

## 2.1 - Azeitonas Utilizadas na Presente Investigação

Neste estudo foram utilizadas azeitonas da variedade "Douro", proveniente da região do Douro, no norte de Portugal. Foi escolhida esta variedade por haver a garantia de poder ser obtida por uma fábrica local (Maçaricos-Praia de Mira) quer em fresco quer processada em verde ou preto.

Foi adoptado um tamanho médio de 2,0 cm de comprimento e 1,2 cm de diâmetro (calibre 29-32, 290-320 frutos / kg).

Para o estudo da azeitona em fresco foram colhidas azeitonas em estado maduro em verde. Este é o estado de maturação utilizado para o processamento em verde; o processamento em preto utiliza azeitonas em estado de maturação mais adiantado, quando se verifica a variação de cor de verde para preto, designando-se a azeitona neste estado de maturação "azeitona mista".

## 2.2 - Equipamento

Numa breve descrição das principais especificações técnicas, irão ser apresentados os diversos aparelhos que fizeram parte do equipamento utilizado no decorrer do trabalho experimental:

- Cromatógrafo de Gases Carlo Erba, modelo HR GC 5160 Mega Series equipado com um injecto "cold on column" para análise de PMAA's e modelo GC 6000 Vega Series equipado com um injecto "split/splitless" para análise de acetatos de alditol. Ambos os cromatógrafos possuíam detector de ionização de chama (FID) e tinham acoplado um integrador Spectra-Physics 4400 integrador com possibilidade de reintegração através do programa Spectra-Physics Winner 386.
- GC/MS Hewlett Packard HP 5890 series 2, Trio-1S VG-mass- lab.
- Espectrómetro de RMN de 400 MHz JEOL GX 400, em Norwich, ou alternativamente, espectrómetro de RMN de 300 MHz Bruker AMX 300, em Aveiro.
- Analisador Automático de Azoto, Perkin-Elmer nitrogen analyser 1400.
- Centrífuga refrigerada MSE High Speed 18.
- Espectrofotómetro Vis/UV Perkin-Elmer 550 S de duplo feixe.
- Espectrofotómetro leitor de placas Dynatech MR700 Microplate Reader.

- Liofilizador Edwards Modulyo com bomba Edwards de dois estágios.
- Forno de Vácuo Termostatizado Townson & Mercer Ld<sup>a</sup>.
- Moínho de bolas Berco, equipado com controlador de velocidade e "Roller" Pascall. O moínho de bolas utilizou uma jarra de porcelana de 1L com carga de bolas em porcelana, Pascall Engineering.
- Moínho criogénico Freezer/Mill SPEX 6700.
- Detector de Índice de Refracção Gilson, modelo 131 acoplado a um Colector de Fracções Gilson modelo 202, Controlador de Fracções Gilson modelo 201-202 e Registador Venture RE 511.20 Potenciometric Recorder.
- Bomba Peristáltica P-1 Pharmacia ou alternativamente Gilson Minipuls 2.
- Colector de fracções LKB Ultrorac - Fraction Colector 7000 ou alternativamente LKB Bromma - 2112 Redirac.
- Coluna termostatizada Pharmacia C16/100.
- Colunas de cromatografia Pharmacia C10/10, C10/20 e C16/40.
- Banho termostatizado Julabo, de 1L, com regulador modelo CM.
- Ultraturrax Janke & Kunkel.
- Evaporador rotativo Buchi (vários modelos).
- Moínho de café Janke & Kunkel com dispositivo de arrefecimento com água.
- Concentrador de Amostras Techne Dri-Block DB-3 - SC-3 Sample Concentrator.
- Blocos de Aquecimento para Tubos de Ensaio Techne Dri-Block DB-3H.
- Centrífuga de Bancada MSE Mistral 2000.
- Aparelho de pH Philips PW 9420 pH meter.

### 2.3 - Ensaio com Resíduos Insolúveis em Álcool

Nos primeiros ensaios foi analisada a viabilidade da preparação de material da parede celular (CWM) a partir de resíduos insolúveis em álcool (AIR) para o estudo das paredes celulares

da azeitona. O CWM preparado a partir do AIR mostrou estar muito contaminado com proteínas intra-celulares e compostos fenólicos. Extracções sequenciais deste material com solventes aquosos (CDTA e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) solubilizaram uma gama de polissacarídeos pécnicos contaminados com proteínas intra-celulares e compostos fenólicos.

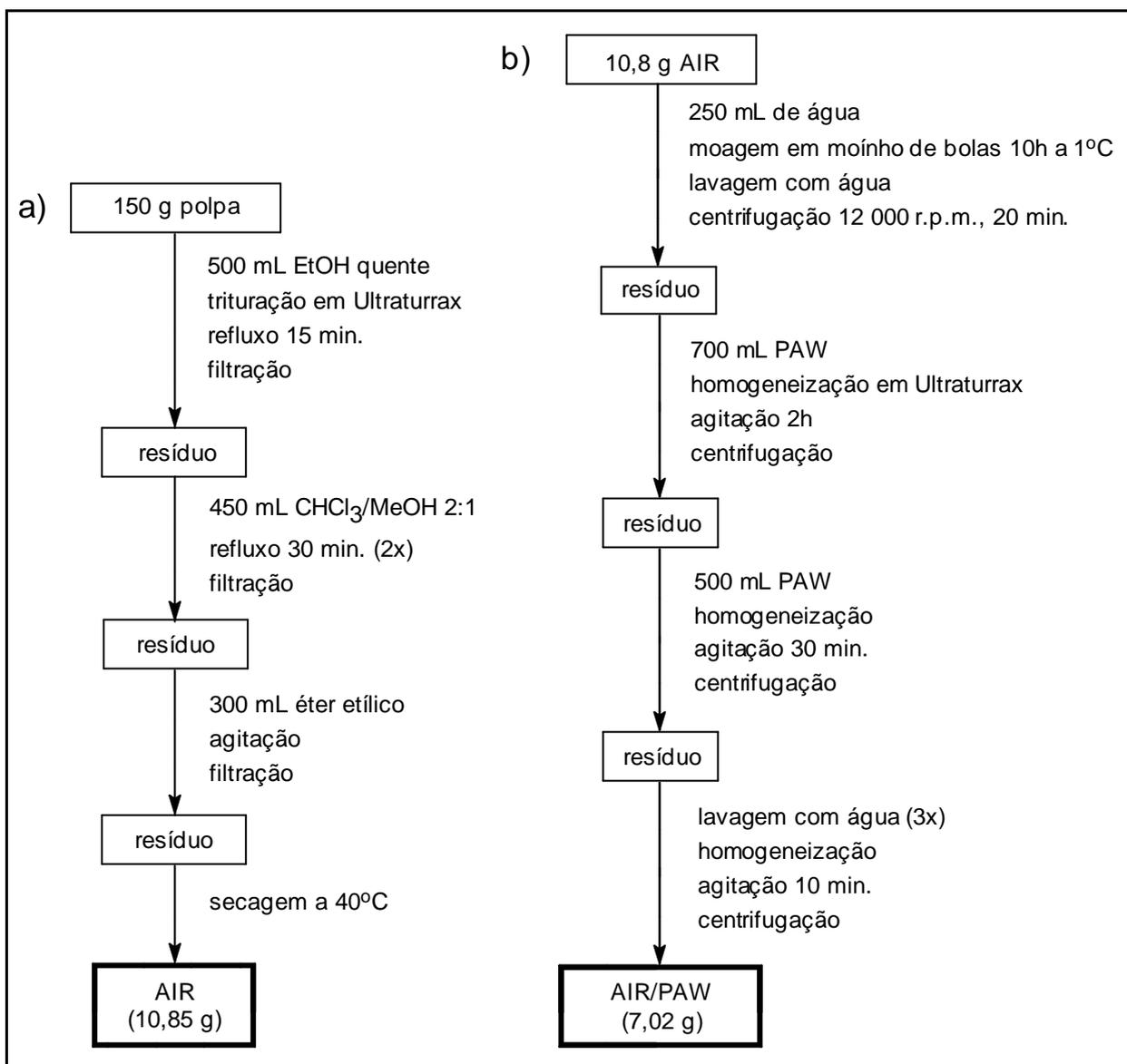
Apesar das desvantagens encontradas, estas experiências são descritas por poderem contribuir para a compreensão dos problemas de co-precipitação de compostos intra-celulares que ocorrem durante o processamento da azeitona.

### 2.3.1 - Preparação do AIR

A polpa da azeitona foi removida do caroço com a ajuda de um descaroçador e o material aderente ao caroço foi removido com a ajuda de uma lâmina. O material proveniente da polpa foi imediatamente mergulhado em azoto líquido.

O procedimento da preparação do AIR da polpa da azeitona encontra-se resumido no Esquema 2.1-a.

A polpa da azeitona (150 g) foi mergulhada em 500 mL de etanol quente, triturada com um homogeneizador do tipo "Ultraturax", refluxada 15 min e filtrada por funil com placa sinterizada G1. O resíduo foi submetido a duas extracções com 450 mL da mistura  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1, v/v), em refluxo de 30 min cada. Ao resíduo foi adicionado éter etílico (300 mL), sendo depois filtrado e seco a 40°C até não ser detectada variação de peso. Foram obtidos 10,85 g de AIR, 7,2% do material presente na polpa. O resíduo encontrava-se completamente desprovido de óleo.



Esquema 2.1 - Preparação do AIR (a) e AIR/PAW (b) da polpa da azeitona.

### 2.3.2 - Preparação de AIR's de Diferentes Camadas da Polpa

A polpa de algumas azeitonas da variedade "Douro" foi cuidadosamente seccionada em 4 camadas diferentes (secções 1 a 4) (Figura 2.1). Estes tecidos foram congelados em azoto líquido e guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até terem sido utilizados. Os AIR foram preparados por refluxo em 95% de etanol durante 30 min., duas vezes, filtração em funil com placa porosa G1, lavagem com etanol absoluto e éter etílico e secagem em estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  até não haver alteração de peso.

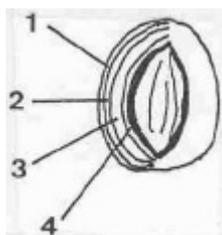


Figura 2.1 - Secções das diferentes camadas da polpa.

### 2.3.3 - Preparação do CWM a partir do AIR (AIR/PAW)

O procedimento da preparação do AIR/PAW encontra-se resumido no Esquema 2.1-b.

Parte do AIR obtido (10.80 g) foi humedecida com 250 mL de água e moída em moínho de bolas durante 10h a 1°C a uma velocidade de 60 rev./min. O resíduo foi lavado com água destilada, - centrifugado a 12 000 rpm (23 000g) durante 20 min e depois foi tratado com 700 mL de PhOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (2:1:1, m/v/v) (PAW). Na preparação desta solução de fenol tem-se em consideração a quantidade de água já presente no resíduo, assumindo-se ser esta equivalente à massa do resíduo. O resíduo foi homogeneizado, agitado durante 2h e recuperado por centrifugação a 12 000 rpm durante 20 min. O tratamento com PAW foi repetido com 500 mL de solução durante 30 min sendo depois o resíduo lavado abundantemente com água e dialisado com várias mudanças de água durante 3 dias para remoção completa do fenol. No final, o resíduo obtido (AIR/PAW) foi congelado como suspensão aquosa. Uma pequena porção foi liofilizada para determinação do rendimento e análise de açúcares. Foram obtidos 7,02 g de AIR/PAW, 4,7% do material inicialmente presente na polpa. Este material continha uma quantidade significativa de proteínas intra-celulares co-precipitadas.

### 2.3.4 - Extracção Sequencial do AIR/PAW

O procedimento da extracção com soluções de CDTA e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> do AIR/PAW da polpa da azeitona foi semelhante ao do Esquema 2.3. O AIR/PAW (6.69g) foi sequencialmente extraído com 670 mL e 300 mL de solução de CDTA (CDTA-1 e 2) e 2 vezes com 600 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-1 e 2).

Após cada extracção os polímeros foram separados do resíduo insolúvel por centrifugação a 12 000 rpm (23 000g) a 4°C; antes de nova extracção, os resíduos foram lavados com água destilada e novamente centrifugados. Os sobrenadantes foram tratados tal como posteriormente descrito no ponto 2.5 e Esquema 2.3.

## 2.4 - Preparação do CWM da Polpa

### 2.4.1 - Azeitonas em Fresco

A metodologia utilizada encontra-se resumida no Esquema 2.2 segundo o método proposto por Selvendran *et al.* (1985) e Selvendran e O'Neill (1987).

Foram utilizados 800 g de azeitonas a que corresponderam 620 g de polpa (78%). Os pedaços de tecido provenientes da polpa foram homogeneizados com 900mL de solução aquosa a 1,5% de dodecilsulfato de sódio (SDS) contendo 5mM de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . A solução foi filtrada através de um pano de nylon e o resíduo foi lavado por duas vezes com 700 mL de SDS 0,5% contendo 3mM de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . O resíduo foi depois suspenso em 500 mL da mesma solução e, para que todas as células fossem separadas e rompidas, a suspensão foi moída num moínho de bolas durante 10h, a 1°C, à velocidade de 60 rev./min. O resíduo, constituído por partículas muito finas, foi recuperado por centrifugação [12 000 rpm (23 000g), 20 min a 4°C] e lavado duas vezes com 1L de água destilada, sendo a solução centrifugada após cada lavagem. O resíduo foi então extraído durante uma noite a 20°C com uma solução de 3L de PAW. No final, a solução foi centrifugada e o resíduo ressuspenso em 1L de PAW, homogeneizado em Ultraturrax e agitado durante 2h a 20°C. O resíduo recolhido por centrifugação foi lavado 3 vezes com 1L de água e depois dialisado a 1°C durante 3 dias com duas mudas de água diárias. Para impedir a contaminação por microrganismos, foram sempre adicionadas umas gotas de clorofórmio e tolueno às águas das diálises. O resíduo obtido (CWM) foi congelado como suspensão aquosa. Uma pequena porção foi liofilizada para - determinação do rendimento e análise de açúcares. Foram obtidos 23 g de CWM, a que correspondeu um rendimento de 3,7 g / 100 g de polpa.

Alíquotas dos extractos obtidos na preparação do CWM (SDS 1,5%, SDS 0,5% e PAW) foram dialisadas (Esquema 2.2). Os extractos de SDS foram dialisados a 20°C de modo a evitar a precipitação do SDS, primeiro, contra água corrente, depois, contra água destilada com pelo menos duas mudanças de água diárias até não haver formação de espuma por agitação da água da diálise (1 a 2 semanas). O extracto de PAW (200 mL) foi primeiro diluído com 100 mL de água. As amostras dialisadas provenientes de ambos os extractos de SDS e do extracto de PAW foram concentradas por evaporação a pressão reduzida a 35°C tendo-se verificado conterem quantidades significativas de óleo. Este óleo contaminante foi removido por refluxo (62°C) de 30 min com CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1, v/v) por duas vezes.

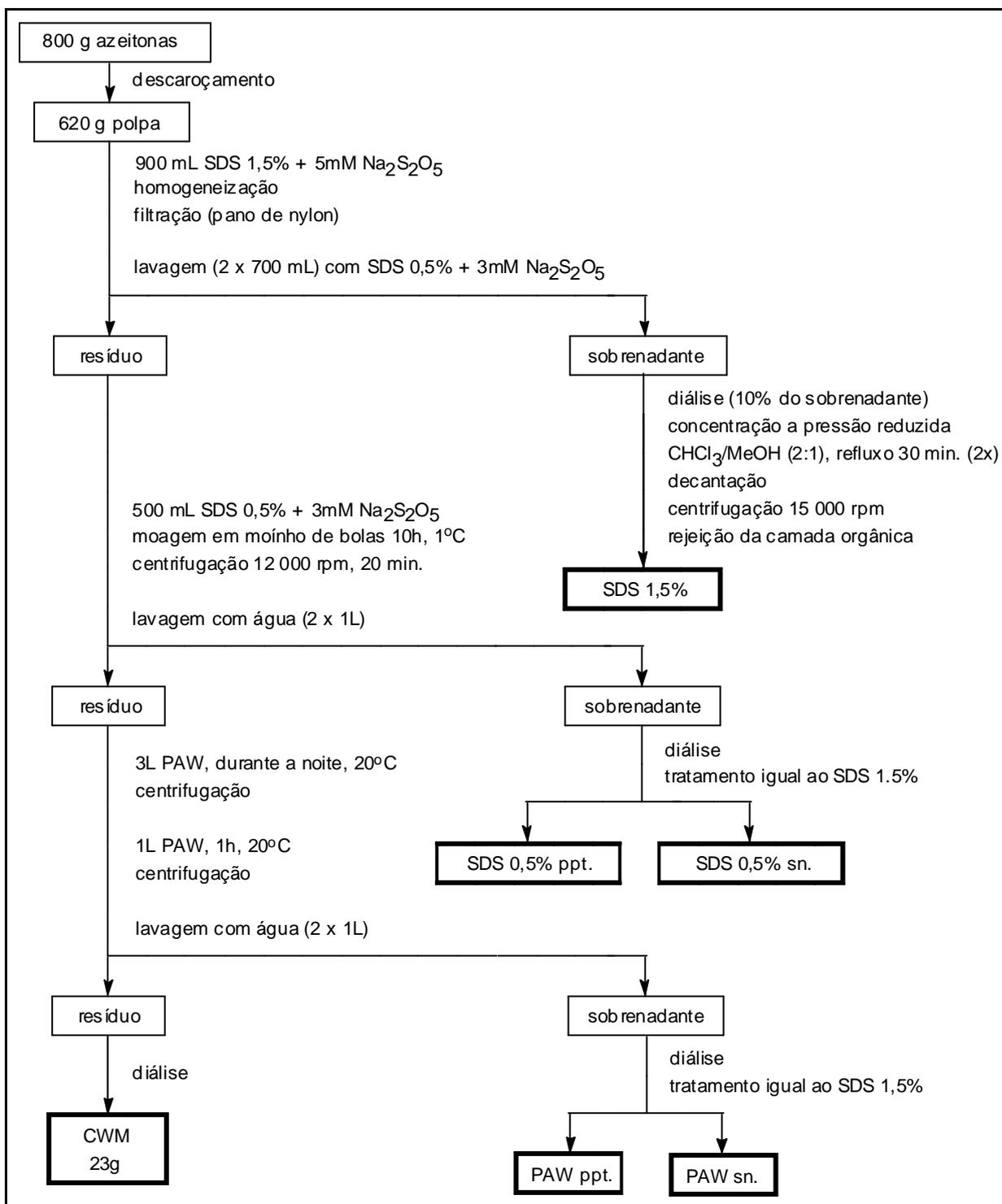
A camada aquosa foi separada da camada orgânica e do sólido sedimentado na interface das duas fases líquidas por decantação. Para total separação das 3 fases o material não separado foi centrifugado a 15 000 rpm. Esta operação foi repetida após cada extracção sendo as fases aquosas concentradas e liofilizadas; os precipitados foram também liofilizados e as camadas orgânicas foram rejeitadas.

## 2.4.2 - Azeitonas Processadas

### a) Verdes

A metodologia utilizada foi semelhante à descrita para as azeitonas em fresco (ponto 2.4.1 e Esquema 2.2). As pequenas variações introduzidas são seguidamente descritas. Foram utilizados 920 g de azeitonas processadas em verde a que corresponderam 750 g de polpa (82%). A homogeneização dos tecidos foi feita com 1L de SDS 1,5%, tendo o resíduo sido lavado com 1L de SDS 0,5% duas vezes. O resíduo foi suspenso em 750 mL de solução de SDS 0,5% e moído em moínho de bolas numa jarra de 3L durante 8h e depois foi lavado por 2 vezes com 1L de água. A solução de PAW (2L) foi mantida em agitação durante uma noite; na segunda extracção com PAW foi utilizado 1L de reagente numa extracção de 2h; no final o resíduo foi lavado duas vezes com 1L de água e dialisado. O CWM (CWMv) foi guardado como suspensão aquosa a -20°C. Uma pequena

quantidade foi liofilizada indicando terem sido obtidos 24 g de CWM a que correspondeu um rendimento de 3,2 g / 100 g de polpa.



Esquema 2.2 - Preparação do CWM da polpa da azeitona.

Para posterior análise, foram dialisados 500 mL (16%) do extracto de SDS 1,5%, o extracto de SDS 0,5% foi dialisado na totalidade e do extracto de PAW foram dialisados 450 mL, 30% do sobrenadante resultante da primeira extracção com PAW. Estes extractos foram tratados tal como descrito para os extractos resultantes da preparação do CWM das azeitonas em fresco (ponto 2.4.1 e Esquema 2.2).

## **b) Pretas**

A metodologia utilizada foi semelhante à descrita para as azeitonas em fresco (ponto 2.4.1 e Esquema 2.2). As pequenas variações introduzidas são seguidamente descritas.

Foram utilizados 750 g de azeitonas processadas em preto a que corresponderam 600 g de polpa (80%). A homogeneização dos tecidos foi feita com 1L de SDS 1,5% e o resíduo foi lavado com 1L de SDS 0,5% por duas vezes. O resíduo foi suspenso em 750 mL de SDS 0,5% e moído em moínho de bolas numa jarra de 3L durante 8h, tendo sido depois lavado por 2 vezes com 1,2L de água. A solução de PAW (2L) foi mantida em agitação durante uma noite; na segunda extracção com PAW utilizou-se 800 mL de reagente numa extracção de 2h e no final o resíduo foi lavado por duas vezes com 1L de água e dialisado. O CWM (CWMp) foi guardado como suspensão aquosa a -20° C. Uma pequena quantidade foi liofilizada indicando terem sido obtidos 23 g de CWMp a que corresponde um rendimento de 3,8 g / 100 g de polpa. O CWMp apresentava-se acastanhado, - possivelmente resultado da co-precipitação de polifenóis condensados.

Para posterior análise, foram dialisados 500 mL (20%) do extracto de SDS 1,5%, o extracto de SDS 0,5% foi dialisado na totalidade e do extracto de PAW foram dialisados 350 mL, 25% do sobrenadante resultante da primeira extracção com PAW. Estes extractos apresentavam-se com uma coloração castanha, sendo a mais intensa a do extracto resultante da primeira extracção com PAW e foram tratados tal como descrito em 2.4.1 para os extractos resultantes da preparação do CWM das azeitonas frescas (ver Esquema 2.2).

## 2.5 - Extração Sequencial do CWM

### 2.5.1 - Azeitonas em Fresco

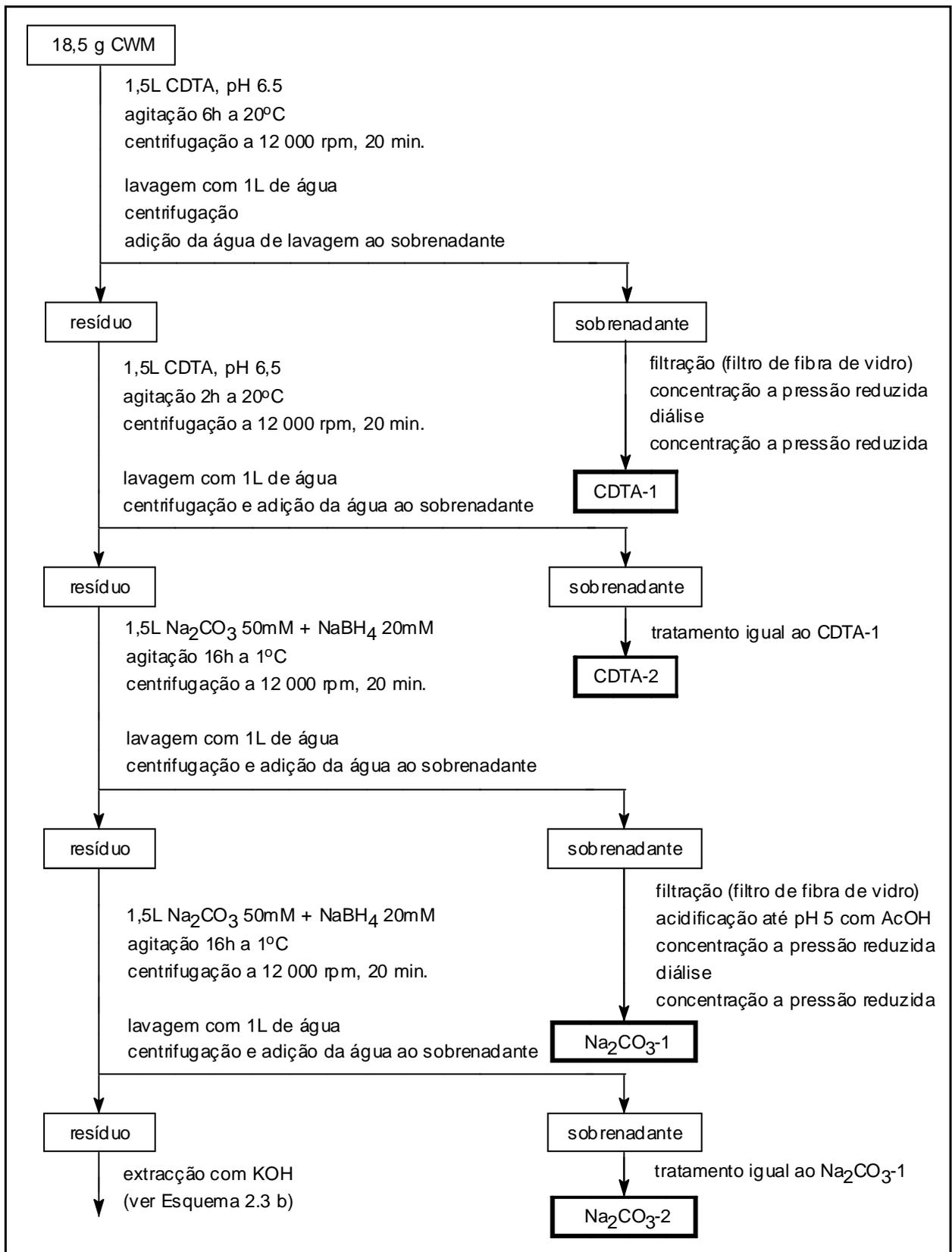
O CWM foi extraído com solventes aquosos (Figura 2.2 e Esquema 2.3) tal como descrito por Selvendran *et al.* (1985) e Selvendran e O'Neill (1987).

O CWM (18,5 g) foi sequencialmente extraído com [1] 50mM ciclo-hexano-*trans*-1,2-diamina-NNN'N'-tetra-acetato (CDTA), sal de sódio (1,5L), pH 6,5, 20°C, 6h (CDTA-1); [2] 50mM CDTA (1,5L), pH 6,5, 20°C, 2h (CDTA-2); [3] 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 20mM NaBH<sub>4</sub> (1,5L) a 1°C, 16h (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-1); [4] 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 20mM NaBH<sub>4</sub> (1,5L) a 20°C, 3h (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-2); [5] 1M KOH + 20mM NaBH<sub>4</sub> (1L) a 1°C, 2h; [6] 1M KOH + 20mM NaBH<sub>4</sub> (1L) a 20°C, 2h; [7] 4M KOH + 20mM NaBH<sub>4</sub> (1L) a 20°C, 2h; e [8] 4M KOH + 3,5% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 20mM NaBH<sub>4</sub> (1L) a 20°C, 2h.

Solventes	CWM	Polímeros extraídos
CDTA (2x)		polissacarídeos pécticos associados principalmente por pontes de Ca <sup>2+</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2x)		polissacarídeos pécticos associados principalmente por ligações éster de "cross-linking"
1M KOH (2x)		glucuronoxilanas, xiloglucanas e pequenas quantidades de polissacarídeos pécticos
4M KOH e 4M KOH + borato		xiloglucanas, xilanas, mananas e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina
		<b>Resíduo rico em celulose (CR1)</b>

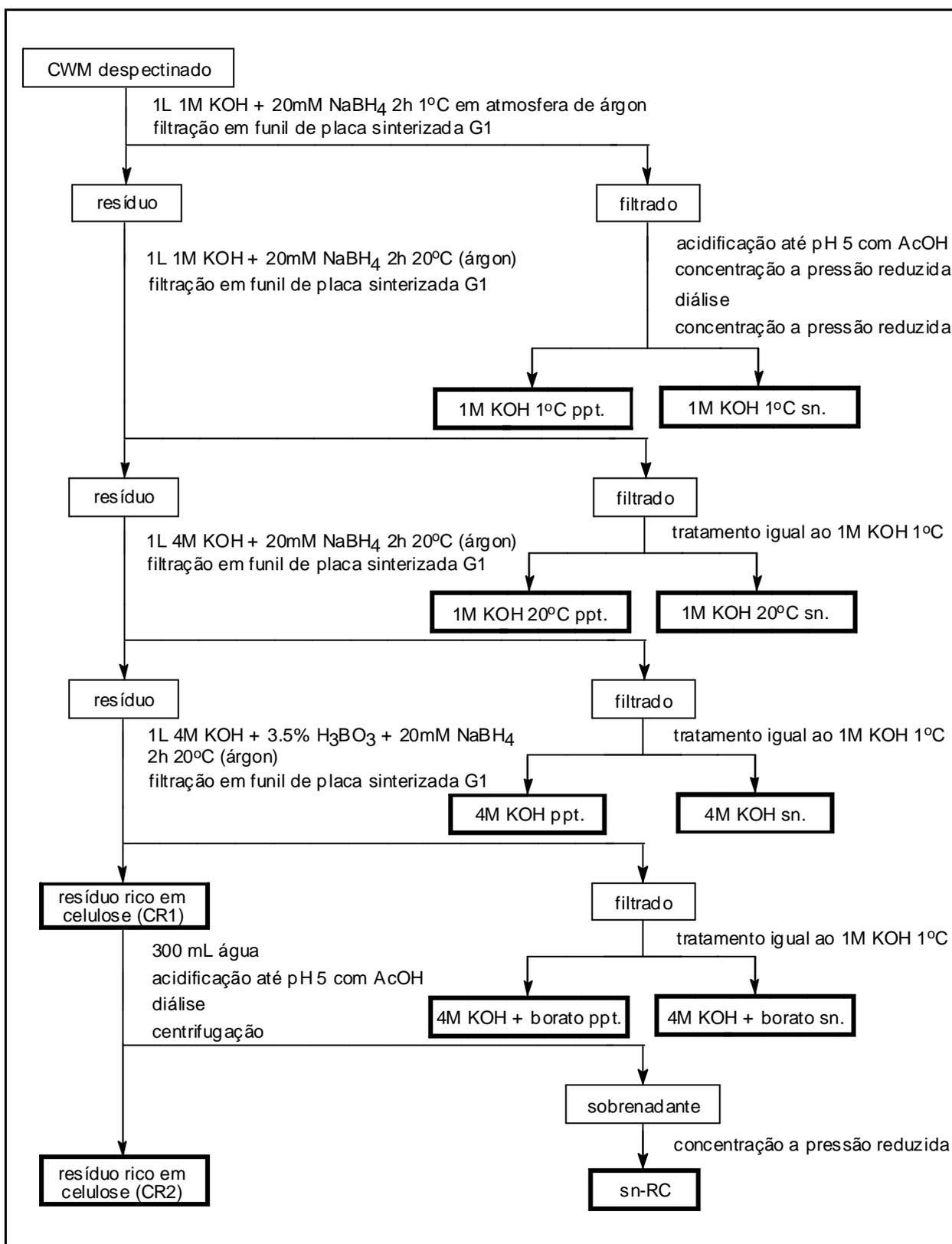
Figura 2.2 - Extração sequencial do CWM da polpa da azeitona.

Diagrama dos principais polímeros extraídos até à obtenção do resíduo rico em celulose (RC1).



Esquema 2.3 - Extracção sequencial do CWM da polpa da azeitona.

a) Extracções com CDTA e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



Esquema 2.3 - Extração sequencial do CWM da polpa da azeitona.  
b) Extração com soluções de KOH.

As extracções alcalinas foram efectuadas com soluções desprovidas de oxigénio e em atmosfera de árgon. A água destilada utilizada nestas soluções foi previamente fervida durante 20 minutos e deixada arrefecer com borbulhamento de árgon. Quando a água atingia a temperatura ambiente era adicionado o KOH e o NaBH<sub>4</sub>, sempre em atmosfera de árgon até que a solução arrefecesse novamente até à temperatura ambiente. As soluções assim preparadas foram utilizadas na hora ou no dia seguinte. Neste último caso a solução era guardada num frasco rolhado climatizado com árgon.

Após cada extracção com CDTA ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> os polímeros solubilizados foram separados do resíduo insolúvel por centrifugação a 12 000 rpm (23 000g) a 4°C; o resíduo foi lavado com água antes de nova extracção e os sobrenadantes combinados; os polímeros solubilizados por extracção com soluções de KOH foram separados do resíduo insolúvel por filtração em funil de placa sinterizada G1. Todos os extractos foram filtrados por filtros em fibra de vidro GF/C, concentrados a pressão reduzida no evaporador rotativo a temperatura não superior a 37°C e dialisados. Os extractos de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH foram acidificados até pH 5 com ácido acético antes de serem dialisados. A adição do ácido foi gradual e para um recipiente de boca larga devido à libertação de H<sub>2</sub> proveniente do NaBH<sub>4</sub>. Os precipitados formados durante a diálise dos extractos de KOH foram recolhidos por centrifugação a 12 000 rpm e guardados separadamente. As soluções de CDTA foram dialisadas exaustivamente durante uma semana com 2 a 3 mudas de água diárias.

O resíduo rico em celulose (RC1) que permanece após a última extracção (4M KOH + borato) foi suspenso em 300 mL de água e a solução foi acidificada até pH 5 com ácido acético e dialisada. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante (sn-RC) foi removido do remanescente resíduo rico em celulose (RC2).

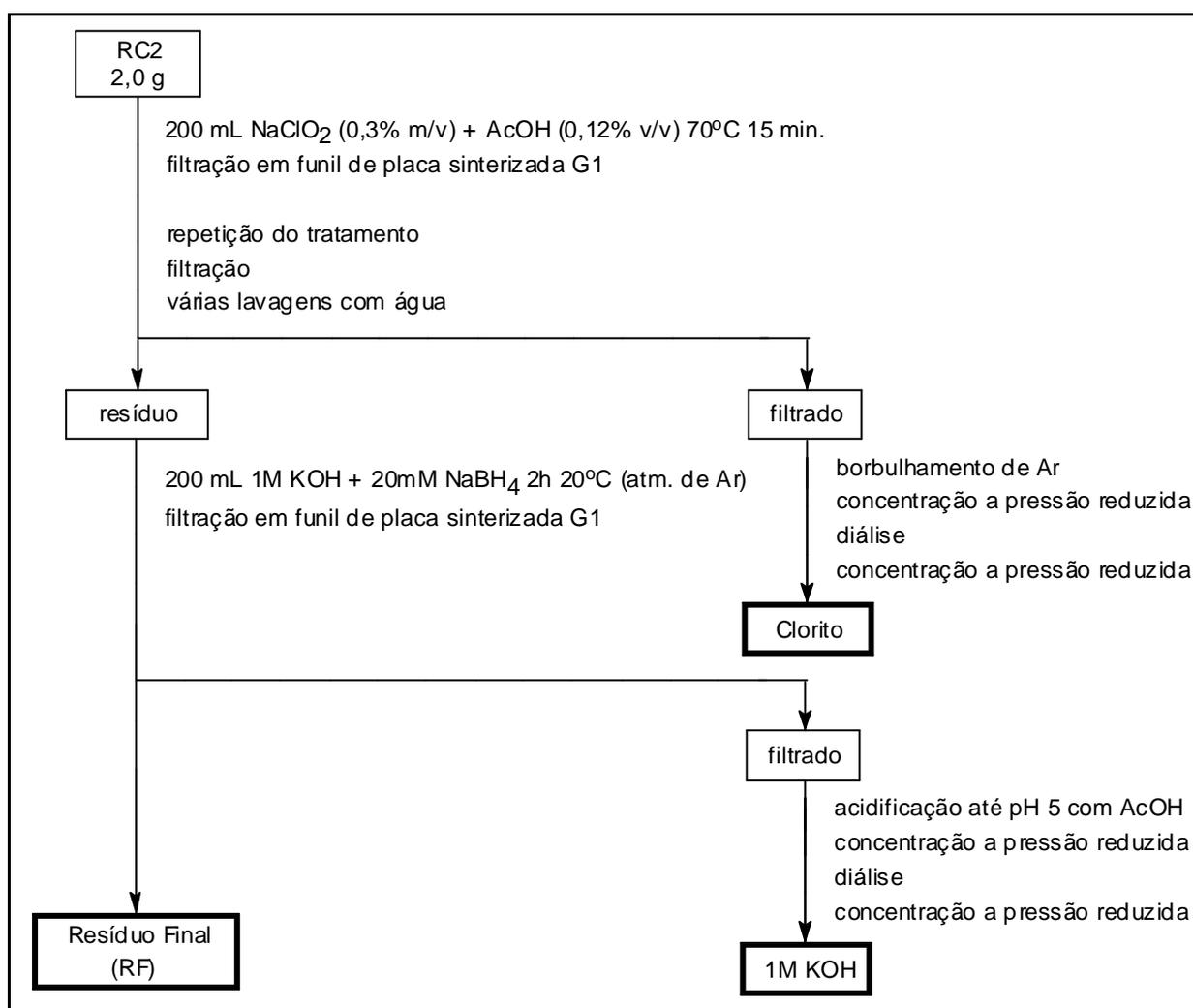
Todos os extractos recolhidos após a diálise foram concentrados e guardados a -20°C como soluções ou suspensões aquosas congeladas, sendo posteriormente utilizados para o fraccionamento dos polissacarídeos. Uma pequena porção de cada foi liofilizada para cálculo do rendimento e análise de açúcares.

### 2.5.2 - Azeitonas Processadas

O CWM da polpa das azeitonas processadas em verde e preto (15 g) foi extraído tal como descrito para a extração sequencial dos polímeros do CWM da polpa das azeitonas em fresco (ponto 2.5.1 e Esquema 2.3).

### 2.6 - Tratamento de RC2 com Clorito / Ácido Acético

O procedimento utilizado para o tratamento de RC2 com clorito / ácido acético é mostrado no Esquema 2.4.



Esquema 2.4 - Tratamento do RC2 da polpa da azeitona com clorito / ácido acético.

O RC2 da polpa das azeitonas em fresco (2,0 g) foi tratado com 200 mL de uma solução aquosa de  $\text{NaClO}_2$  (0,3%, m/v) e ácido acético (0,12%, v/v) a 70°C durante 15 min (O'Neill e - Selvendran, 1980), tendo sido borbulhado continuamente árgon no balão da reacção. O resíduo foi recolhido num funil com placa sinterizada G1 e depois foi submetido a igual tratamento de 15 min. O resíduo foi lavado abundantemente com água e depois foi extraído uma última vez com 200 mL de 1M KOH + 20mM  $\text{NaBH}_4$  a 20°C, 2h. Os dois filtrados resultantes do tratamento com o clorito foram combinados entre si e com a água de lavagem do resíduo; a solução resultante foi borbulhada com árgon até desvanecimento da cor amarela. Este extracto e o extracto alcalino foram filtrados (e este último neutralizado) tal como descrito no ponto 2.5.1. O resíduo final (RF) foi suspenso em água, neutralizado, dialisado e liofilizado.

## 2.7 - Extração do CWM com Água Quente

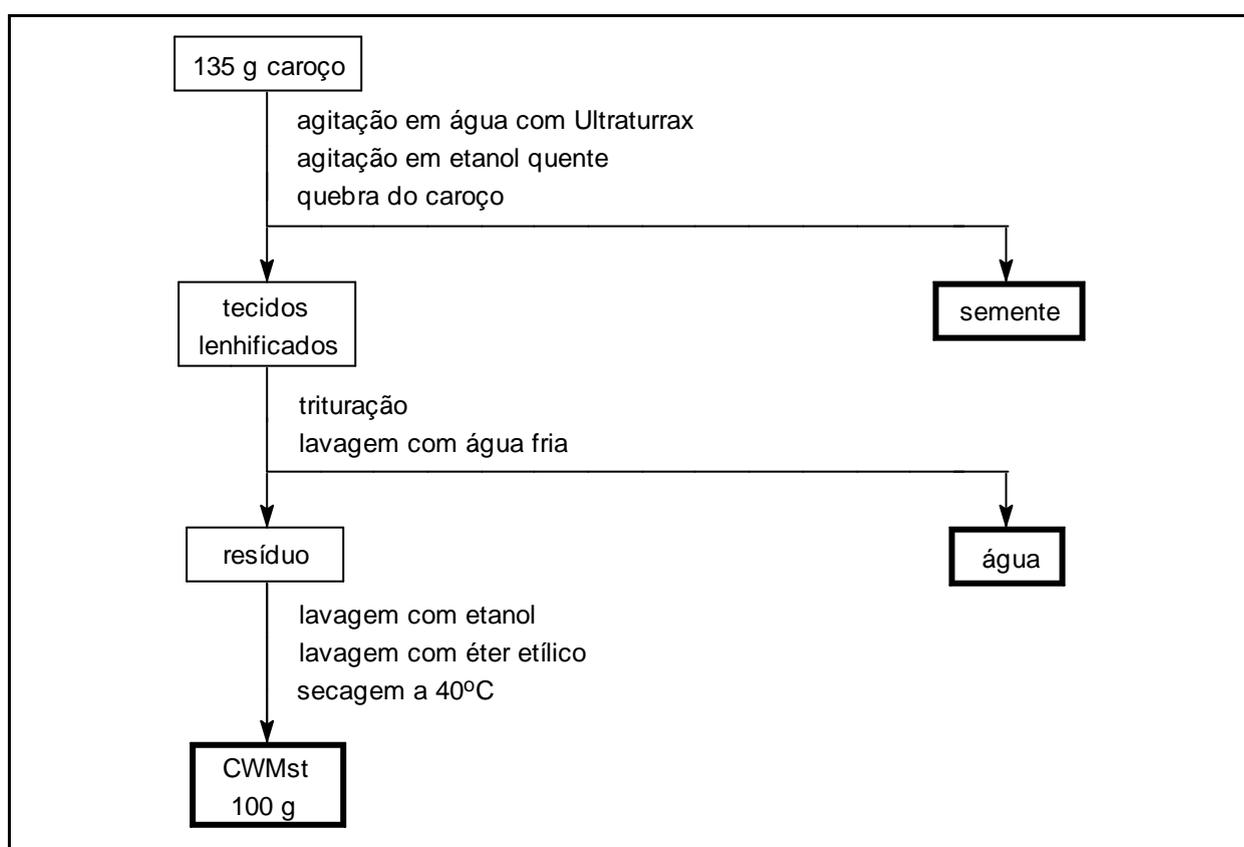
Com o objectivo de serem estudados os efeitos de degradação dos polissacarídeos pécnicos do CWM provocados pela extração com água quente e oxalato quente, foi efectuada a seguinte sequência de extracções:

O CWM (1,0 g) foi sequencialmente extraído com 100 mL de água destilada a 80°C durante 2h; a mistura foi filtrada por um funil de placa sinterizada e o resíduo foi lavado com água morna segundo o procedimento descrito por Ring e Selvendran (1981). O resíduo foi extraído com 200 mL de solução de oxalato de amónio (1%, m/v) pH 5,0 a 80°C durante 2h e filtrado como anteriormente descrito. O resíduo despectinado foi extraído com 1M KOH e 4M KOH tal como descrito para a extração de polímeros da polpa com soluções de KOH (ponto 2.5.1) deixando um resíduo rico em celulose (RC1). Todos os extractos foram concentrados (neutralizados se necessário), dialisados e guardados congelados a -20°C.

## 2.8 - Preparação dos Tecidos Lenhificados do Caroço

### 2.8.1 - Preparação do CWM (CWMst)

O procedimento de preparação dos CWM dos tecidos lenhificados do caroço da azeitona (CWMst) encontra-se resumido no Esquema 2.5.



Esquema 2.5 - Preparação do CWM dos tecidos lenhificados do caroço da azeitona.

O caroço da azeitona fresca (135g) foi lavado com água destilada a 20°C com o auxílio de um homogeneizador do tipo "Ultraturax" com o objectivo de serem removidos os tecidos de polpa ainda aderentes. O caroço foi depois tratado com etanol quente e, com a ajuda de um torno, foi partido em pedaços pequenos. A pressão no torno foi sendo gradualmente aumentada até ruptura dos tecidos duros e de maneira a que a semente pudesse ser retirada inteira. O material lenhificado foi posteriormente moído num moinho de café e depois num moinho criogénico com azoto líquido.

Devido à dureza dos tecidos lenhificados do caroço, várias moagens foram feitas no mesmo material para que fosse atingido um diâmetro de partícula menor que 50  $\mu\text{m}$ . O material moído foi lavado com água fria, etanol a 95% frio, éter etílico e seco até peso constante numa estufa a 40°C. No final foram obtidos 100 g de CWMst, 75% do material inicial do caroço da azeitona.

### 2.8.2 - Deslenhificação do CWMst

O CWMst foi tratado com DMSO absoluto durante 4 dias a fim de solubilizar algum material. O resíduo insolúvel (12 g) mostrou-se muito difícil de deslenhificar completamente, tendo sido tratado com clorito / ácido acético durante várias horas, como a seguir se descreve e se encontra esquematizado na parte superior do Esquema 2.6.

O material foi deslenhificado de acordo com o procedimento de Jermyn e Isherwood (1956). O material foi suspenso em 300 mL de água, tendo sido de seguida adicionados 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético e 3 g de clorito de sódio a 80%. O balão contendo a mistura foi colocado (no nicho) num banho de óleo a 75°C, sempre com agitação, e foi tapado com uma rolha de vidro, simplesmente pousada, para permitir a saída de gases. Ao fim de cada hora foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de AcOH e 3 g de NaClO<sub>2</sub>. Após 4h, porque o resíduo permanecia ainda amarelo e a solução se apresentava amarela pálida, a solução foi deixada reagir durante mais duas horas com adição de clorito e ácido acético ao fim de cada hora. Ao fim das duas horas, a solução amarela foi filtrada através de um funil de placa sinterizada e, como o resíduo ainda permanecia amarelo pálido, foram-lhe adicionados 150 mL de água e a reacção prosseguiu a 75°C com adições de ácido acético e clorito ao fim de cada hora. Após 3h o resíduo insolúvel apresentava-se com uma coloração amarela clara e a reacção foi interrompida.

A solução foi filtrada e lavada abundantemente com água destilada. Uma pequena quantidade do resíduo foi liofilizada para determinação do rendimento e composição em açúcares. O sobrenadante amarelo escuro e a água das lavagens foram combinadas, tendo sido borbulhado argon nesta solução durante várias horas até ao aparecimento de uma solução amarela clara. A solução foi então concentrada no evaporador rotativo a 35°C, dialisada e liofilizada. Foram obtidos 8,5g de

material deslenhificado (holocelulose), 71% do material inicialmente presente no CWMst; a fracção solubilizada pelo tratamento de deslenhificação, após diálise, originou 576mg, 4,8% do CWMst.

### 2.8.3 - Extracção Sequencial da Holocelulose

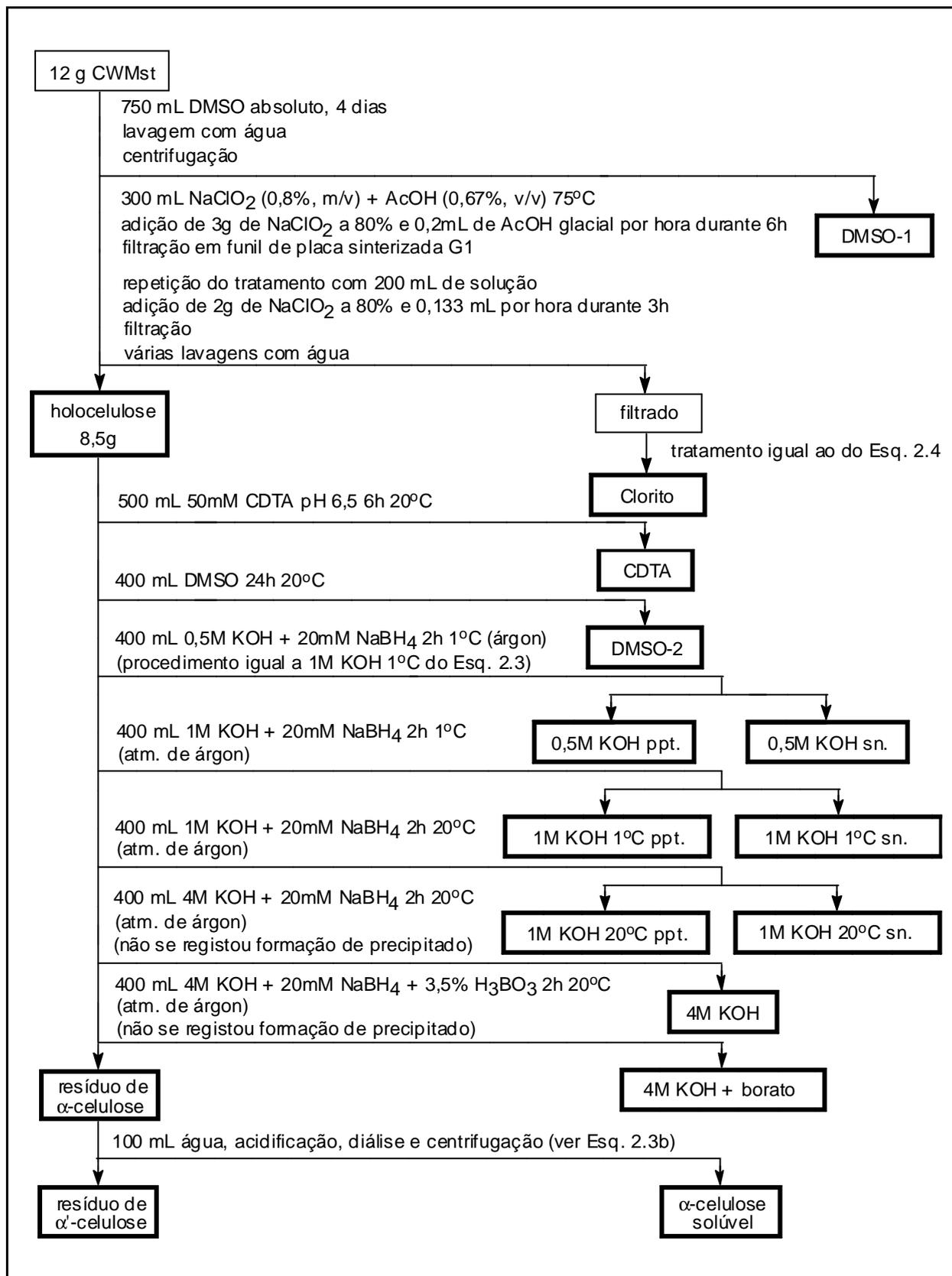
O procedimento utilizado para extracção sequencial da holocelulose encontra-se resumido no Esquema 2.6.

A holocelulose do caroço da azeitona (8,5 g) foi sequencialmente extraída com [1] 50mM CDTA, sal de sódio (500 mL), pH 6,5, 20°C, 6h; [2] DMSO (400 mL) a 20°C; [3] 0,5M KOH + 20mM NaBH<sub>4</sub> (400 mL) a 1°C, 2h; [4] 1M KOH + 20mM NaBH<sub>4</sub> (400 mL) a 1°C, 2h; [5] 4M KOH + 20mM NaBH<sub>4</sub> (400 mL) a 20°C, 2h; e [6] 4M KOH + 3,5% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 20mM NaBH<sub>4</sub> (400mL) a 20°C, 2h.

As extracções alcalinas foram efectuadas em atmosfera de argon com soluções desprovidas de oxigénio. Após cada extracção, os polímeros solubilizados foram separados do resíduo insolúvel por filtração através de um funil de placa sinterizada G1. Os extractos alcalinos foram acidificados até pH 5 e dialisados. Os precipitados formados durante a diálise foram recolhidos separadamente. O resíduo de  $\alpha$ -celulose que permanece após a última extracção (4M KOH + borato) foi suspenso em 100 mL de água e a solução foi acidificada até pH 5 e dialisada. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante foi separado do resíduo de  $\alpha'$ -celulose. Todos os extractos recolhidos após a diálise foram concentrados e liofilizados.

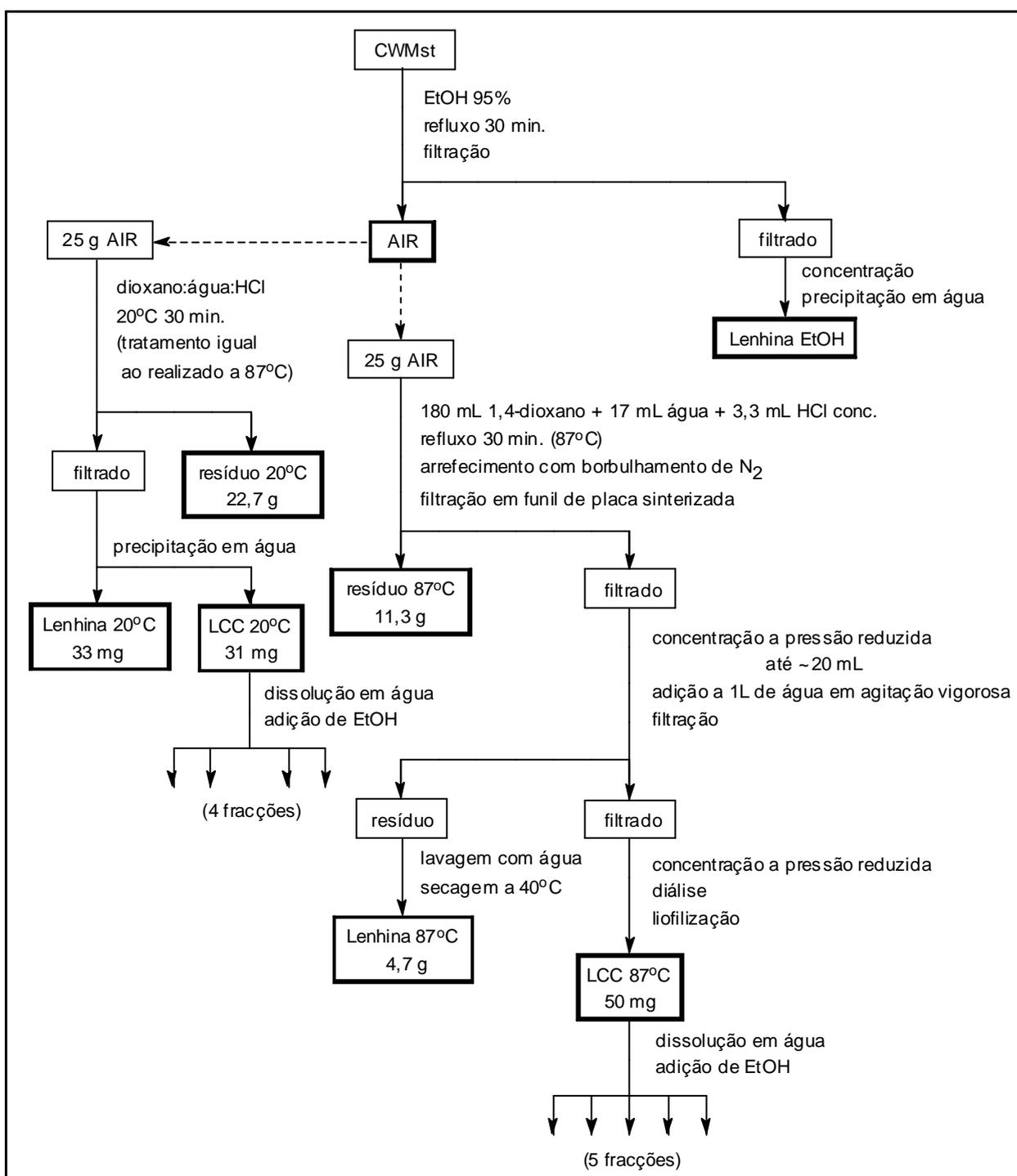
### 2.9 - Tratamento dos Tecidos Lenhificados do Caroço com 1,4-dioxano

Os tecidos lenhificados do caroço foram tratados com 1,4-dioxano a fim de que os produtos resultantes pudessem ser comparados com os obtidos por tratamento com clorito e ácido acético.



Esquema 2.6 - Deslenhificação do CWM dos tecidos lenhificados do caroço da azeitona (CWMst) e extração sequencial da holocelulose resultante.

O CWMst foi refluxado durante 30 min em 95% de etanol e a lenhina foi isolada do AIR resultante de acordo com o método descrito por Pepper (Pepper *et al.*, 1959; Pepper e Siddiqueullah, 1961a, b) (Esquema 2.7).



Esquema 2.7 - Extração de lenhina e de complexos lenhina-polissacarídeos (LCC) com 1,4-dioxano.

O AIR (25 g) foi suspenso em 180 mL de 1,4-dioxano, 17 mL de água e 3,3 mL de HCl concentrado e refluxado (87°C) 30 min. Durante o arrefecimento, foi deixada uma corrente de azoto a borbulhar na solução a fim de evitar reacções de oxidação e de condensação. A solução foi filtrada através de um funil de placa sinterizada, tendo sido recolhido um resíduo com 11,3 g de massa seca. O sobrenadante foi concentrado no evaporador rotativo a 37°C até aproximadamente 20 mL e a lenhina presente no licor foi precipitada num copo contendo 1L de água em agitação vigorosa. A lenhina, que precipitou num estado coagulado, foi recolhida num funil de placa sinterizada, foi lavada abundantemente com água e depois foi seca em estufa a 40°C, tendo originado um resíduo de 4,7 g. Uma fracção solúvel em água (50 mg) foi recolhida por concentração da solução aquosa, diálise e liofilização (LCC 87°C).

Uma tentativa de isolar a lenhina nas condições utilizadas mas à temperatura ambiente originou, a partir de 25g de AIR (Esquema 2.7), 33 mg de lenhina (lenhina 20°C), 31 mg de material solúvel em água após diálise (LCC 20°C) e um resíduo de 22,7g .

O material solúvel em etanol proveniente da preparação do AIR foi precipitado utilizando a técnica descrita para a precipitação da lenhina a 87°C. Foi obtido um resíduo, designado "lenhina EtOH".

## **2.10 - Precipitação Gradual com Etanol**

### **2.10.1 - Amostras Solúveis em Água**

As amostras a fraccionar foram dissolvidas num mínimo de água destilada originando soluções geralmente de 10 mg/ml. Caso a dissolução não fosse completa, as amostras eram centrifugadas e os resíduos recolhidos separadamente. Ao sobrenadante foi adicionado etanol absoluto em passos de 10 a 20% (Selvendran e King, 1989). Cada mistura foi colocada a 4°C durante 2h e, caso houvesse formação de precipitado, este era recolhido por centrifugação a 10 000 rpm (12 000g) a 4°C sendo o sobrenadante submetido a nova adição de etanol. Cada precipitado recolhido foi dissolvido em água e concentrado por evaporação a pressão reduzida a 35°

C, sendo adicionada água até todos os vestígios de etanol terem sido removidos. O material fraccionado foi guardado como soluções aquosas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e uma pequena fracção de cada foi liofilizada.

O fraccionamento com soluções de etanol seguido de cromatografia de troca aniónica revelou-se muito eficiente, originando percentagens elevadas de material recuperado após a eluição.

### **2.10.2 - Amostras Insolúveis em Água**

Algumas fracções, provenientes de material extraído com soluções de KOH e precipitado durante a neutralização, foram fraccionadas por solubilização em soluções de NaOH de concentração igual à com que foram extraídas. O procedimento utilizado foi igual ao descrito em 2.10.1 para o fraccionamento com etanol de polímeros solúveis em água. O material precipitado foi disperso em água e a solução ou suspensão foi acidificada até pH 5 com AcOH, sendo depois dialisada e liofilizada.

## **2.11 - Cromatografia em Coluna**

### **2.11.1 - Cromatografia de Troca Aniónica**

A maioria das fracções ricas em polissacarídeos pécticos e algumas das fracções hemicelulósicas obtidas por fraccionamento com soluções de etanol foram fraccionadas por cromatografia de troca aniónica utilizando DEAE-Trisacryl M e DEAE-Sephacel. O DEAE-Sephacel foi utilizado principalmente para as fracções contendo polissacarídeos hemicelulósicos.

### a) DEAE-Trisacryl M

Alguns dos extractos ou fracções mais significativas, a maioria previamente precipitada em etanol (ponto 2.10), foram fraccionados por cromatografia de troca aniónica com DEAE-Trisacryl M segundo o procedimento descrito por Redgwell e Selvendran (1986). As amostras foram suspensas em água (2 mg/ml) e agitadas até completa dissolução. Caso a dissolução fosse difícil a amostra era deixada a agitar durante a noite a 4°C com a ajuda de um agitador magnético; se persistisse algum resíduo, este era removido por centrifugação a 18 000 rpm (40 000g). Ao sobrenadante foi adicionada solução tampão de fosfato de potássio 500mM pH 6,5 e água até ser obtida uma solução contendo 1mg de amostra por mL em 50mM de fosfato de potássio a pH 6,5. Todas as soluções de fosfato utilizadas continham 0,3% de NaN<sub>3</sub> como fungicida. A dimensão da coluna foi calculada tendo em conta a quantidade de ácido urónico presente na amostra, a quantidade de grupos ionizados na resina ao pH a que se operava [300µE/mL a pH 6,2, assumindo-se 50% de ionização a pH 6,5 (pKa<sub>1</sub> = 6,2 e pKa<sub>2</sub> = 10,7)] e a eficiência da resina (5%). Assim, utilizou-se 1 mL de DEAE-Trisacryl M para 7,5 µmol de ácido urónico presente na amostra segundo a fórmula:

$$\text{Vol. DEAE Trisacryl M (mL)} = \frac{\mu\text{mol de Ác.Ur. na amostra}}{300 \mu\text{E/mL} \times 0,5 \times 0,05}$$

O DEAE-Trisacryl M foi primeiramente lavado com água e solução tampão fosfato 0,5M pH 6,5 de modo a ser convertido na forma de fosfato e depois foi lavado e equilibrado com tampão nas condições de operação. As fracções foram eluídas sequencialmente com tampão e tampão contendo 0,125, 0,25, 0,5 e eventualmente 1M de NaCl. O volume utilizado para a eluição com cada uma das soluções foi igual ao da solução da amostra, decorrendo a eluição a um fluxo de 10 mL/h. Foram recolhidas fracções de 3 a 6 mL dependendo da quantidade de amostra introduzida na coluna; a absorvância da solução em cada tubo foi determinada a 280nm e 20 µL foram retirados a cada tubo para determinação da quantidade relativa de açúcares pelo método de fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Dubois *et al.*, 1956), descrito em 2.15.1-a. As fracções apropriadas foram combinadas, dialisadas, concentradas e guardadas a -20°C; uma pequena parte de cada fracção foi liofilizada.

Em alguns ensaios foi utilizado um gradiente em vez do aumento descontínuo da concentração de NaCl. Nesses casos, a variação ao método descrito consistiu na utilização de um misturador de gradientes contendo solução tampão no primeiro recipiente e igual volume de solução tampão contendo 1M NaCl no segundo recipiente, num volume duas vezes superior em cada recipiente ao volume em que a amostra tinha sido introduzida. Alternativamente, o gradiente foi feito com uma bomba peristáltica de 3 canais utilizando tubos do mesmo diâmetro e dois recipientes, um contendo a solução inicial (tampão) (solução A) e o outro a solução final (tampão + 1M NaCl) (solução B) (Figura 2.3): o tubo 1 bombeou a solução A para a coluna, o tubo 2 bombeou solução A para o esgoto e o tubo 3 bombeou a solução B para o recipiente A (Kremmer e Boross, 1979; Neil Rigby, comunicação pessoal).

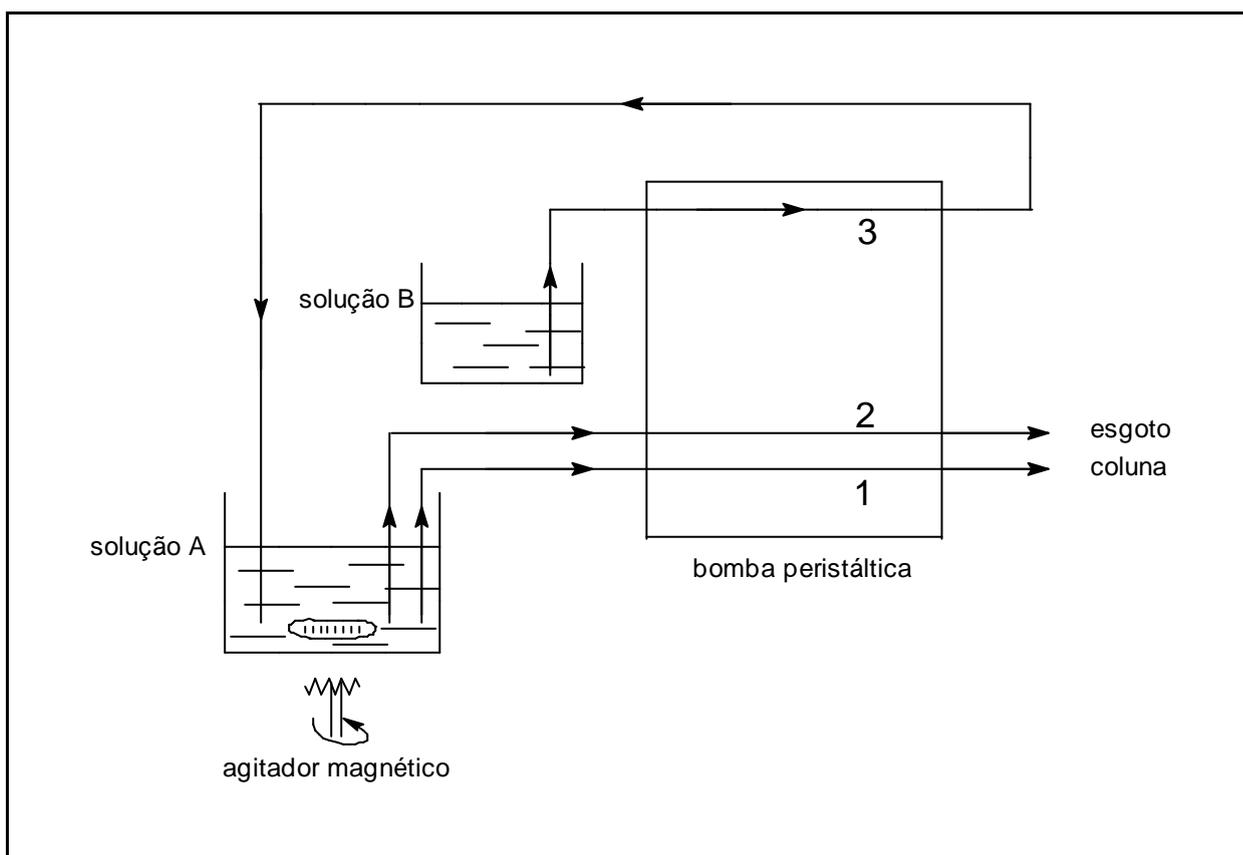


Figura 2.3 - Formação de um gradiente linear com uma bomba peristáltica de 3 canais, segundo Kremmer e Boross (1979).

## b) DEAE-Sephacel

O DEAE-Sephacel foi equilibrado com solução de tampão borato 0,5M, pH 8,0, durante 48h e depois foi lavado com solução tampão borato 30mM durante a noite. Durante o dia passou-se solução de borato 1,2M e depois novamente a solução de 30mM.

O volume da coluna utilizada foi calculado tendo em conta o número de moles de ácido urónico na amostra, o número de equivalentes da fase estacionária (109  $\mu\text{E}/\text{mL}$ ), a percentagem de grupos ionizados ao pH a que se operou (50%) e a eficiência da resina (5%). Assim, a fórmula aplicada para o cálculo de fase estacionária utilizada para cada amostra foi:

$$\text{Vol. DEAE Sephacel (mL)} = \frac{\mu\text{mol de \u00c1c.Ur. na amostra}}{109 \mu\text{E}/\text{mL} \times 0,05 \times 0,5}$$

Foram utilizadas sempre colunas com 1cm de di\u00e2metro e o fluxo foi de 15 mL/h.

As amostras (1-2 mg/mL) foram dissolvidas em \u00e1gua e agitadas at\u00e9 completa dissolu\u00e7\u00e3o. Se a dissolu\u00e7\u00e3o n\u00e3o fosse completa eram deixadas a agitar durante a noite a 1\u00b0C e depois centrifugadas a 18 000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado tamp\u00e3o borato 1,2M at\u00e9 perfazer a concentra\u00e7\u00e3o de 30mM em borato. As amostras foram elu\u00eddas com tamp\u00e3o de 30mM, com um gradiente entre 30mM e 1M segundo o procedimento descrito em a) e, por fim, com 1,2M de tamp\u00e3o borato. O material elu\u00eddo foi sendo recolhido em frac\u00e7\u00f5es de 5 mL, a quantidade de a\u00e7\u00facares e compostos fen\u00f3licos foi determinada tal como descrito em a) e as frac\u00e7\u00f5es apropriadas foram combinadas, dialisadas, concentradas e liofilizadas.

### 2.11.2 - Cromatografia de Filtra\u00e7\u00e3o em Gel

A filtra\u00e7\u00e3o em gel de Sephacryl foi utilizada para resolver complexos hemicelul\u00f3sicos (complexos xilana-xiloglucana); a filtra\u00e7\u00e3o em Bio-Gel foi utilizada para resolver oligossacar\u00eddeos obtidos por hidr\u00f3lise \u00e1cida parcial de uma glucuronoxilana.

### a) Sephacryl

O Sephacryl (S-400) foi lavado com água e depois com tampão fosfato 0,2M previamente degaseificado. A coluna (100cm x 1cm) foi equilibrada com solução tampão, primeiro a um fluxo de 60 mL/min durante 1h e, depois de ajustado o leito, a um fluxo de 20 mL/min até completa estabilização (12h). A coluna foi calibrada com dextrana azul de 2 000 kdaltons e a eluição foi seguida a 625 nm e comparada com a eluição descrita para o tipo de gel utilizado (Kremmer e Boross, 1979). Os perfis de eluição de dextransas de massa molecular definida (2 000, 487, 266 e 72 kdaltons) foram determinados, as amostras foram recolhidas em fracções de 2 mL e a presença de açúcares foi detectada pelo método do fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ponto 2.1.15-a).

As amostras foram dissolvidas num mínimo de tampão contendo 0,2M em NaCl e foram introduzidas na coluna o mais próximo possível do topo com a ajuda de uma seringa de 1 mL ou, alternativamente, introduzindo a amostra com a ajuda da bomba peristáltica deixando uma bolha de ar antes e depois da amostra entrar no tubo, para evitar efeitos de dispersão até à entrada na coluna.

### b) Bio-Gel

Uma coluna com Bio-Gel P-4 foi utilizada para a separação de vários oligómeros de uma glucuronoxilana obtidos por hidrólise ácida parcial com TFA, cujo procedimento se encontra descrito em 2.13. O Bio-Gel foi hidratado durante 4h à temperatura ambiente em ácido fórmico 0,1M (pH 3,6) e depois foi empacotado numa coluna de 100 cm x 1.6 cm termostaticada a 55°C. A coluna foi lavada com dois volumes de eluente a um fluxo de 10 mL/h. A amostra foi colocada com uma seringa o mais próximo possível do topo da coluna. Foram recolhidas fracções de 1mL sendo utilizada detecção por índice de refração. Foram recolhidas 17 fracções representando oligómeros com grau de polimerização até 17 resíduos.

As fracções de grau de polimerização 7, 10, 14 e 17 foram posteriormente analisadas por metilação (ponto 2.17).

## 2.12 - Fracionamento de Glucuronoxilanas

### 2.12.1 - Utilização de Soluções de Cu (II)

As soluções de Cu (II) têm sido muito utilizadas na purificação de glucuronoxilanas, sendo os precipitados obtidos facilmente removíveis por centrifugação e purificados por acidificação em soluções alcoólicas.

A precipitação com soluções de cobre (II) foi utilizada na purificação de xilanas insolúveis em água extraídas com 1M KOH a 1°C do CWM da polpa de azeitonas frescas e processadas por adaptação do procedimento descrito por Ring e Selvendran (1978).

O material da polpa da azeitona em fresco (330 mg) foi disperso em 1M NaOH e o resíduo insolúvel (23 mg) foi removido por centrifugação. Ao sobrenadante (65 mL) foram adicionados 10mL de solução de acetato de cobre a 7% (m/v) tendo-se deixado a agitar durante 3h à temperatura ambiente. O precipitado azul formado foi recolhido por centrifugação e lavado com água destilada; foi depois dissolvido em 50 mL de solução de 5% HCl em EtOH, surgindo uma solução amarela. Por adição de água (70 mL) formou-se um precipitado branco que foi recolhido por centrifugação, neutralizado e liofilizado (145 mg, 44% do material inicial).

O procedimento foi semelhante para a azeitona processada em verde e preto, tendo-se verificado a total dissolução das amostras em 1M NaOH ao contrário do que se verificou com a azeitona em fresco. Para as azeitona verde obtiveram-se 180 mg a partir de 300 mg (60%); para a preta, 215 mg a partir de 400 mg (54%).

### 2.12.2 - Variação do pH

As fracções obtidas por precipitação com soluções de Cu (II) e a fracção insolúvel em água extraída com 1M KOH a 1°C do CWMst (caroço) foram submetidas a fracionamento por variação do pH das respectivas soluções.

As amostras foram dissolvidas em 1M NaOH (10-15 mg/mL). No caso da dissolução não ter sido completa o material em suspensão era recolhido por centrifugação a 10 000 rpm, neutralizado

com AcOH, dialisado e liofilizado. O pH do sobrenadante foi baixado por adição gradual de HCl 4M e depois HCl 1M. Os precipitados obtidos foram recolhidos por centrifugação, neutralizados, dialisados e liofilizados. A adição de HCl ao sobrenadante após a remoção do precipitado foi continuada até pH 4-3. No final, o sobrenadante resultante foi concentrado, dialisado e liofilizado.

### 2.13 - Hidrólise Ácida Parcial da Glucuronoxilana

Em experiências preliminares, a xilana acídica da fracção Hp25 (hemicelulose A do extracto de 0,5M KOH do CWMst, obtida por precipitação em 25% de etanol) - ponto 6.4.4 foi ensaiada quanto às condições ideais de hidrólise da amostra com TFA para obtenção de oligossacarídeos com grau de polimerização de aproximadamente 10 resíduos. Foram testados 5 tempos de hidrólise (15, 30, 45, 60 e 90 min) e 4 concentrações do ácido (20, 50, 100 e 200mM), a 100°C, seguido de análise por TLC.

Na cromatografia de camada fina dos oligossacarídeos foram utilizadas placas de sílica Analtech e como eluente BuOH:HCOOH:H<sub>2</sub>O (33:50:17, v/v/v). A revelação foi feita por pulverização com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 50% e aquecimento a 100°C durante 3 min, sendo a migração das amostras comparada com uma amostra conhecida.

Com base nos resultados obtidos para as condições ideais para a hidrólise parcial e com o objectivo de serem obtidas grandes quantidades de oligossacarídeos, foram hidrolisados 30 mg em 1mL de TFA 50mM, a 100°C, durante 45 min. O resíduo (5 mg) foi removido por centrifugação e o ácido que se encontrava no sobrenadante foi co-evaporado com água sob pressão reduzida a 35°C.

Os oligossacarídeos obtidos foram fraccionados segundo o tamanho por cromatografia de filtração em gel (ponto 2.11.2-b).

## 2.14 - Tratamento de Complexos Xilana-Xiloglucana com Xilanase

A xilanase [(1→4)-β-D-xilana xilana-hidrolase, EC 3.2.1.8] é uma enzima que catalisa a *endo*-despolimerização de (1→4)-β-D-xilanas e de D-xilanas parcialmente substituídas como as -glucuronoxilanas. Neste trabalho, a xilanase foi utilizada como meio de despolimerização de complexos xilana-xiloglucana clivando as regiões ricas em resíduos de (1→4)-β-D-Xylp.

A xilanase utilizada era de origem comercial: "Bioxylanase", uma preparação de culturas de *Trichoderma viride*. A enzima utilizada foi purificada no laboratório do Grupo de Paredes Celulares do Institute of Food Research por Neil Rigby segundo o método descrito por Gibson e McCleary (1987) com um passo de purificação suplementar por Sephacryl S-200. A xilanase purificada não apresentava actividade de celulose nem nenhuma outra actividade de glucanase (N.Rigby e R.R.Selvendran, resultados não publicados).

A 2-3 mg de amostra dissolvida em 1mL de solução tampão de acetato de sódio 25mM, pH 5,0, foram adicionadas 40 U de xilanase (10 μL) deixando-se reagir em tubo fechado durante 20 h a 20°C. A enzima foi inactivada por aquecimento a 90°C durante 10 min. A solução foi transferida para um tubo "eppendorf" e a proteína precipitada foi removida por centrifugação a 12 000 rpm durante 10 min. O sobrenadante resultante foi introduzido na coluna de Sephacryl S-400 e eluído tal como descrito em 2.11.2-a.

## 2.15 - Determinação de Açúcares

### 2.15.1 - Método Colorimétrico Utilizando Fenol/Ácido Sulfúrico

#### a) Adaptação do Método às Fracções da Cromatografia em Coluna

O método proposto por Dubois *et al.* (1951 e 1956) foi adaptado à determinação da quantidade relativa de açúcares nas diversas fracções obtidas por cromatografia em coluna.

A cada tubo de ensaio, previamente lavado com ácido, foi adicionado 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 80 µL de solução aquosa de fenol a 5% e 20 µL de amostra. A solução foi agitada e aquecida durante 5 min em banho de água fervente e deixada arrefecer. A absorvância foi lida a 490 nm num espectrofotómetro leitor de placas. Alternativamente, os volumes de cada solução foram adicionados a dobrar e as amostras foram lidas através de uma célula de 1 mL de capacidade com 1 cm de percurso óptico.

### **b) Amostras Ricas em Compostos Fenólicos**

Nas amostras muito ricas em compostos fenólicos, como por exemplo o material rico em lenhina obtido em 2.9, os açúcares foram determinados com fenol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para evitar a contaminação da coluna de GC com estes compostos.

Cada amostra (5 mg) foi previamente submetida a uma hidrólise de Saeman (3h à temperatura ambiente, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%, seguido de 2,5h a 100°C em 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, volume final 2,4 mL).

A 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado foi adicionado 1 mL de fenol 5% e 100 µL de solução de hidrolisado; como padrões foram utilizadas soluções de D-glucose. O procedimento para obtenção de cor foi semelhante ao descrito na alínea anterior sendo a quantidade de açúcares totais em cada amostra calculada por intrapolação gráfica.

### **2.15.2 - Método Colorimétrico para Determinação de Ácido Urónico**

A quantificação do ácido urónico foi feita por adaptação segundo Selvendran *et al.* (1979 e 1989) do método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), em que se utiliza 3-fenilfenol e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

As amostras (2-5 mg) foram previamente hidrolisadas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% durante 3h e depois 1h a 100°C em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, tal como descrito para a determinação dos açúcares neutros em 2.16. Uma alíquota de hidrolisado (1 mL ou 0,5 mL) foi diluída 5 vezes e filtrada por filtro de fibra de

vidro GF/C. Em amostras ricas em ácido urónico, como as dos extractos de CDTA e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ricos em pectinas, a diluição utilizada foi de 10 ou 20 vezes.

Em tubos de ensaio de 16 cm de altura previamente lavados com ácido foram colocados 3 mL de solução de 50mM de ácido bórico em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, 3 tubos para cada amostra, que foram arrefecidos em água gelada. Em triplicado, foram adicionados 0.5 mL de solução de amostra e, após agitação, os tubos foram aquecidos em banho de água fervente durante 10 min. Após o arrefecimento, a 2 de cada 3 tubos contendo a mesma amostra, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de 3-fenilfenol (0,15% em 0,5% NaOH), sendo deixados na ausência de luz durante 30 min para desenvolvimento de cor.

A absorvância foi determinada a 520 nm, tendo as soluções sido lidas contra o ar. O valor da absorvância para cada amostra foi dado pela média dos valores dos dois tubos contendo 3-fenilfenol, subtraída ao valor registado para o tubo em branco.

A acompanhar as amostras foram sempre feitos padrões de ácido galacturónico (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sendo a quantidade de ácido urónico na amostra determinada por intrapolação gráfica, com - correlação linear entre 0 e 40  $\mu\text{g}$ .

A solução de 3-fenilfenol é estável durante 1 mês se for mantida no escuro e a 4°C.

## 2.16 - Acetatos de Alditol

Os acetatos de alditol provenientes dos açúcares neutros foram determinados segundo dois procedimentos diferentes. Foi utilizada uma adaptação do método de Selvendran *et al.* (1979) na análise dos açúcares resultantes dos ensaios preliminares com AIR, AIR/PAW e CWM e na preparação do CWM das azeitonas em fresco e respectivo fraccionamento até à obtenção do resíduo rico em celulose (CR2); no restante trabalho adoptou-se o método descrito por Blakeney *et al.* (1983) e Harris *et al.* (1988). Com este segundo método foram obtidos valores semelhantes para os acetatos de alditol existentes nas diversas fracções analisadas, sendo no entanto muito mais rápido por não envolver filtrações nem ser necessária a remoção do borato formado.

Os acetatos de alditol foram analisados por cromatografia de gases num cromatógrafo Carlo Erba GC 6000 Vega Series equipado com injector "split/splitless". Foi utilizada uma coluna capilar Restek de fase ligada Rt<sub>x</sub>-225, de 15 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura de filme. A fase estacionária utilizada é semelhante à OV-225, sendo constituída por 50% de cianopropilo e 50% de dimetilpoli-silano. Com o injector a 210°C e o detector a 220°C utilizou-se o seguinte programa de temperaturas com tempo de "splitless" de 1 min: 1 min a 90°C; subida até 150°C a 45°C/min; 1 min a 150°C; subida até 210°C a 2°C/min e 1 min a 210°C. O gás de transporte foi He com uma pressão de 60 kPa, sendo utilizado na chama do detector ar e H<sub>2</sub> à pressão de 120 e 55 kPa, respectivamente.

### 2.16.1 - Adaptação do Método de Selvendran *et al.* (1979)

A 5 mg de amostra adicionou-se 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% tendo-se deixado reagir 3h à T.amb. com agitação ocasional. Ao fim das 3h diluiu-se com 5mL de água destilada perfazendo uma concentração final de 1M em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após homogeneização, deixou-se reagir a 100°C durante 2,5h. Ao fim de 1h de hidrólise foi retirado 1mL para determinação da quantidade de ácido urónico presente na amostra (ver ponto 2.15.2).

O tubo foi arrefecido e 200 µL de solução de 2-desoxiglucose (1 mg/mL) foram adicionados como padrão interno. O conteúdo de cada tubo foi neutralizado até pH 6-7 com uma solução saturada de Ba(OH)<sub>2</sub> (0,25M). O precipitado branco de BaSO<sub>4</sub> foi removido por filtração por funil de pregas com papel de filtro para precipitados finos (Whatman N<sup>o</sup>42), tendo sido colocados dois filtros por o precipitado ser bastante fino. A amostra foi concentrada no evaporador rotativo a 35°C e depois transferida com 1mL de água para um tubo de ensaio onde foi adicionado NaBH<sub>4</sub> (25mg). A solução foi deixada reagir 3-4h à temperatura ambiente e no final o excesso de NaBH<sub>4</sub> foi destruído com 5 mL de Dowex 50W-X8 (20-50 mesh), tendo sido deixado reagir durante 45 min e o Dowex foi removido por filtração. A solução foi concentrada até à secura no evaporador rotativo (35°C) e os ésteres de ácido bórico foram removidos por adições sucessivas (4 vezes) de metanol seco em "molecular sieves 3A".

A acetilação foi feita com 0,1 mL de piridina saturada com KOH e igual volume de anidrido acético. O tubo foi selado e aquecido a 120°C durante 20 min. Após o arrefecimento, o anidrido acético e a piridina foram co-evaporados (35°C) por adições sucessivas de 0,5 mL de tolueno (4 vezes) e os acetatos de alditol resultantes foram ressuspensos em 100 µL de acetona ou diclorometano e guardados a 20°C em ambiente anidro até terem sido analisados por GC.

### 2.16.2 - Adaptação do Método de Blakeney *et al.* (1983)

A 2-3 mg de amostra foram adicionados 200 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%, tendo-se deixado reagir durante 3h com agitação ocasional. Ao fim das 3h a amostra foi diluída com 2,2 mL, rolhada, agitada e o tubo incubado a 100°C durante 2,5h. Após 1h foram retirados 0,5 mL para determinação de ácido urónico (ponto 2.15.2). O tubo foi arrefecido e 200 µL de solução de 2-desoxiglucose (1 mg/mL) foram adicionados como padrão interno.

A 1mL do hidrolisado foram adicionados 0,2 mL de NH<sub>3</sub> a 25% para neutralização do ácido e 0,1 mL de solução de 15% NaBH<sub>4</sub> em NH<sub>3</sub> 3M (esta última solução preparada na hora) para redução dos açúcares a alditóis; a solução foi agitada e incubada a 30°C 30 min. O tubo foi arrefecido em banho de gelo e o NaBH<sub>4</sub> em excesso foi eliminado com duas adições de 50 µL de AcOH. A 0,3 mL de solução arrefecida em gelo foram adicionados 0,45 mL de 1-metilimidazole e 3 mL de anidrido acético, tendo-se deixado reagir a 30°C durante 30 min.

O anidrido acético em excesso foi destruído com água (4,5 mL) e os acetatos de alditol foram extraídos com 3 mL de diclorometano. Após agitação e centrifugação a 1 000 rpm durante 1 min para separação de fases, a camada aquosa foi aspirada. À camada orgânica foram adicionados mais 2 mL de diclorometano, e foi lavada 3 vezes com 3 mL de água, com o objectivo de remover completamente o 1-metilimidazole (Hoebler *et al.*, 1989). A camada orgânica final foi transferida para um tubo de ensaio limpo, tendo sido evaporada com uma corrente de árgon a 30°C. Qualquer resíduo de água ainda existente foi eliminado por co-evaporação com acetona. No final a amostra foi ressuspensa em 70 µL de acetona ou diclorometano e guardada a -20°C em ambiente anidro até ter sido analisada por GC.

## 2.17 - Análise por Metilação

Durante a fase inicial do trabalho (análise da polpa da azeitona fresca e processada), os polissacarídeos foram metilados pelo método de Hakomori (1964) segundo Lindberg (1972) tal como descrito por Ring e Selvendran (1978) e Waldron e Selvendran (1990a); numa fase mais adiantada do trabalho (metilação directa do CWM e AIR e análise dos polímeros dos tecidos lenhificados do caroço e polímeros da polpa da azeitona fresca resultantes das fracções de SDS 0,5% e 1M KOH sobrenadante) optou-se pela adaptação da técnica de Ciucanu e Kerek (1984), Harris *et al.* (1984) e Isogai *et al.* (1985) por ser um método muito mais rápido de preparação dos acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA).

Os PMAA foram analisados por GC num cromatógrafo Carlo Erba HRGC 5160 Mega Series equipado com um injector "cold on column" com 5 segundos de rearrefecimento após a injeção. Utilizou-se uma coluna capilar Restek de fase ligada Rt<sub>x</sub>-225 de 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de espessura de filme, equipada com uma coluna de protecção com percurso de retenção de 1 m. Com o injector a 210°C e o detector a 220°C utilizou-se o seguinte programa de temperaturas: 1 min a 55°C; subida até 140°C a 45°C/min; 1 min a 140°C; subida até 218°C a 2,5°C/min e 37 min a 218°C. Como gás de transporte utilizou-se He à pressão de 95 kPa, sendo utilizado na chama do detector ar e H<sub>2</sub> à pressão de 130 e 80 kPa, respectivamente.

As fracções obtidas por extracção com SDS e CDTA ou com clorito do CWMst (caroço) foram primeiro desesterificadas segundo o procedimento de Aspinall *et al.* (1970): as amostras foram dispersas em 0,1M NaOH + 20mM NaBH<sub>4</sub> com agitação durante 3h a 1°C, neutralizadas, dialisadas e liofilizadas.

A análise dos PMAA por GC/MS utilizou uma coluna capilar semelhante à descrita para a análise por GC, num GC/MS HP 5890 series 2, Trio-1S VG mass-lab, com "scans" de 400-35 m/e/s e 70 eV de energia de ionização. Foi utilizado um injector "split/ splitless" operando em "splitless". As condições de operação foram semelhantes às da análise dos PMAA por GC (ponto 2.16), com o seguinte programa de temperaturas: 2 min a 55°C; subida até 140°C a 45°C/min; 2 min a 140°C; subida até 210°C a 2°C/min e 40 min a 210°C. Foi utilizada detecção por ionização de chama,

sendo as quantidades relativas de cada derivado corrigidas por aplicação dos factores propostos por Sweet *et al.* (1975).

### 2.17.1 - Adaptação do Método de Hakomori (1964)

O método de metilação de polissacarídeos proposto por Hakomori baseia-se na dissolução da amostra em DMSO, activação do polissacarídeo por tratamento com o carbanião metil-sulfinilo [anião resultante da reacção do DMSO com NaH ( $\text{CH}_3\text{SOCH}_2^-$ )], e metilação com  $\text{CH}_3\text{I}$ .

#### a) Preparação do Anião

O anião  $\text{CH}_3\text{SOCH}_2^-$  foi preparado de acordo com o método descrito por Jansson *et al.* (1976).

Pesaram-se 2,9 g de NaH (dispersão em óleo a 80%) para dentro de um balão bem seco de 250 mL, de fundo redondo de 3 tubuladuras. As tubuladuras foram fechadas com septos de borracha com capacidade para poderem ser perfurados por agulhas de seringa.

Com o objectivo de remover o óleo, fez-se entrar árgon por uma das tubuladuras e pela outra introduziu-se, com uma seringa, *n*-pentano em porções de 20 mL. A solução foi agitada durante alguns minutos, deixada sedimentar, e o *n*-pentano foi removido com uma segunda seringa para um recipiente contendo 50% de etanol. Esta operação foi repetida 4 vezes e no final o resíduo foi seco com uma corrente de árgon. Ao pó cinzento resultante (NaH), foram adicionados, com uma terceira seringa, 25 mL de DMSO seco com "molecular sieves 3A". Com agitação constante e em atmosfera de árgon, a mistura foi deixada a reagir em banho de parafina a 60°C durante 4 a 6h. O anião preparado foi colocado com uma seringa em tubos SVL previamente climatizados com árgon, tendo sido guardados em ambiente anidro a -20°C até terem sido utilizados.

A força do anião foi determinada por titulação de 1 mL da solução contendo o anião com metanol e utilizando trifenilmetano como indicador (Price e Whiting, 1963). A força do anião foi considerada satisfatória se a solução passasse de vermelha a branca com 80-100 µL de metanol.

### **b) Formação de Alcóxidos e Reacção de Metilação**

A amostra (5 mg) foi pesada para um tubo SVL e deixada durante a noite em vazio a 40°C na presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Adicionou-se 1mL de DMSO seco e o tubo foi fechado com um septo de borracha na presença de árgon; a dissolução da amostra foi auxiliada por sonicação em banho de ultra-sons. A solução contendo o anião CH<sub>3</sub>SOCH<sub>2</sub><sup>-</sup> (1 mL) foi adicionada com uma seringa hipodérmica; a mistura foi sonicada 10 min. e colocada num excicador durante a noite para que ocorresse a formação de alcóxidos. Para a reacção de metilação, a solução foi arrefecida em banho de gelo e CH<sub>3</sub>I frio (1 mL) foi adicionado lentamente com uma seringa hipodérmica. A solução foi deixada aquecer até à temperatura ambiente tendo permanecido 3h no banho de ultra-sons com agitação ocasional.

A amostra foi dissolvida por adição de igual volume (3 mL) de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1 v/v) e a solução obtida foi seguidamente dialisada contra uma solução de 50% EtOH (3 vezes) em membranas de diálise Visking, tamanho 2, Medicell International. As amostras metiladas foram concentradas por evaporação a pressão reduzida e transferidas para tubos SVL para posterior hidrólise ou redução dos resíduos de ácido urónico (2.17.3).

Em amostras pouco solúveis em DMSO foi utilizado o dobro do volume (2 mL) e, conseqüentemente, todos os restantes reagentes utilizados na metilação foram adicionados a dobrar.

### **c) Hidrólise, Redução e Acetilação**

O material metilado foi hidrolisado em 2 passos tal como descrito por Lindberg (1972). Como os polissacarídeos metilados são pouco solúveis em soluções aquosas, foi feito um primeiro passo de formilação com 1 mL de ácido fórmico a 90% durante 2h a 100°C, evaporação do ácido no evaporador rotativo a 40°C e hidrólise com 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25M durante 12h a 100°C.

O procedimento de neutralização e acetilação dos açúcares parcialmente metilados foi baseado na técnica descrita por Selvendran *et al.* (1979) (ver ponto 2.16.1). O H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi neutralizado com Ba(OH)<sub>2</sub> e o precipitado foi separado por filtração com filtros em fibra de vidro GF/C. A solução foi concentrada até 1 mL, foi adicionado NaBD<sub>4</sub> (200 mg) e a amostra foi deixada

reagir 3h à temperatura ambiente. O excesso de  $\text{NaBD}_4$  foi destruído com Dowex  $\text{H}^+$  durante 30 min e a solução contendo os alditóis deuterados foi recolhida por filtração e concentrada até à secura. O borato foi removido na forma de ésteres de ácido bórico por adição de metanol ao resíduo seco e a acetilação deu-se por adição de 0,1 mL de piridina seca com KOH e 0,1 mL de anidrido acético, numa reacção de 20 min a  $120^\circ\text{C}$ .

O anidrido acético foi co-evaporado com tolueno e os PMAA foram dissolvidos em 2,5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e lavados com 5 mL de água por 3 vezes. A camada orgânica foi transferida para um tubo seco e evaporada a  $30^\circ\text{C}$  em corrente de árgon. Os PMAA foram finalmente dissolvidos em 70  $\mu\text{L}$  de acetona e guardados em ambiente anidro a  $-20^\circ\text{C}$  até análise por GC para quantificação de cada derivado e GC/MS para a sua correcta identificação.

### 2.17.2 - Adaptação do Método de Ciucanu e Kerek (1984)

O método de metilação de polissacarídeos proposto por Ciucanu e Kerek (1984) baseia-se na dissolução da amostra em DMSO, activação do polissacarídeo por tratamento com NaOH (s) e metilação com  $\text{CH}_3\text{I}$ . Este método proporciona curtos tempos de reacção, altos rendimentos e cromatogramas mais limpos do que quando se utiliza o método de Hakomori. Recentemente, foi notado que, para alditóis oligoglicosílicos, nas condições de reacção utilizadas, poderão ser formadas por oxidação pequenas quantidades de derivados anómalos, no entanto, a facilidade da reacção de metilação proporcionada por este método supera, na maior parte dos casos, este inconveniente (York *et al.*, 1990a).

### a) Reacção de Metilação

As amostras (2-3 mg) foram dispersas em 2 mL de DMSO (seco com "molecular sieves 3A") e sonicadas ocasionalmente até dissolução completa. Em atmosfera de árgon, algumas palhetas de NaOH foram trituradas (em almofariz ou com moínho de café) até formarem um pó fino e 100 mg foram adicionados à solução. As amostras foram deixadas reagir durante 3h, tendo sido colocadas num banho de ultra-sons durante os primeiros 90 min e deixadas a repousar nos restantes 90. A solução foi arrefecida em banho de gelo e 1 mL de CH<sub>3</sub>I foi adicionado e deixado reagir durante 1h, com sonicação nos primeiros 30 min. As amostras foram dissolvidas em CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1 v/v) (3 mL) e depois dialisadas contra uma solução de 50% EtOH (3 vezes); no final foram concentradas até à secura tal como descrito em 2.17.1-b.

### b) Hidrólise, Redução e Acetilação

Para a hidrólise do material metilado utilizaram-se 0,3 mL de TFA a 121°C durante 1h, sendo o ácido no final removido por evaporação a 35°C (Albersheim *et al.*, 1967; Harris *et al.*, 1984).

Os resíduos parcialmente metilados foram reduzidos e acetilados por adaptação do método de preparação de acetatos de alditol descrito no ponto 2.16.2. A amostra hidrolisada foi suspensa em 0,3 mL de NH<sub>3</sub> 2M e 20 mg de NaBD<sub>4</sub> foram adicionados. A mistura foi deixada reagir durante 1h a 30°C e no final o excesso de NaBD<sub>4</sub> foi destruído por adição de 0,1 mL de AcOH. A acetilação foi feita (sem remoção do borato) por adição de 0,45 mL de 1-metilimidazole e 3 mL de anidrido acético (30 min a 30°C), adição de 4 mL de água e 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lavagem 3 vezes da camada orgânica com água.

#### 2.17.3 - Redução de Grupos Carboxílicos

A redução de resíduos de ácido urónico foi sempre efectuada em amostras previamente metiladas (pontos 2.17.1.b e 2.17.2.a) por adaptação dos métodos descritos por Lindberg e Lönngren (1978) e Redgwell e Selvendran (1986).

Os tubos SVL contendo as amostras metiladas foram secos sob vácuo na presença de  $P_2O_5$ . A cada um foi adicionado, em atmosfera de árgon, 20 mg de  $LiAlD_4$  e 1 mL de tetra-hidrofurano seco com "molecular sieves 3A". O tubo foi selado e deixado reagir a  $65^\circ C$  durante 4h. O excesso de  $LiAlD_4$  foi destruído com 2 a 3 gotas de etanol e depois 2 a 3 gotas de água. A solução foi neutralizada por adição de  $H_3PO_3$  2M; o pH foi medido colocando uma pequena quantidade de material numa tira de papel indicador universal e adicionando uma gota de água. À solução foi adicionado  $CHCl_3/MeOH$  (2:1 v/v) (2 mL) e o precipitado foi removido por centrifugação e lavado duas vezes com 2 mL da mesma solução de  $CHCl_3/MeOH$ . O sobrenadante foi concentrado no evaporador rotativo e transferido para um tubo SVL para se proceder à hidrólise, redução e acetilação tal como descrita no ponto 2.17.1-c ou 2.17.2-b.

## 2.18 - Quantificação de Hidroxiprolina

Algumas amostras em que era provável a ocorrência de hidroxiprolina (Hyp) foram tratadas com HCl 6M a  $110^\circ C$  durante 24h em tubos selados e a Hyp libertada foi quantificada pelo método de Kivirikko e Liesmaa tal como descrito por Fry (1988).

A 400  $\mu L$  de amostra arrefecida em água gelada contendo entre 0,1 e 3  $\mu g$  de Hyp foram adicionados 400  $\mu L$  de solução de bromo em 1,25M NaOH também arrefecida. A mistura, depois de agitada, foi deixada a  $0^\circ C$  durante 5 min e, com a solução ainda no gelo, foram adicionados 20  $\mu L$  de solução aquosa de  $Na_2SO_3$  a 16%. Agitou-se e adicionou-se 400  $\mu L$  de solução a 5% de *p*-dimetilaminobenzaldeído em 1-propanol e após nova homogeneização foram adicionados 200  $\mu L$  de HCl 6M, incubando-se em banho de água a  $95^\circ C$  durante 2,5 min e depois em banho de água a  $20^\circ C$  durante 10min. A absorvância de cada solução foi determinada a 560 nm e a concentração da amostra em Hyp determinada por intrapolação gráfica utilizando como padrão soluções de *cis*-4-L-Hyp entre 0 e 3  $\mu g$ /tubo.

### 2.19 - Análise da Proteína Total

O conteúdo total em azoto no AIR, AIR/PAW e CWM da polpa das azeitonas em fresco foi determinado utilizando um analisador automático de azoto. A proteína foi estimada por multiplicação dos valores obtidos por 6,25.

### 2.20 - Espectroscopia de RMN

Foram analisadas por RMN de  $^{13}\text{C}$  as fracções NC1 e NC2 provenientes do extracto de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1°C, da polpa da azeitona fresca, e as glucuronoxilanas da polpa da azeitona fresca e dos tecidos lenhificados do caroço.

Os espectros (100,4 MHz) foram obtidos em condições de desacoplamento de prótons de banda larga, em soluções de  $\text{DMSO}-d_6$  a 27°C para as glucuronoxilanas, e em solução de água deuterada a 40°C para as pectinas, de acordo com Ryden *et al.*, (1989).

### 2.21 - Espectros de Absorção da Lenhina no Ultra-Violeta

A avaliação da extensão da degradação da lenhina tratada com clorito/ácido acético foi determinada por comparação dos espectros de absorção no ultra-violeta destas amostras com os de lenhinas extraídas por outros métodos (dioxano : HCl e fracção solúvel em etanol - ponto 2.9).

Os espectros foram determinados num espectrofotómetro de feixe duplo em células de quartzo de 1 cm de percurso óptico e 3 mL de capacidade.

A lenhina foi dissolvida numa solução de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (4:1 v/v) (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a absorvância entre 350 e 210nm foi registada contra o branco de acordo com o procedimento de Arseneau e Pepper (1965). Para dois balões volumétricos de 10,0 mL foram medidos 5,0 mL de solução de amostra. A um dos balões foi adicionado 1 mL de solução aquosa de NaOH 1M; ao outro, 1mL de HCl 1M. O volume final de ambas as soluções foi ajustado por adição de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (4:1 v/v). A

solução alcalina foi colocada no feixe da amostra e a ácida no feixe de referência. Os espectros de diferença da lenhina solúvel em clorito (material solúvel em 95% de EtOH), lenhina solúvel em dioxano/água/HCl a quente (lenhina 87°C) e lenhina solúvel em álcool quente (lenhina EtOH), todas provenientes do CWMst (caroço da azeitona, ver Esquema 2.7) foram determinados entre 350 e 210nm.