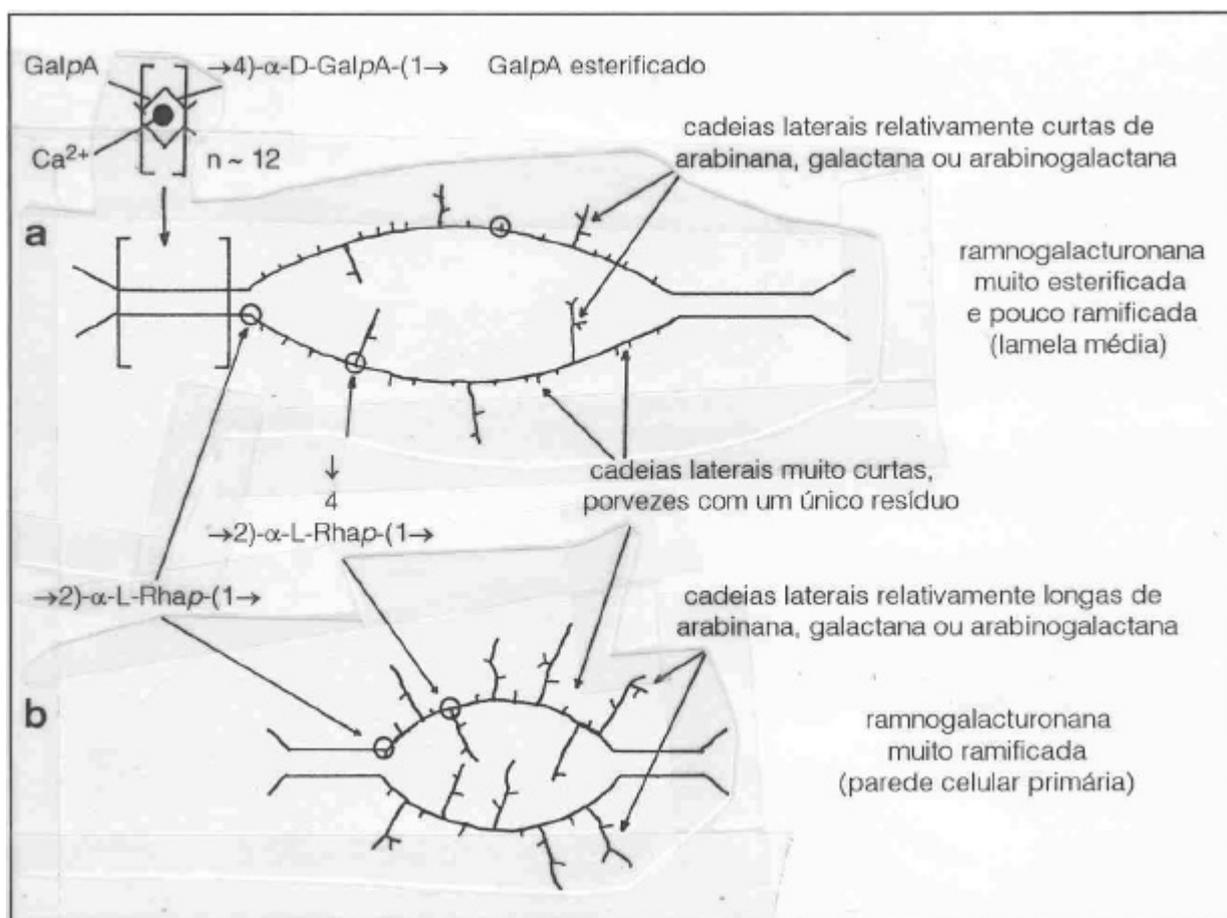


Figura 1.2 - Representação diagramática de algumas características estruturais das pectinas provenientes da lamela média (a) e da parede celular primária (b) (Selvendran, 1985).

Por acção da *endo*-poligalacturonase (*endo*-PG), enzima que hidrolisa ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturónico não esterificados, três tipos de polissacarídeos pécticos têm sido obtidos a partir de células de sicómoro de cultura em suspensão: homogalacturonanas, ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) (Tabela 1.2). Estes polissacarídeos têm sido analisados detalhadamente permitindo a detecção de algumas características singulares.

As homogalacturonanas são polissacarídeos constituídos por resíduos de D-GalpA em ligação α -(1 \rightarrow 4), em geral parcialmente esterificados com metanol, razão pela qual são resistentes à acção da endo-PG (McNeil *et al.*, 1980); por desesterificação e retratamento da homogalacturonana com endo-PG resulta na formação de mono, di e trissacarídeos (York *et al.*, 1985). Resíduos de ramnose podem ser encontrados ocasionalmente na homogalacturonana (Fry, 1988).

As RG-I são polissacarídeos constituídos por unidades repetitivas do dissacarídeo [1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]_n. Aproximadamente 50% dos resíduos de Rha, em C-4, são pontos de ramificação de curtas cadeias laterais ricas em arabinose e/ou galactose (Figura 1.3) distribuídas de maneira não regular (McNeil *et al.*, 1980). Este polímero tem sido isolado e caracterizado em células de sicómoro de cultura em suspensão e recentemente também em kiwi (Dawson e Melton, 1991) e em células de cultura em suspensão de cereais como o milho e o arroz (Thomas *et al.*, 1989a, b).

Ara-Ara-	Gal-Gal-
Ara-Ara-Ara-	Gal-Gal-Gal-Gal-
Ara-Ara-Ara-Ara-	β -D-Gal-Rha-
Ara-Ara-Ara-Ara-Ara-	Gal-Gal-Rha-
	Gal-Gal-Gal-Rha-
Ara-Rha-	Gal-Gal-Gal-Gal-Rha-
Ara-Ara-Rha-	
Ara-(1 \rightarrow 3)-Gal-Rha-	Desoxi-hexose-Ara-Rha-
Ara-Ara-(1 \rightarrow 3)-Gal-Rha-	
Ara-Ara-Ara-(1 \rightarrow 3)-Gal-Rha-	

Figura 1.3 - Cadeias laterais da RG-I comuns ao sicómoro (dicotiledónea) e ao milho (monocotiledónea) em células de cultura em suspensão (Thomas *et al.*, 1989b).

As RG-II possuem uma estrutura invulgar, sendo constituídas por 12 açúcares diferentes, alguns deles não usuais (Tabela 1.2) que ocorrem como cadeias laterais de (ramno)galacturonanas com ligação directas ao C-2 ou C-3 de resíduos de ácido galacturónico (Figura 1.4).

Enquanto que as RG-I parecem conter cadeias laterais através de ramificações pelos resíduos de ramnose, as RG-II, ao contrário, encontram-se ramificadas pelos resíduos de ácido galacturónico. A RG-II constitui 3 a 4% da massa seca das paredes celulares primárias de células de sicómoro de cultura em suspensão. Este polímero foi também isolado de células de cultura em suspensão de

cereais como o arroz (Thomas *et al.*, 1989a) e de gimnospérmicas (Thomas *et al.*, 1987), da polpa de kiwi (Redgwell *et al.*, 1988) e também em vinho tinto (Doco e Brillouet, 1992).

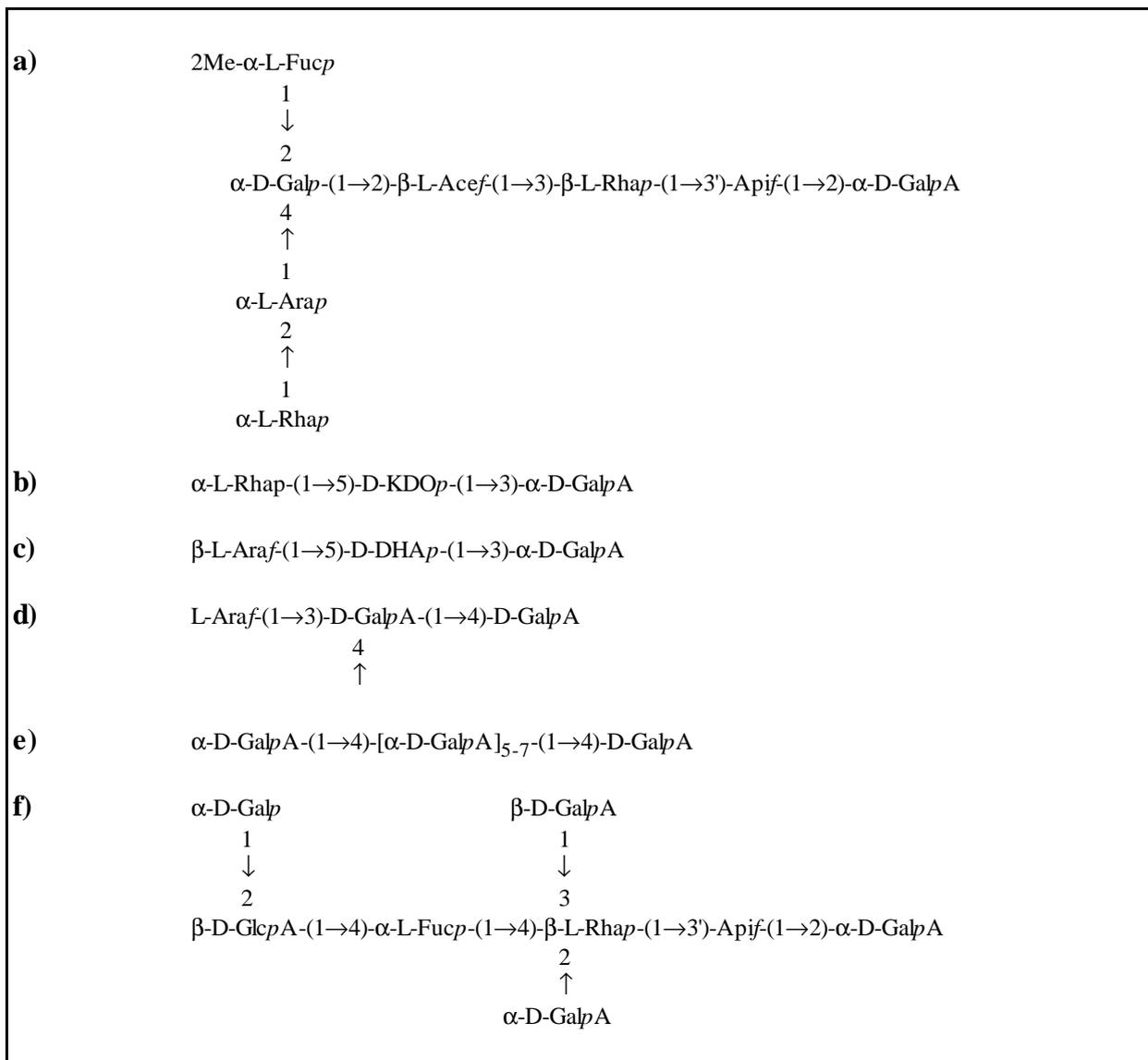


Figura 1.4 - Estruturas dos oligossacarídeos pertencentes a cadeias laterais da RG-II, libertados por hidrólise ácida parcial (Stevenson *et al.*, 1988b, O'Neill *et al.*, 1990).

A complexidade da RG-II e a ubiquidade das ramnagalacturonanas nas paredes celulares das plantas permite supor que possam desempenhar funções fundamentais para a organização celular (O'Neill *et al.*, 1990).

Arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (Tabela 1.2) têm sido isoladas das paredes celulares de plantas comestíveis. O seu grau de polimerização sugere ser baixo, parecendo ocorrer como cadeias laterais das pectinas. A extracção de arabinanas (Rees e Richardson, 1966; Joseleau *et*

al., 1977), galactanas (Wood e Siddiqui, 1972) e arabinogalactanas (Aspinall e Cottrell, 1971) com métodos não degradativos evidencia a existência destes polissacarídeos também como entidades - individualizadas. Galactanas ou polissacarídeos ricos em galactose podem também ocorrer como principais polímeros de reserva de sementes como o tremoço (Crawshaw e Reid, 1984; Northcote, 1985).

1.2.3 - Hemiceluloses

As hemiceluloses são os polissacarídeos extraídos com soluções alcalinas de bases fortes como KOH ou NaOH mas não com agentes quelantes; geralmente têm capacidade de se ligar por pontes de hidrogénio à celulose.

As xiloglucanas são polissacarídeos cuja cadeia principal é constituída por unidades de (1→4)- β -D-Glcp, tal como a celulose. Grande parte dos resíduos de glucose encontram-se ramificados em C-6 por resíduos de α -D-Xylp, encontrando-se alguns destes resíduos de xilose substituídos em C-2 com um resíduo de β -D-Galp ou com α -L-Fucp-(1→2)- β -D-Galp (Tabela 1.2 e Figura 1.5). Nas plantas dicotiledóneas as xiloglucanas parecem ser constituídas principalmente por unidades de nonassacarídeos (XG9) e heptassacarídeos (XG7) resistentes à acção da enzima *endo*- β -(1→4)-glucanase (Hayashi, 1989). Em menor quantidade ocorrem também penta, deca e undecassacarídeos (Hisamatsu *et al.*, 1991).

Estudos detalhados das xiloglucanas secretadas pelas células de sicómoro de cultura em suspensão que incluíram técnicas de FAB-MS e RMN de ^1H permitiram verificar que, com alguma frequência, o resíduo de (1→2)- β -D-Galp se encontra substituído com grupos acetilo, predominantemente em O-6 mas também em O-4 e O-3 (York *et al.*, 1988). Por tratamento destas xiloglucanas com *endo*- β -(1→4)-D-glucanase, a estrutura até 20 resíduos glicosídicos foi determinada (Figura 1.5), tendo sido identificados como cadeias laterais novos componentes estruturais nas xiloglucanas como α -L-Araf (Kiefer *et al.*, 1990), α -L-Araf-(1→3)- β -D-Xylp e β -D-Xylp e (Hisamatsu *et al.*, 1992).

A metilação de fracções ricas em xiloglucanas de diferentes origens mostra a ocorrência de pequenas percentagens de resíduos de (1→4)-Xylp (Karácsonyi e Kovacik, 1989; Ryden e

Selvendran, 1990a). É possível que estes resíduos sejam parte integrante das xiloglucanas de alguns tipos de tecidos; no entanto, não será de excluir a possibilidade de poderem ser reminiscências de associações entre xiloglucanas e xilanas. Este aspecto foi estudado com algum detalhe neste trabalho.

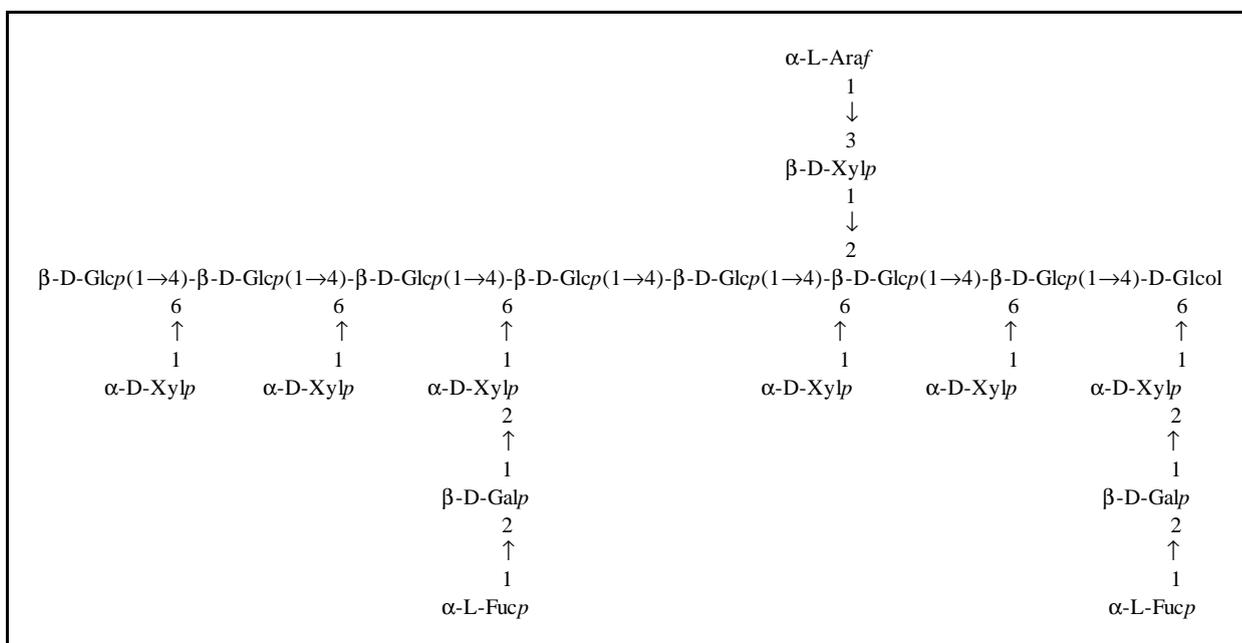


Figura 1.5 - Estrutura do oligossacarídeo constituído por 20 resíduos glicosídicos obtido a partir das xiloglucanas das células de sicómoro de cultura em suspensão por tratamento com *endo*-β-(1→4)-D-glucanase (Hisamatsu *et al.*, 1992).

As xiloglucanas encontram-se associadas à celulose por pontes de hidrogénio (Hayashi e Maclachlan, 1984; Hayashi *et al.*, 1987), desempenhando funções estruturais de união de microfibrilhas de celulose adjacentes (Fry, 1989a; Hayashi, 1989).

Para além da função estrutural, alguns polissacarídeos hemicelulósicos como as mananas e galactomananas em sementes de plantas leguminosas e tubérculos (Aspinall *et al.*, 1953, 1958; Keusch, 1968) ou mesmo as xiloglucanas em sementes de tamarindo (Meier e Reid, 1982; Reid, 1985) possuem funções de polissacarídeos de reserva.

Pequenas quantidades de xilanas acídicas conjuntamente com polissacarídeos pécticos foram detectados nos tecidos parenquimatosos da vagem do feijão (O'Neill e Selvendran, 1985) e também em tecidos de espargo que iniciavam o processo de lenhificação (Waldron e Selvendran, 1992). Glucuronoxilanas foram também detectadas nas paredes celulares de tecidos cambiais de floema e

xilema em três espécies de árvores (Selvendran, 1985); nas paredes celulares de células de sicômoro de cultura em suspensão encontram-se presentes arabinoglucuronoxilanas (Darvill *et al.*, 1980b).

1.2.4 - Celulose

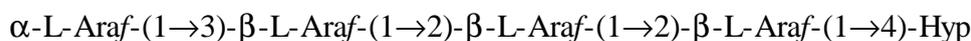
A celulose constitui 20 a 30% das paredes celulares primárias (McNeil *et al.*, 1984) e 40% das paredes celulares secundárias, sendo o composto orgânico mais abundante no mundo (Fry, 1988). A maior parte do trabalho de estudo da celulose foi efectuado em tecidos lenhificados.

É um polímero linear de (1→4)- β -D-Glcp. Este tipo de ligação permite a adopção de uma conformação linear em que vários polímeros se agregam fortemente por pontes de hidrogénio formando microfibrilhas. A função biológica da celulose pensa-se ser unicamente de suporte proporcionando forma e resistência à parede celular (Fry, 1988). O grau de polimerização da celulose nas paredes celulares secundárias é de 14 000 resíduos; nas paredes celulares primárias a celulose aparenta possuir uma distribuição bifásica do grau de polimerização com uma população de polímeros com cerca de 500 resíduos de glucose e outra que varia entre os 2 500 e os 4 500. A celulose das paredes celulares primárias possui um menor grau de cristalização do que a das secundárias, possuindo muito maior abundância de celulose em estado amorfo e microfibrilhas mais finas (McNeil *et al.*, 1984).

1.2.5 - Proteínas e Glicoproteínas

As paredes celulares contêm uma gama de proteínas, a maioria das quais glicosiladas, que desempenham funções estruturais, de reconhecimento e catalíticas. Ao contrário das proteínas citoplasmáticas, muitas destas proteínas que desempenham funções estruturais são ricas em hidroxiprolina (Hyp) que ocorre como parte de uma sequência de Ser-(Hyp)₄ (Esquerré-Tugayé e Lamport, 1979; Lamport e Catt, 1981) em que os resíduos de Hyp são os locais de ligação de oligossacarídeos contendo 1 a 4 resíduos de arabinose (Akiyama e Kato, 1977). Nas dicotiledóneas, os resíduos de arabinose são geralmente 3 ou 4 sendo fáceis de distinguir da arabinose proveniente das substâncias

pécticas por possuírem resíduos de Araf em ligação (1→2) e (1→3) e a configuração anomérica ser β com exceção do tetra-arabinosídeo (Akiyama *et al.*, 1980):



As glicoproteínas ricas em Hyp constituem cerca de 10% dos tecidos de cultura em suspensão; nos tecidos moles a sua percentagem é de cerca de 5% do material da parede celular (Ryden e Selvendran, 1990a).

Um grupo de proteínas em que a Hyp também é abundante são as "proteínas ricas em arabinogalactanas", a maioria das quais ocorre nos espaços intercelulares; uma pequena quantidade poderá entrar na composição da parede celular (Fincher *et al.*, 1983). A localização destas moléculas na célula tem sido dificultada pela alta solubilidade que apresentam. Contêm normalmente 2 a 10% de proteína; resíduos de galactose em ligação (1→3) constituem a cadeia principal havendo ramificações com pequenas cadeias de galactose em ligação (1→6); a arabinose ocorre como resíduos terminais (Fincher *et al.*, 1983).

1.2.6 - Compostos Fenólicos

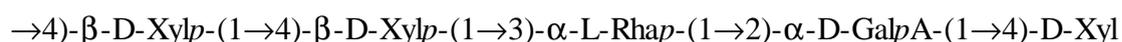
Os tecidos imaturos contêm pouca ou nenhuma lenhina, existindo no entanto quantidades vestigiais de compostos fenólicos como os ácidos p-cumárico, ferúlico e p-hidroxibenzóico que podem desempenhar funções de cross-linking entre os polissacarídeos (Fry, 1986). Alguns dos polissacarídeos pécticos da parede celular de um grupo limitado de famílias como as *Chenopodiaceae* onde se incluem os espinafres e a beterraba encontram-se esterificados com compostos fenólicos, geralmente ácido ferúlico (Fry, 1987, O'Neill *et al.*, 1990).

1.2.7 - Polímeros da Parede Celular de Tecidos Lenhificados

a) Glucuronoxilanas

As glucuronoxilanas são o polímero hemicelulósico mais abundante, constituindo 15 a 30% da parede celular das árvores de madeira dura (Sjöstrom, 1981); nestes tecidos são também encontradas pequenas quantidades de glucomananas (Timell, 1964a).

As glucuronoxilanas são constituídas por unidades de (1→4)-β-D-Xylp ramificadas em C-2 por resíduos terminais de α-D-GlcA. Em paredes celulares secundárias de angiospérmicas dicotiledóneas como as das árvores de madeira dura em que se incluem a bétula, o eucalipto e a oliveira, as xilanas ocorrem na forma de *O*-acetil-4-*O*-metilglucurono-β-D-xilanas na proporção de 1 resíduo de MeGlcA para 10 resíduos de xilose. Os grupos acetilo estão igualmente distribuídos pelos C-2 e C-3 da xilose na proporção de um acetilo por cada dois resíduos de xilose (Fengel e Wegener, 1984). Com base na degradação alcalina de glucuronoxilanas de bétula (Johansson e Samuelson, 1977; Andersson *et al.*, 1983) foi proposta a seguinte sequência como terminal redutor deste polissacarídeo:



A ligação (1→2) entre a ramnose e o ácido galacturónico poderá ser a origem da retardação da degradação destes polímeros durante o tratamento alcalino a que são submetidos durante a fabricação de papel. A regularidade da distribuição ou a existência de blocos de resíduos de ácido glucurónico como cadeias laterais das xilanas é ainda uma questão em aberto. É provável que no mesmo tecido existam polímeros com diferentes graus de substituição, tal como verificado em cascas de girassol (Bazus *et al.*, 1992).

b) Lenhina

A lenhina não pode ser isolada sem que a sua estrutura seja alterada, sendo esta a principal causa que impede a elucidação da sua estrutura (Hwang *et al.*, 1989). A lenhina possui uma estrutura muito complexa (Freudenberg, 1968), sendo formada a partir de 3 álcoois fenilpropanóides (p-cumarilo, coniferilo e sinapilo). O mecanismo de polimerização da lenhina, apesar de se saber não ser totalmente ao acaso (Lewis *et al.*, 1987), é ainda desconhecido, possivelmente via radicais livres em presença de peróxido de hidrogénio/peroxidase (Hwang *et al.*, 1991). A lenhina das plantas Gimnospérmicas e Angiospérmicas dicotiledóneas e monocotiledóneas é composta por diferentes combinações dos 3 precursores. Nas plantas dicotiledóneas, em que se inclui a oliveira, a lenhina é composta principalmente pelos álcoois p-cumarilo e sinapilo (Goodwin e Mercer, 1983).

A existência de ligações covalentes lenhina-polissacarídeos em tecidos lenhificados tem sido considerada desde há alguns anos (Lai e Sarkanen, 1971). A evidência deste tipo de ligações tem sido obtida a partir de tecidos de plantas Gimnospérmicas (Azuma *et al.*, 1981; Das *et al.*, 1981; Minor, 1982 e 1986; Watanabe e Koshijima, 1988; Watanabe *et al.*, 1989) e monocotiledóneas (Scalbert *et al.*, 1985, Lam *et al.*, 1990, Iiyama *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1992). As ligações lenhina-polissacarídeos parecem ocorrer segundo dois tipos: éter ou ésteres benzílicos, tal como é mostrado na Figura 1.6 (Azuma, 1989).

Após exaustiva deslenhificação dos tecidos lenhificados do caroço da azeitona foi possível o isolamento de complexos lenhina-polissacarídeos.

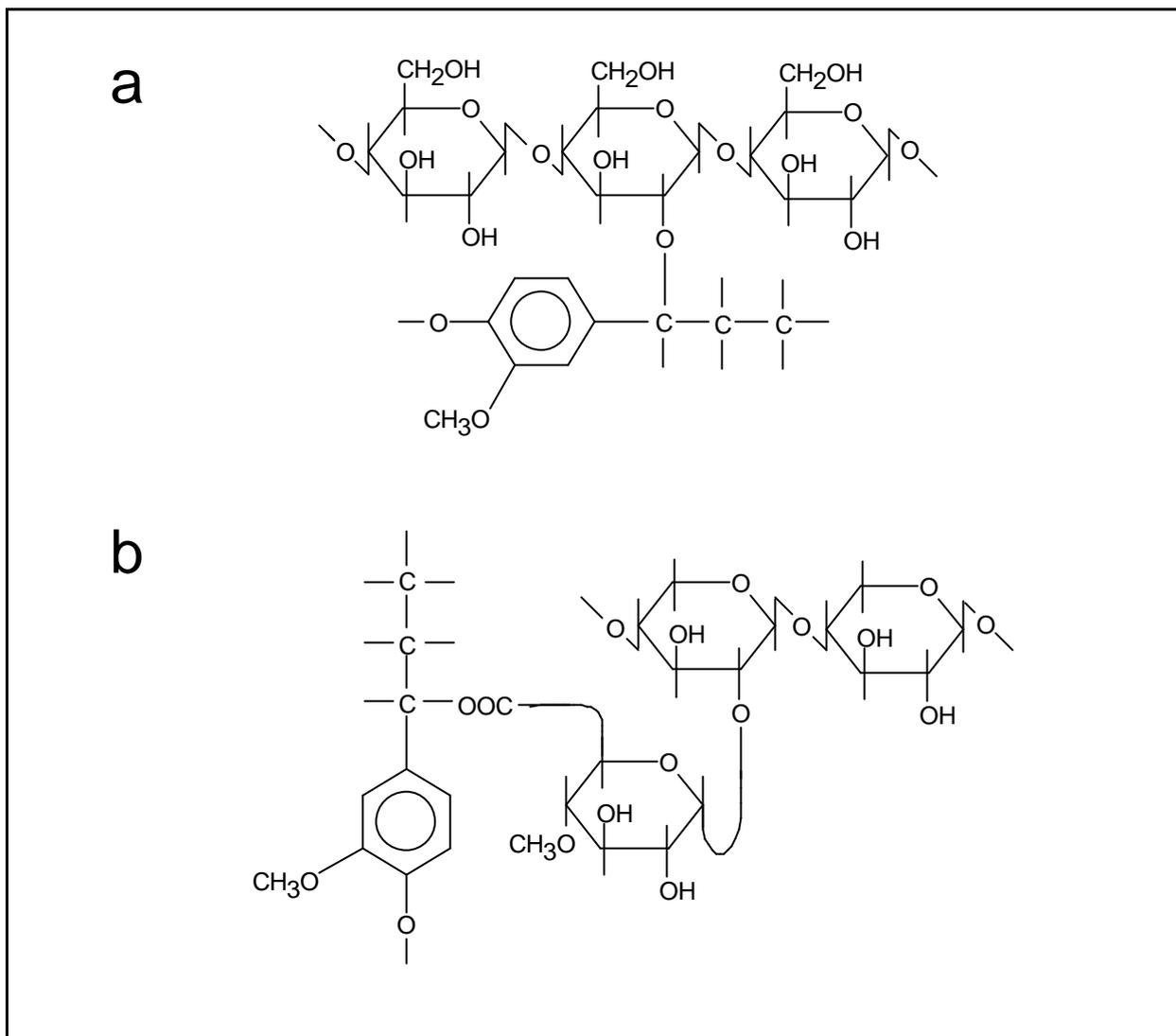


Figura 1.6 - Tipos de ligações propostos entre a lenhina e os polissacarídeos (Azuma, 1989).

a) Ligação éter benzílica; b) Ligação éster benzílica.

1.3 - Metodologia Aplicada ao Estudo das Paredes Celulares

1.3.1- Preparação do Material das Paredes Celulares

Para se proceder aos estudos detalhados dos polímeros constituintes das paredes celulares, estas têm que ser isoladas e purificadas de material intra-celular ao mesmo tempo que se minimiza a actividade de enzimas que degradam as paredes celulares como pectina-metilesterases e poligalacturonases. Os métodos que têm sido propostos procuram evitar a degradação e alteração

estrutural dos polímeros enquanto estes são libertados de compostos estranhos às paredes. O procedimento experimental necessário para a obtenção de preparações de paredes celulares puras é muito dependente do tipo de órgão da planta ou tecido.

A maioria dos polissacarídeos das paredes celulares tende a precipitar em soluções quentes de etanol (80 a 95%). O material assim obtido designa-se "Resíduo Insolúvel em Álcool" (AIR) e é muito eficiente na inativação de enzimas sem haver degradação de polímeros. Durante muitos anos, o resíduo insolúvel em álcool (Jermyn e Isherwood, 1956) ou em álcool-benzeno (Thornber e Northcote, 1962) foi utilizado como material de partida para o fraccionamento dos polissacarídeos - constituintes das paredes celulares das plantas.

Esta técnica, no entanto, permite que, juntamente com os polímeros constituintes das paredes celulares, ocorra co-precipitação de proteínas intra-celulares (Newcomb, 1963), a interacção de polifenóis e dos seus produtos de condensação com as proteínas e a subsequente insolubilização destes complexos (Loomis e Battaile, 1966), e a co-precipitação de ácidos nucleicos e amido (Selvendran e O'Neill, 1987). Estes efeitos de co-precipitação alteram a extractabilidade do material das paredes celulares, impedem a análise das proteínas e glicoproteínas associadas às paredes celulares (Selvendran *et al.*, 1975; Selvendran, 1975a,b) e interferem também com a análise por metilação da natureza das ligações glicosídicas (Stevens e Selvendran, 1980a). Os efeitos da desidratação provocados pelo álcool poderão também ocasionar novas interacções entre os polímeros presentes.

Em tecidos relativamente pobres em proteínas intra-celulares, polifenóis e amido, tal como alguns frutos (tomate), legumes (folhas de couve imaturas) e tecidos lenhificados, a preparação de um AIR pode ser um método praticável para obtenção do material das paredes celulares. Para os restantes produtos, novos passos de purificação têm sido introduzidos, como a remoção do AIR de proteínas exógenas com pronase (Stevens e Selvendran, 1980a) ou a extracção com soluções de fenol-ácido acético-água (2:1:1, w/v/v) (PAW) (Selvendran, 1975a), e a remoção do amido com α -amilase (Selvendran e Dupont, 1980) ou dimetilsulfóxido a 90% (v/v) após maceração do material em moínho de bolas com etanol a 80% (Selvendran e Ryden, 1990). Estas modificações removem, contudo, quantidades significativas de polímeros das paredes celulares como as substâncias pécticas ricas em ácido urónico.

Um método de preparação de material das paredes celulares de tecidos parenquimatosos de frutos e legumes, ricos em material intra-celular, foi desenvolvido no Food Research Institute de Norwich, em Inglaterra (Selvendran e O'Neill, 1987). Este método envolve a utilização de dodecilsulfato de sódio (SDS) 1,5 e 0,5%, PAW e DMSO a 90%, evitando os efeitos de co-precipitação provocados pelo álcool. O resíduo final foi designado "Material da Parede Celular" (CWM).

Uma das limitações do método é as soluções de SDS não inibirem nem removerem totalmente as enzimas da parede celular pelo que pode ocorrer autólise da parede se não forem tomadas as precauções necessárias. Parte deste problema é resolvido com a extracção com PAW, que inactiva e solubiliza estas enzimas ligadas à parede celular (Selvendran e Ryden, 1990).

1.3.2- Extracção e Isolamento dos Componentes das Paredes Celulares

Os polímeros constituintes das paredes celulares podem ser extraídos a partir do CWM por diferentes processos, incluindo o uso de enzimas, agentes quelantes, soluções alcalinas, solventes orgânicos ou combinações destes. Os métodos de purificação de polissacarídeos baseiam-se na exploração de propriedades específicas de cada polímero ou de grupos de polímeros, sendo utilizadas várias etapas de purificação.

a) Solubilização de Substâncias Pécnicas

O isolamento dos polímeros das paredes celulares de células parenquimatosas tem sido feito de forma sequencial começando selectivamente pela extracção das substâncias pécnicas. A extracção de pectinas por ebulição em soluções ácidas diluídas de materiais ricos nestes polímeros como as cascas de citrinos é utilizada desde meados do século passado (McCready, 1965) sendo ainda hoje o procedimento mais comum a nível industrial (May, 1990). A simples imersão de pedaços de polpa de maçã em água a ferver durante 30 a 40 minutos produz um pH de 2,8-3,0, suficiente para que as pectinas possam ser parcialmente degradadas e solubilizadas em água (Barrett e Northcote, 1965).

A nível laboratorial de pequena escala, vários métodos têm sido utilizados para a solubilização destes polissacarídeos, sendo constante em todos eles o uso de agentes quelantes. Oxalato de amónio a pH 4 e 70°C (Talbot e Ray, 1992), à temperatura ambiente (Rombouts e Thibault, 1986) ou juntamente com EDTA em tampão acetato pH 5,2 a 70°C (deVries *et al.*, 1981) e CDTA à temperatura ambiente (Redgwell e Selvendran, 1986) são alguns dos procedimentos de extracção com agentes quelantes. O CDTA possui o mérito de ser muito eficiente na remoção do Ca^{2+} sem necessitar de aquecimento, evitando-se a exposição dos polímeros a temperaturas mais elevadas durante a extracção.

A degradação dos polissacarídeos pécnicos depende do pH a que ocorre o aquecimento e da temperatura atingida (Van Buren, 1979; Talbot e Ray, 1992) e do tempo de exposição (Plat *et al.*, 1988). A pHs ácidos (3 a 5) ocorre hidrólise da cadeia principal do polissacarídeo uma vez que as ligações entre os resíduos de ácido galacturónico são mais lábeis nesta gama de pH do que as dos açúcares neutros componentes das cadeias laterais (Talbot e Ray, 1992); a pH 1, no entanto, a labilidade dos açúcares neutros é maior (Fry, 1988). A pHs neutros (6 a 8), o aquecimento provoca a degradação por eliminação em vez de hidrólise do ácido galacturónico da cadeia principal das substâncias pécnicas. Esta degradação é tanto mais extensa quanto mais metil-esterificado estiver o polímero (Barrett e Northcote, 1965). Este efeito é o mesmo que se verifica na cozedura prolongada (30 min) de legumes onde a remoção do Ca^{2+} da região da lamela média e a degradação de pectinas por β -eliminação (Figura 1.7) leva à separação das células e ao amolecimento dos tecidos (Waldron e Selvendran, 1990c). Uma breve cozedura (4 min) afecta principalmente os açúcares neutros das cadeias muito ramificadas das substâncias pécnicas (Plat *et al.*, 1988).

Outros métodos degradativos como o uso de enzimas (Talmadge *et al.*, 1973; Dawson e Melton, 1991) ou combinação de tratamentos enzimáticos e químicos (Renard *et al.*, 1991a; Ishii *et al.*, 1989) têm sido utilizados para a extracção de substâncias pécnicas.

Qualquer que seja o método, químico ou enzimático, não extrai a totalidade das substâncias pécnicas presentes, sendo também encontradas pectinas após extracção com CDTA e Na_2CO_3 , em extractos de reagentes caotrópicos como tiocianato de guanidínio (Redgwell *et al.*, 1988), em fracções de hemiceluloses e no resíduo rico em celulose (α -celulose) (Ryden e Selvendran, 1990). A

ocorrência de substâncias pécnicas no resíduo rico em celulose será um dos pontos a abordar no decorrer do trabalho.

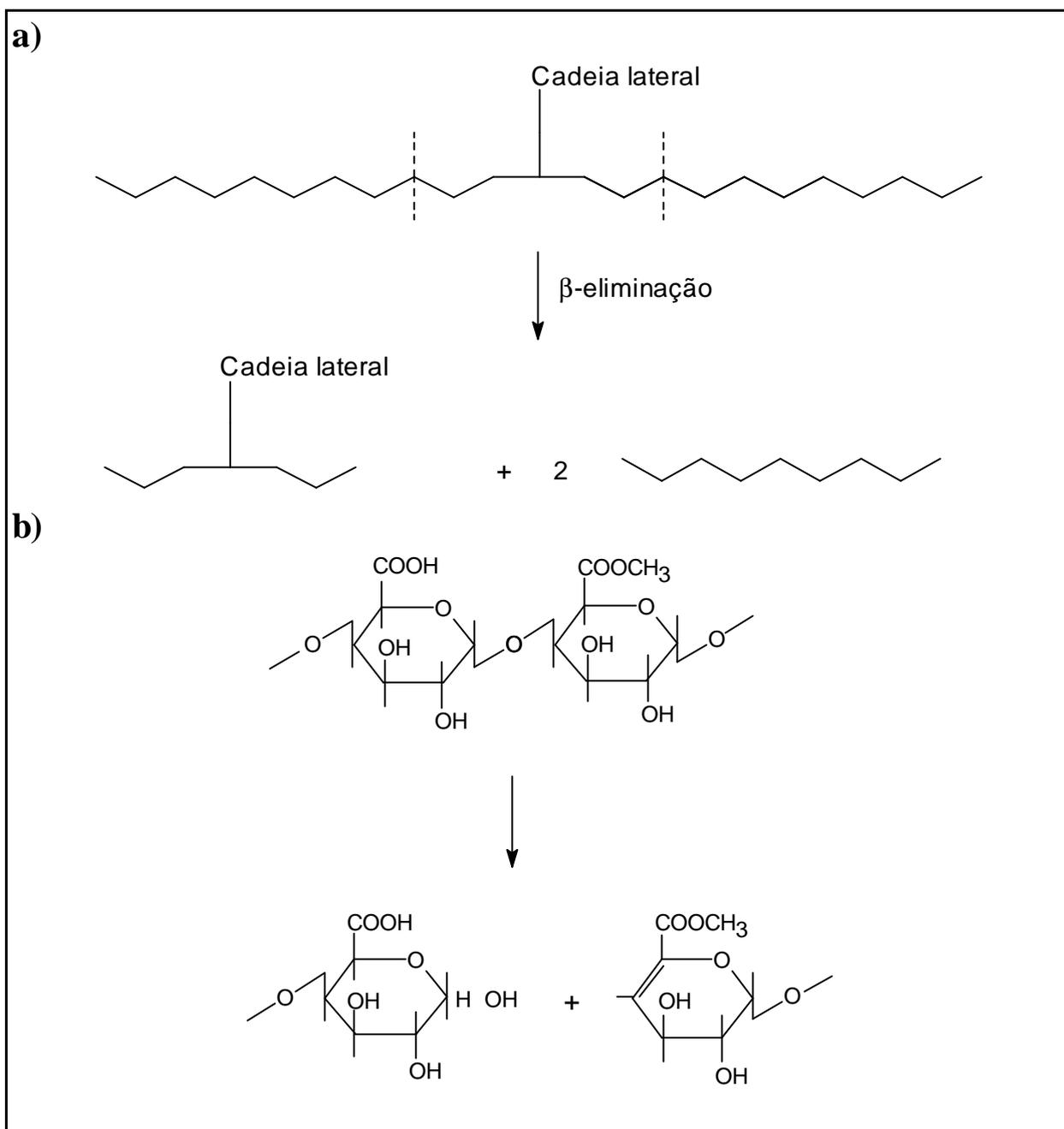


Figura 1.7 - Degradação de pectinas por β -eliminação.

a) Reacção de despolimerização; b) Quebra da ligação química.

b) Purificação de Substâncias Pécnicas

As substâncias pécnicas têm sido purificadas por cromatografia de troca aniónica, onde o DEAE-Trisacryl M em tampão fosfato, pH 6,5 parece oferecer os melhores resultados em termos de recuperação do material (Redgwell e Selvendran, 1986). O fraccionamento de pectinas por precipitação com soluções de sulfato de amónio (70%) (Barrett e Northcote, 1965) ou de acetato de cobre a 7% (Aspinall *et al.*, 1968) foram técnicas utilizadas no passado na purificação de pectinas. Neste trabalho irão ser experimentadas técnicas de purificação de pectinas por precipitação com soluções de concentração crescente de etanol seguida de cromatografia de troca aniónica.

c) Solubilização de Hemiceluloses

A maioria dos polímeros hemicelulósicos é extraída com soluções alcalinas a partir do material despectinado. Em tecidos lenhificados, um tratamento prévio com clorito/ácido acético facilita a solubilização das hemiceluloses (Jermyn e Isherwood, 1956). Este tratamento foi adaptado a um vasto número de tecidos parenquimatosos de plantas (Selvendran, 1975a; Selvendran *et al.*, 1985). As soluções alcalinas são geralmente de KOH entre 0,5 e 4M (2 e 16%), contêm NaBH₄ e são desprovidas de O₂ para evitar reacções de degradação. A neutralização dos extractos de hemiceluloses leva à precipitação de parte do material (hemicelulose A) deixando em solução uma mistura de polissacarídeos (hemicelulose B).

Outros solventes como os agentes caotrópicos tiocianato de guanidínio (Stevens e Selvendran, 1984d) e N-óxido de 4-metilmorfolino (MMNO) (Düsterhöft *et al.*, 1991), que extraem polímeros por rompimento de ligações por pontes de hidrogénio, e DMSO (Bouveng e Lindberg, 1965), que é um bom solvente de xilanas sem lhes alterar o grau de acetilação, também têm sido utilizados para extracção de compostos hemicelulósicos.

d) Purificação de Hemiceluloses

As hemiceluloses têm sido facilmente fracionadas por precipitação com concentrações crescentes de etanol (Whistler e Sannella, 1965). Outro método de fracionamento é a precipitação ou reprecipitação em soluções de Cu (II) (Jones e Stoodley, 1965), tendo sido, nomeadamente, utilizado na purificação de xiloglucanas da batata (Ring e Selvendran, 1981) e glucuronoxilanas da azeitona (Gil Serrano *et al.*, 1986).

A cromatografia em coluna com resinas de troca aniónica como o DEAE-Trisacryl (Redgwell e Selvendran, 1986) ou DEAE-Sephacel (Ruperez *et al.*, 1985) também tem sido utilizada.

O fracionamento por etanol antes do fracionamento em coluna parece resultar em melhor rendimento das colunas de troca aniónica (Dupont e Selvendran, 1987; Selvendran e King, 1989; Selvendran e Ryden, 1990).

1.4 - A azeitona

1.4.1- Considerações Gerais

A azeitona (*Olea europaea*) é o fruto da oliveira, árvore que se cultiva nos países envolventes do Mar Mediterrâneo, de onde é originária, encontrando-se também em regiões como a Califórnia, África do Sul e Austrália. Em Portugal, é medianamente abundante em todo o território sendo no Alentejo e Trás-os-Montes as regiões onde a sua concentração é maior.

A azeitona (Figura 1.8) é uma drupa, classificação que designa os frutos carnosos que possuem no interior um caroço muito duro. É um fruto ovalado de cor verde que passa a púrpura ou preto quando maduro e possui um peso que varia entre 1,5 e 12 gramas de acordo com a variedade. A polpa, muito amarga especialmente na fase em que ainda é verde, compreende entre 70 a 88% do fruto. O caroço (endocarpo) é duro e alongado e possui no interior a semente. A azeitona é muito rica em óleo, o azeite, proveniente principalmente da polpa. Uma azeitona possui uma quantidade média em óleo de cerca de 22% do seu peso fresco (44% do peso seco) (Kiritsakis e Markakis, 1987),

variando esta percentagem com o amadurecimento, podendo atingir 65% do peso seco (Fernández Díez, 1971).

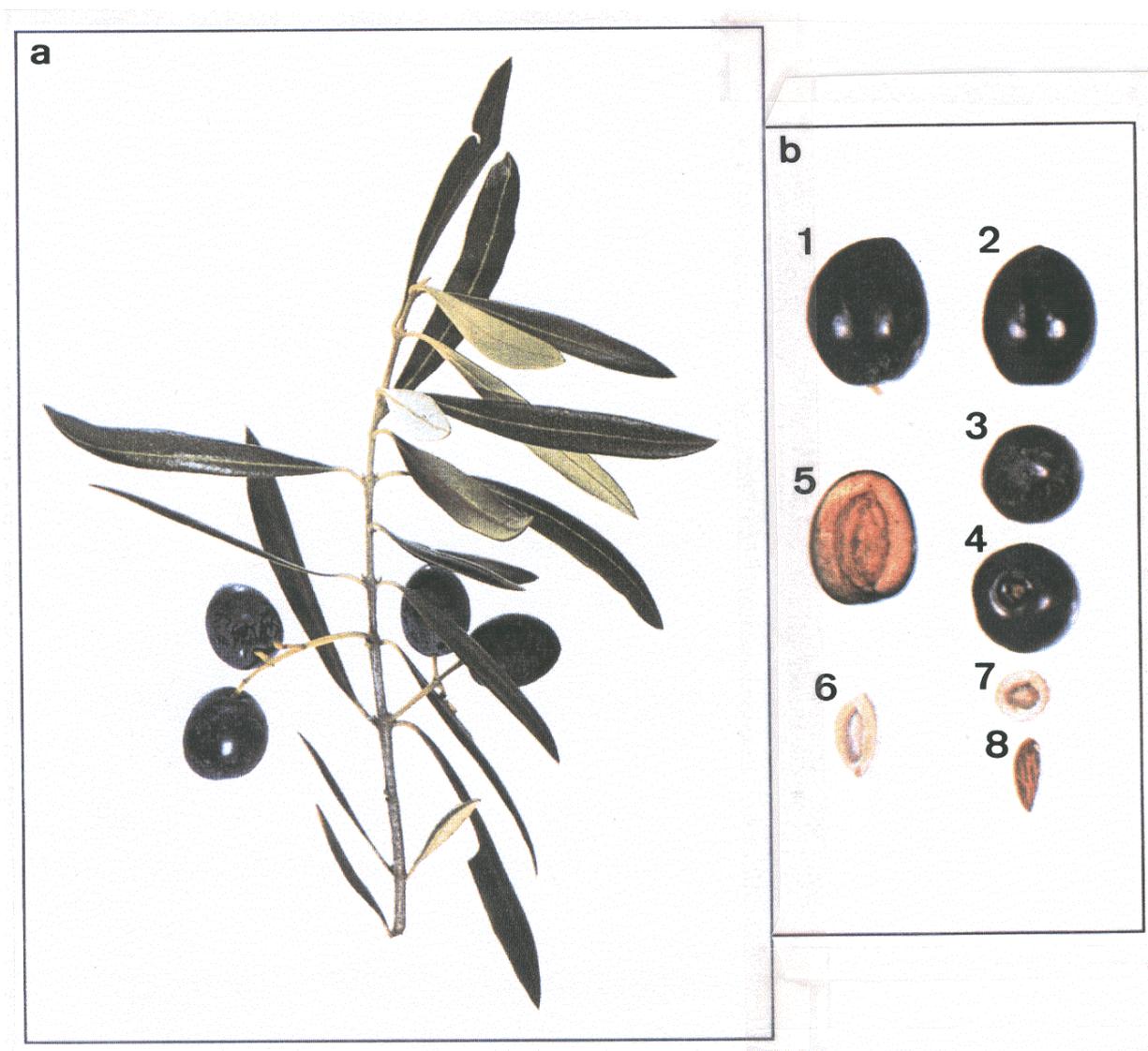


Figura 1.8 - A azeitona, segundo a descrição e apresentação de Leitão *et al.* (1986). a) Aspecto de um ramo de oliveira com os respectivos frutos (ampliação de 0.7 vezes); b) Aspecto dos frutos em estado de maturação adiantado: frutos inteiros vistos em posição longitudinal (b1 e b2), frutos inteiros vistos de topo mostrando o ápice (b3) e a base (b4), fruto seccionado longitudinalmente (b5), endocarpo seccionado longitudinalmente (b6) e transversalmente (b7), semente (b8).

A polpa da azeitona é muito rica em compostos fenólicos (Amiot *et al.*, 1986; Vlahov, 1992). Um destes compostos, a oleuropeína (Figura 1.9) é o responsável pelo sabor amargo das azeitonas verdes e pela acção inibidora da fermentação láctica na preparação da azeitona de mesa; contribui

também para o desenvolvimento de cor em alguns tipos de azeitonas processadas (Vázquez Roncero e Janer del Valle, 1977). O enegrecimento da azeitona com a maturação é resultado da acção da enzima polifenol oxidase, estando dependente da quantidade de *o*-fenóis existentes (Sciancalepore e Longone, 1984; Sciancalepore, 1985).

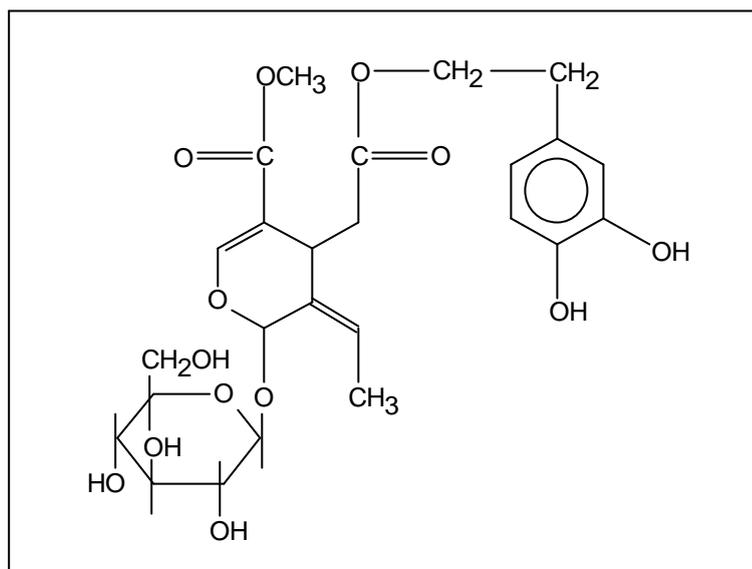


Figura 1.9 - Estrutura da oleuropeína.

O crescimento da azeitona segue uma curva sigmoideal (Figura 1.10), característica das drupas (Romani e Jennings, 1971), em que a lenhificação do endocarpo ocorre na fase II e a expansão da parte edível ocorre na fase III.

Nos países de influência mediterrânica a azeitona desenvolve-se entre os meses de Junho/Julho e Novembro.

A valorização da azeitona reside na importância económica e social do azeite e também na sua utilização como azeitona de mesa onde, devido às suas propriedades organolépticas e composição, é muito apreciada em gastronomia como aperitivo, elemento decorativo ou mesmo elemento nutricional (Fernández Díez, 1983).

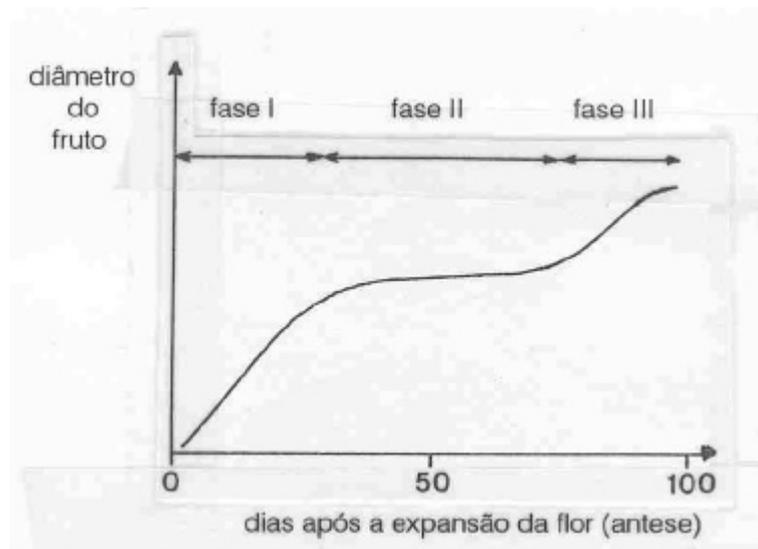


Figura 1.10 - Curva de crescimento da azeitona.

1.4.2- Tipos de Estrutura Celular

A polpa da azeitona apresenta uma estrutura celular característica em que células de parede celular espessa (escleritos) se encontram dispersas ou em pequenos grupos entre as células parenquimatosas de parede celular fina (Figura 1.11) (Winton e Winton, 1932).

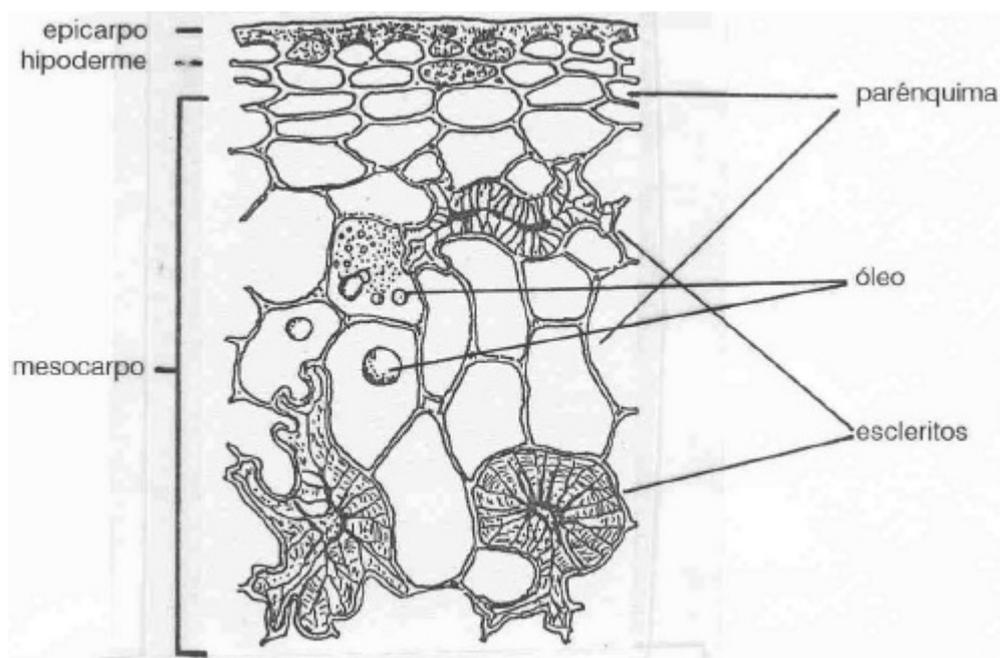


Figura 1.11 - Estrutura celular da polpa da azeitona.

O caroço da azeitona é constituído por células lenhificadas mais ou menos comprimidas e de parede celular espessa que formam uma capa que envolve células parenquimatosas de parede celular fina (Figura 1.12).

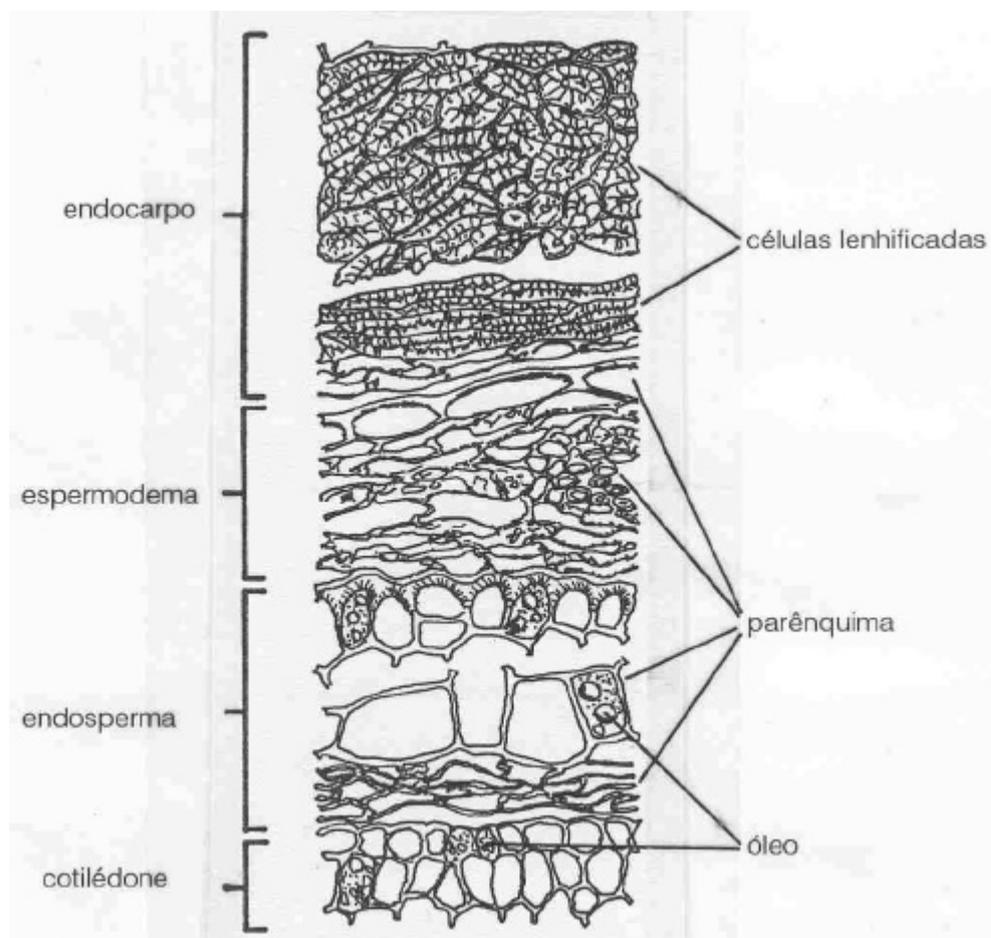


Figura 1.12 - Estrutura celular do caroço da azeitona.

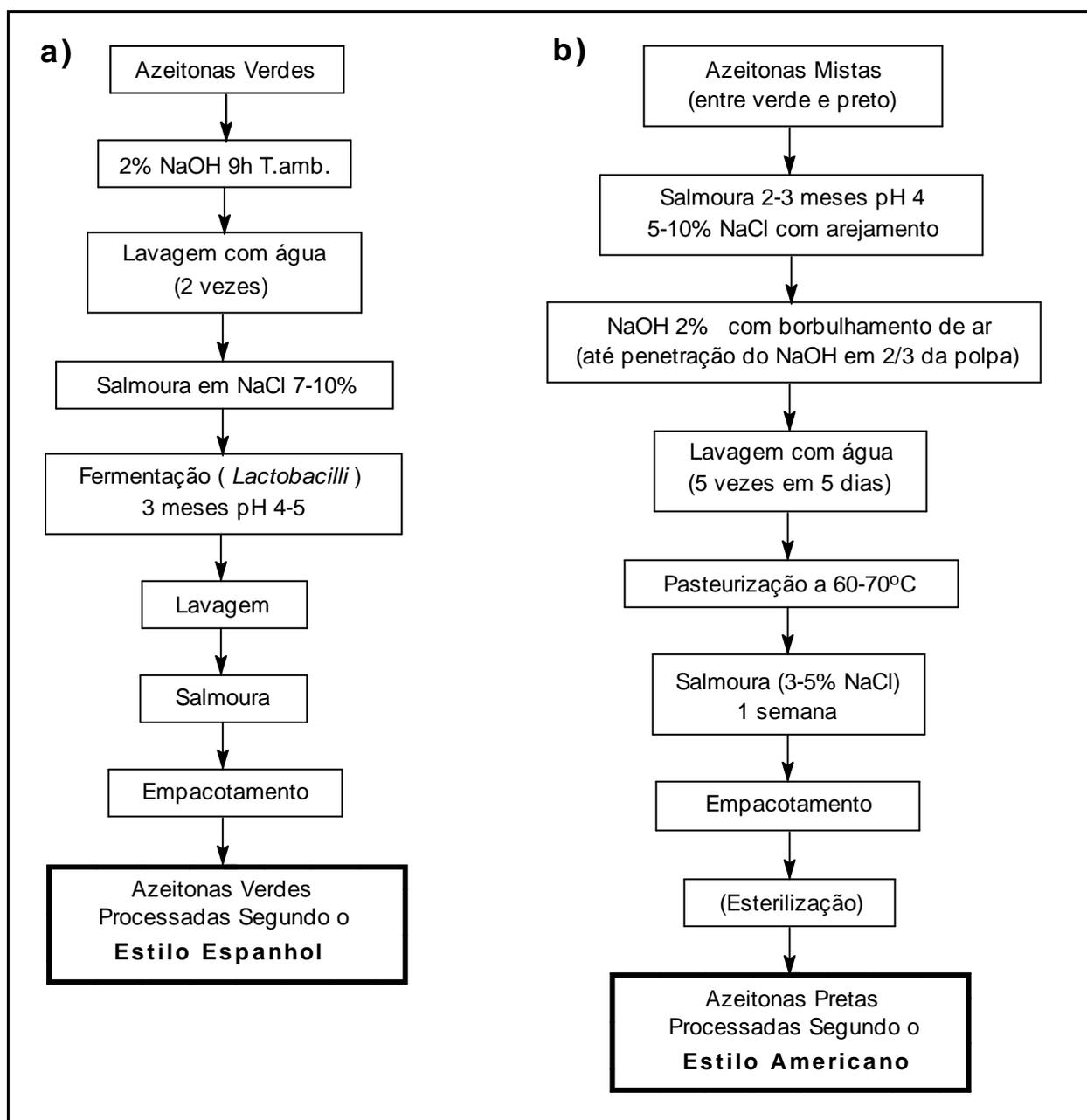
1.4.3- Métodos de Processamento

Vários métodos são utilizados para o processamento da azeitona a azeitona de mesa sendo os mais utilizados em Portugal os procedimentos segundo o "estilo Espanhol" (Sevilhano) e "estilo Americano" (Californiano) que se resumem no Esquema 1.1.

Segundo o "Estilo Espanhol" as azeitonas, em verde, são submetidas a tratamento anaeróbico com NaOH para eliminação da oleuropeína seguindo-se uma fermentação láctica; segundo o "Estilo

Americano" as azeitonas já em estado de maturação adiantado (mistas ou pretas) são submetidas a tratamento aeróbico com NaOH para eliminação dos compostos amargos e uniformização da cor.

As alterações provocadas na parede celular pelos diversos tipos de processamento não foi ainda objecto de estudo apesar da sua importância para a compreensão das alterações de textura e eficiência na penetração dos reagentes utilizados no tratamento com vista à sua optimização em diferentes variedades e tamanhos de azeitona.



Esquema 1.1 - Procedimentos utilizados para a preparação de azeitona de mesa segundo os métodos (a) Sevilhano e (b) Californiano.

1.4.4 - Variações de Textura Durante o Amadurecimento

A informação referente à organização macromolecular e composição das paredes celulares da azeitona é escassa. O facto de a azeitona ser um fruto rico em óleo, possuir proteínas intra-celulares e ser muito rica em polifenóis, características que dificultam bastante a preparação e isolamento do material das paredes celulares, poderá estar na origem desta escassez de informação referente às paredes celulares da azeitona.

Alguma atenção foi dada nos anos 70 ao estudo da variação das substâncias pécticas e à presença das enzimas pectinolíticas pectina-esterase e poligalacturonase (Fernández Díez *et al.*, 1985). Destes trabalhos realçam-se as seguintes conclusões:

(1) a textura e conteúdo de ácido galacturónico diminuem progressivamente com a maturação;

(2) a percentagem de esterificação das substâncias pécticas diminui com a maturação, chegando a ser zero em azeitonas muito maduras;

(3) a actividade de pectina-esterase é pouco significativa em azeitonas imaturas, crescendo a sua concentração até à maturação (onde apresenta um máximo), decrescendo de seguida até desaparecer;

(4) a actividade de poligalacturonase só é detectada em azeitonas maduras ou muito maduras, possuindo um máximo de actividade após a extinção da actividade de pectina-esterase.

O reconhecimento do valor nutritivo e influência da fibra dos frutos e legumes na prevenção de um vasto número de doenças motivou o estudo da fibra da azeitona, tendo-se verificado ser um fruto equilibrado em fibra dietética (Herédia *et al.*, 1990).

As hemiceluloses foram objecto particular de estudo, tendo permitido o isolamento e caracterização parcial de uma 4-O-metilglucuronoxilana (Tejero Mateo *et al.*, 1985a,b; Gil Serrano *et al.*, 1986), de uma galactoglucomanana (Tejero Mateo *et al.*, 1986a) e de uma xiloglucana (Tejero Mateo *et al.*, 1986b; Gil Serrano e Tejero Mateo, 1988), esta última a partir da polpa de azeitonas processadas segundo o estilo sevilhano.

1.5 - Sumário e Âmbito do Trabalho

O desenvolvimento, nos últimos vinte anos, dos métodos de preparação e análise das paredes celulares tem permitido o isolamento e caracterização de polímeros de uma vasta gama de tecidos de plantas.

O melhoramento das técnicas de preparação de paredes celulares livres de contaminantes intra-celulares e a aplicação de métodos suaves e não degradativos à extracção dos polímeros das paredes celulares permitiu estabelecer definitivamente a composição e estrutura dos polissacarídeos da maioria das paredes celulares. As principais características estruturais dos polissacarídeos que têm sido caracterizados foram sucintamente descritos neste capítulo introdutório.

Complementando a aplicação destas técnicas, o desenvolvimento de técnicas de GC, GC/MS, HPLC e RMN de ^1H e ^{13}C têm permitido o fraccionamento e caracterização de quantidades ínfimas de material.

A nova metodologia tornou possível o isolamento e a caracterização de polissacarídeos das paredes celulares de materiais ricos em proteínas, compostos fenólicos e óleo, tal como a polpa da azeitona.

Devido aos problemas inerentes ao estudo das paredes celulares da polpa da azeitona, muito pouco trabalho foi até agora efectuado neste tipo de tecidos, tendo o trabalho até à data sido restringido ao isolamento e caracterização parcial de xilanas acídicas e xiloglucanas. No entanto, o conhecimento detalhado da estrutura das paredes celulares da azeitona poderia ajudar a projectar melhores métodos para a ruptura da parede celular e aumento da extracção de azeite. Em adição, o conhecimento das paredes celulares da azeitona poderiam ajudar a compreender melhor as modificações que ocorrem durante o processamento da azeitona.

Neste trabalho, foi dada especial atenção ao isolamento das paredes celulares da azeitona numa forma relativamente pura. A extracção sequencial dos polissacarídeos utilizou condições que causassem um mínimo de degradação nos polímeros, tendo sido aplicados métodos de análise melhorados a fim de serem elucidadas as características estruturais dos polissacarídeos presentes.

O mesmo tipo de procedimento foi aplicado ao estudo de azeitonas processadas, contribuindo para um acesso mais realista às variações que ocorrem durante o processamento. Em adição,

foram também planeados métodos para o isolamento e caracterização dos polímeros das paredes celulares dos tecidos lenhificados do caroço da azeitona.