

3.1 - Experiências Preliminares com o AIR, AIR/PAW e CWM

3.1.1 - Preparação do AIR

A polpa da azeitona é um material muito rico em óleo, compostos fenólicos e proteínas intracelulares. Diferentes métodos de preparação das paredes celulares foram ensaiados com o objectivo de que os efeitos que estas substâncias pudessem vir a provocar fossem minimizados. Simultaneamente, procurou-se que o método evitasse, tanto quanto possível, fenómenos de degradação dos polímeros a estudar.

A preparação do AIR é um método relativamente simples e rápido, tendo sido utilizado para preparação das paredes celulares da polpa da azeitona nos trabalhos já publicados (Gil Serrano *et al.*, 1986; Gil Serrano e Tejero Mateo, 1988). Estes motivos levaram a que fosse o primeiro método experimentado.

O AIR preparado a partir da polpa da azeitona (ver Esquema 2.1-a) apresentava uma coloração verde clara e o teor em proteína era de 27,6% (Tabela 3.1, coluna 1), valor demasiado elevado para o conteúdo em proteína das paredes celulares que se estima entre 3 e 6% para as paredes celulares primárias das plantas dicotiledóneas (Selvendran, 1983). Este resíduo era rico em ácido urónico, arabinose e glucose.

Tabela 3.1 - Rendimento e composição em açúcares e proteína do AIR, AIR/PAW e do CWM da polpa da azeitona (valores expressos como percentagem em massa).

	AIR	AIR/PAW	CWM
Rendimento	7,2	4,7	3,0
Proteína	27,6	23,3	8,6
Ácido Urónico	11,8	8,0	20,5
Açúcares Neutros	27,6	26,4	37,0
Rha	0,6	0,5	0,9
Fuc	0,1	0,1	0,1
Ara	10,4	9,3	12,8
Xyl	2,2	2,2	3,0
Man	0,8	1,2	1,3
Gal	1,4	1,8	2,1
Glc	12,1	11,1	16,7

3.1.2 - Análise de Diferentes Camadas da Polpa

A composição em açúcares das diferentes camadas da polpa (1 a 4, ver Figura 2.1) encontra-se na Tabela 3.2.

A análise de açúcares mostra a existência de um gradiente na concentração de xilose desde o exterior até ao interior. O mesmo efeito, apesar de não tão marcado, parece ocorrer com a glucose, sendo de verificar um efeito contrário nas percentagens de arabinose e ácido urónico (galacturónico) - presentes. Estes resultados estão de acordo com o aumento do número de células lenhificadas (escleritos) que se verifica em direcção ao caroço.

Os resíduos AIR-1 e AIR-4 foram analisados quanto à composição em ligações glicosídicas sendo os resultados apresentados e discutidos no ponto 3.5.1.

Tabela 3.2 - Composição em açúcares dos AIR's de camadas sucessivas da polpa da azeitona, desde a camada exterior (AIR-1) até à camada interior em contacto com o caroço (AIR-4).

Fracção	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
AIR-1 (camada exterior)	2	-	40	7	2	3	19	27	408
AIR-2	1	v	28	9	2	4	25	31	489
AIR-3	2	v	33	13	2	3	22	25	426
AIR-4 (camada interior)	1	v	19	19	2	3	36	20	442

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais.

3.1.3 - Preparação do CWM a partir do AIR

Numa tentativa de remover do AIR proteínas e polifenóis co-precipitados sem provocar alterações significativas nos polímeros aí contidos, o AIR da polpa da azeitona foi hidratado num moínho de bolas durante 10 horas, seguindo-se duas extracções com PAW (ver Esquema 2.1-b). No final foi obtido um resíduo designado "AIR/PAW". O resíduo não continha amido, tal como verificado pelo teste do iodo. O AIR/PAW foi analisado quanto à composição em açúcares e teor em proteína, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.1, coluna 2.

O tratamento do AIR com PAW não diminuiu significativamente a quantidade de proteína presente (diminuição de 16%); a persistência de uma cor verde clara no AIR/PAW e o facto de os açúcares totais (açúcares neutros + ácido urónico) constituírem só 34,4% do resíduo permitem inferir que a quantidade de polifenóis precipitados é também elevada.

Os efeitos de desidratação provocados pelo álcool tornam difíceis as tentativas de solubilização dos materiais co-precipitados (Selvendran *et al.*, 1975a). Em experiências com AIR de couves imaturas, a hidratação do AIR em moínho de bolas seguido de tratamento com pronase foi um método eficiente na remoção das proteínas co-precipitadas, no entanto, este tratamento dissolveu quantidades apreciáveis de substâncias pécticas (Stevens e Selvendran, 1980a). Esta razão levou a que este procedimento não fosse experimentado.

Pela comparação relativa dos açúcares presentes no AIR/PAW verifica-se que, globalmente, a parede celular da polpa da azeitona é rica em glucose, arabinose e ácido urónico, podendo ser inferido que é rica em celulose e polissacarídeos pécticos, sendo provável a ocorrência de hemiceluloses ricas em xilose. Estas informações referentes às proporções relativas dos açúcares constituintes da parede celular não sofrem alteração significativa pela presença de proteínas e polifenóis no resíduo (ver ponto 3.1.4).

3.1.4 - Estudos Comparativos do CWM com o AIR/PAW

O CWM foi preparado pela acção de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1,5%, moagem em moínho de bolas em solução de SDS 0,5% e extracção com PAW. As características do CWM foram comparadas com as do AIR/PAW (Tabela 3.1).

Pela Tabela 3.1 verifica-se que o rendimento em CWM é menor do que o em AIR/PAW, possivelmente devido à quantidade de polifenóis e proteínas co-precipitadas no AIR/PAW; uma pequena fracção de polissacarídeos pécticos poderá também ter sido perdida durante a preparação do CWM, contribuindo assim para o menor rendimento quando comparado com o AIR/PAW. O CWM apresenta 8,6% de proteína, uma quantidade que apesar de ser superior ao da generalidade das paredes celulares dos tecidos parenquimatosos das plantas dicotiledóneas é muito inferior ao valor presente no AIR/PAW. O tratamento do AIR com PAW não foi suficiente para remover a

totalidade do material co-precipitado. A proporção relativa dos diversos açúcares neutros nos dois resíduos não mostrou variações significativas.

Ambos os resíduos foram posteriormente extraídos com CDTA e Na_2CO_3 e analisados quanto ao rendimento e composição em açúcares (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Composição em açúcares de fracções extraídas em sequência com CDTA e Na_2CO_3 a partir do material da parede celular da polpa da azeitona preparado através do resíduo insolúvel em álcool tratado com PAW (AIR/PAW) ou por acção de detergentes (CWM).

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
AIR/PAW		2	v	31	7	3	5	31	21	344
CDTA-1	5,3	1	v	15	1	1	2	1	79	480
CDTA-2	1,9	2	v	21	1	1	2	3	70	305
Na_2CO_3 -1	9,2	2	v	32	1	v	3	1	61	891
Na_2CO_3 -2	1,5	3	v	53	2	1	5	3	33	634
CWM		2	v	26	6	2	4	28	32	575
CDTA-1	13,8	1	v	25	2	v	2	2	68	659
CDTA-2	3,3	2	v	33	2	1	3	3	56	387
Na_2CO_3 -1	12,7	3	v	40	1	v	3	1	52	803
Na_2CO_3 -2	1,3	4	v	64	2	1	5	3	21	565

* Valores expressos em μg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais.

A quantidade de material extraído do AIR/PAW com soluções de CDTA e Na_2CO_3 foi de 17,9%, valor muito inferior ao verificado para o CWM (31,1%). Tal facto fica a dever-se principalmente ao baixo rendimento das extracções com CDTA, possivelmente porque as proteínas co-precipitadas impedem a extracção dos polissacarídeos pécticos, especialmente os da lamela média, removidas pelo CDTA. A baixa quantidade de açúcares totais das fracções de CDTA do AIR/PAW sugere a presença de proteínas nestes extractos. Em termos de percentagens relativas de açúcares não se verificaram grandes variações em qualquer dos extractos. A acção do Na_2CO_3 não parece ser significativamente afectada pelo tipo de resíduo. A análise da composição em açúcares das fracções extraídas do CWM com CDTA e Na_2CO_3 será comentada no ponto 3.3.1.

A preparação do CWM com soluções de detergentes confirmou oferecer maior garantia de que o material obtido se encontra livre de compostos intra-celulares e que os artefactos de alteração da extractabilidade das pectinas não se verificam, pelo que este método foi utilizado na preparação do material das paredes celulares da polpa da azeitona para os estudos que se irão seguir.

3.2 - Preparação do CWM

Da preparação do CWM da polpa da azeitona resultou a solubilização de vários materiais que se agrupou em 3 extractos (1,5% SDS, 0,5% SDS e PAW). O rendimento dos extractos, a composição em açúcares e as quantidades relativas de polissacarídeos solubilizados das paredes celulares da polpa da azeitona são mostrados na Tabela 3.4. Todos os extractos obtidos foram dialisados e tratados com CHCl_3 :MeOH para remoção total do óleo (ver Esquema 2.2).

Tabela 3.4 - Composição em açúcares do material purificado das paredes celulares da polpa da azeitona e do material solubilizado durante a purificação (os valores entre parêntesis referem-se à percentagem total de açúcares nos extractos).

Fracção	Rendimento (g/kg peso fr. de polpa)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
1,5% SDS	6,1 (2,9)	10	2	30	9	5	15	20	9	119
0,5% SDS										
sn.	0,8 (2,1)	1	v	25	17	2	10	7	38	663
ppt. ^f	1,1 (1,4)	2	v	29	9	2	5	25	28	327
PAW										
sn.	0,4 (0,5)	1	v	19	3	1	3	6	67	338
ppt. ^f	1,0 (2,3)	2	-	27	15	2	3	30	21	581
CWM Purificado	37,1 (90,8)	1	v	27	12	2	3	29	26	619

* Valores expressos em μg de açúcar anidro por mg.

^f Material precipitado no decorrer da diálise.

v = Quantidades vestigiais.

A polpa da azeitona foi extraída com uma solução aquosa a 1,5% de SDS com 5mM de metabissulfito de sódio a fim de remover a maioria dos compostos intra-celulares incluindo o óleo. O

SDS 1,5% é um bom solvente de proteínas intra-celulares, sendo a presença de metabissulfito na solução de SDS necessária para minimizar a oxidação e subsequente co-precipitação de polifenóis (Selvendran e O'Neill, 1987). Neste extracto, a quantidade de açúcares presente é somente 12% da massa total do extracto, o que mostra que contém muito material associado.

O resíduo foi moído em moíno de bolas em solução de 0,5% SDS durante 10 horas a 1°C de maneira a romper completamente a estrutura do tecido, facilitando o acesso dos solventes; uma quantidade significativa de óleo residual foi removida nesta etapa. O material solubilizado com a solução de SDS 0,5% e que permaneceu solúvel após a diálise (0,5% SDS sn.) continha quantidades significativas de ácido urónico, arabinose, xilose e galactose. A maioria destes açúcares era provavelmente de polímeros com origem intercelular, incluindo polissacarídeos pécnicos. Os conhecimentos relativos ao polímeros solubilizados durante o tratamento com SDS 0,5% são muito escassos. O facto destes polímeros terem sido solubilizados com uma solução aquosa a frio após a moagem em moíno de bolas faz prever que seja material constituinte das paredes celulares normalmente perdido durante a preparação do CWM ou insolubilizado durante a preparação do AIR. O extracto de SDS 0,5% irá ser analisado com maior detalhe no capítulo 4. O resíduo obtido após a diálise da fracção de SDS 0,5% (0,5% SDS ppt.) é mais pobre em açúcares do que a fracção solúvel e contém arabinose, ácido urónico e glucose. Esta composição em açúcares sugere que o material continha também polímeros de origem pécnica co-precipitados com material intra-celular.

O tratamento do resíduo com PAW removeu as restantes proteínas intra-celulares, SDS adsorvido e os últimos vestígios de óleo. O tratamento com DMSO foi omitido porque o material não acusou a presença de amido quando submetido ao teste do iodo. A fracção solúvel em água extraída com PAW (PAW sn.) é muito rica em ácido urónico, podendo conter uma pequena quantidade de polissacarídeos resultantes da dissolução de substâncias pécnicas. Esta fracção parece, no entanto, estar bastante contaminada com material proteico e/ou polifenólico já que a quantidade de açúcares totais é relativamente baixa. Esta fracção contém 0,5% do total de açúcares pelo que as substâncias pécnicas solubilizadas não têm significado na preparação do CWM. A fracção do PAW que precipitou durante a diálise (PAW ppt.) é relativamente rica em glucose, arabinose, ácido urónico e xilose. Estes açúcares poderão ser provenientes de material intercelular e substâncias pécnicas, removidos conjuntamente com o material intra-celular. As soluções de PAW possuem um pH

suficientemente baixo para remover parte do Ca^{2+} das paredes celulares, podendo algumas pectinas serem solubilizadas durante esta extracção (Huber, 1991). A utilização de soluções de fenol tamponadas com Tris a pH 7,0 parece não solubilizar o Ca^{2+} , no entanto, a sua eficiência na remoção das proteínas exógenas às paredes celulares é questionável.

Em resumo, a quantidade de açúcares das paredes celulares solubilizados durante a preparação do CWM corresponde a 6,3% do material presente no CWM (9,2% em relação aos açúcares totais).

O CWM purificado, de cor verde clara, apresentava um rendimento de 3,7% com base no peso fresco e foi guardado como suspensão em água a -20°C . O conteúdo em açúcares totais do CWM purificado (Tabela 3.4) é somente 62%, um valor relativamente baixo quando comparado com o CWM da cebola (Redgwell e Selvendran, 1986), batata, (Ryden e Selvendran, 1990b) e feijão (Ryden e Selvendran, 1990a). Esta baixa percentagem e o facto do material ainda apresentar uma ligeira coloração sugere a presença de substâncias fenólicas em associação com os polissacarídeos. A elevada quantidade de glucose, arabinose e ácido urónico no CWM indica a presença de celulose e polissacarídeos pécnicos ricos em arabinose; a presença de xilose indica a existência de polissacarídeos hemicelulósicos ricos neste açúcar, possivelmente xilanas e/ou xiloglucanas. O CWM apresentou um conteúdo em hidroxiprolina (Hyp) de $1,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco, o que sugere a presença de glicoproteínas ricas em Hyp. Este valor é comparável ao do conteúdo de Hyp nas paredes celulares da batata ($1,0 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Ryden e Selvendran, 1990b), um valor inferior à quantidade de Hyp encontrada na vagem do feijão ($8,9 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Ryden e Selvendran, 1990a).

3.3 - Extracção Sequencial do CWM

O CWM foi sequencialmente extraído com solventes inorgânicos aquosos, conforme descrito no ponto 2.5.1 e Esquema 2.3, até à obtenção de um resíduo rico em celulose (RC2). Os procedimentos de extracção utilizados foram seleccionados por minimizarem a degradação dos polissacarídeos pécnicos durante os estádios iniciais da extracção e solubilizarem os polissacarídeos numa forma o mais próxima possível da nativa (Selvendran e O'Neill, 1987). Como o RC2 continha

quantidades significativas de polissacarídeos pécnicos e possivelmente glicoproteínas, este resíduo foi submetido a um curto tratamento com clorito/ácido acético, foi lavado abundantemente com água e foi submetido a nova extracção com 1M KOH (ver Esquema 2.4). As quantidades de polímeros solubilizados e as respectivas composições em açúcares são mostradas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Composição em açúcares de fracções do material da parede celular da polpa da azeitonas obtidas por extracção sequencial com solventes aquosos.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
CDTA-1	10,8	1	v	11	v	v	1	1	86	753
CDTA-2	6,6	1	v	21	2	1	2	2	71	318
Na ₂ CO ₃ -1	14,4	2	-	40	1	v	3	1	53	767
Na ₂ CO ₃ -2	4,8	1	-	52	1	v	2	1	44	882
1M KOH 1°C										
sn.	3,4	1	v	27	31	1	5	13	22	789
ppt. ^f	5,2	1	v	8	67	2	2	7	13	547
1M KOH 20°C										
sn.	4,2	1	v	48	8	9	7	13	14	471
ppt. ^f	6,3	1	v	10	53	2	2	14	18	368
4M KOH										
sn.	1,6	v	1	15	25	11	10	30	8	936
ppt. ^f	3,3	1	v	41	28	2	2	8	18	134
4M KOH + borato										
sn.	1,9	1	v	64	5	5	5	8	13	588
ppt. ^f	1,7	1	v	52	12	1	2	9	23	188
RC1										
sn-RC	4,3	2	-	53	1	-	3	1	40	936
RC2	31,5	1	-	18	8	1	2	56	14	722
Clorito	2,6	3	-	56	1	v	4	1	35	732
1M KOH	4,5	2	v	48	16	2	5	9	18	505
Resíduo Final (RF)	22,8	1	v	6	7	2	1	78	5	725

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

^f Material precipitado no decorrer da diálise.

v = Quantidades vestigiais

3.3.1 - Extracções com CDTA e Na₂CO₃

As extracções com CDTA solubilizaram as substâncias pécticas que se encontravam fixas pelo Ca²⁺, a maioria das quais provavelmente originárias da lamela média. Este material era muito rico em ácido urónico, com uma razão Ác.Ur./Ara de 8:1. A segunda extracção com CDTA teve como objectivo assegurar a total remoção dos polímeros que pudessem ser solubilizados com agentes quelantes antes de iniciada a extracção com soluções alcalinas. A fracção resultante (CDTA-2) não era tão rica em ácido urónico e possuía um baixo conteúdo em açúcares (32%). Por espectroscopia de RMN de ¹³C foi mostrado estar ainda contaminada com CDTA, apesar da diálise se ter prolongado por uma semana com pelo menos duas mudanças de água diárias (ponto 2.5.1). Recentemente, foi chamada a atenção para o facto do CDTA não ser totalmente removido destes extractos mesmo após diálise exaustiva (Mort *et al.*, 1991). Em contraste, quando pectina comercial de citrinos é adicionada ao sal de sódio do CDTA e a solução é dialisada, mais de 95% do CDTA é removido por diálise (K.W.Waldron e R.R.Selvendran, resultados não publicados). A remoção incompleta do CDTA neste estudo poderá ser devida à presença de iões cálcio no extracto, iões esses que complexam com o CDTA impedindo a sua completa remoção por diálise.

Antes de se proceder à extracção com Na₂CO₃, o resíduo extraído com CDTA foi lavado com água a fim de remover todo o CDTA que ainda estivesse presente. Este facto é reflectido no elevado conteúdo em açúcares dos extractos de Na₂CO₃. O facto de a quantidade de açúcares totais nestas fracções ricas em substâncias pécticas não ser próximo de 100% poderá ser devido à precipitação das pectinas durante a hidrólise ácida, não permitindo a total recuperação dos açúcares envolvidos (Ryden e Selvendran, 1990a).

As extracções com Na₂CO₃ (1 e 20°C) solubilizaram material péctico presumivelmente por hidrólise de ligações éster fracas de "cross-linking". A primeira extracção com Na₂CO₃ ocorreu a 1°C de maneira a desesterificar as substâncias pécticas, minimizando as reacções de degradação por β-eliminação dos restantes polissacarídeos pécticos nas subseqüentes extracções alcalinas. Os extractos obtidos com Na₂CO₃ são ricos em polissacarídeos pécticos, como é mostrado pela grande quantidade de ácido urónico e arabinose e pela ocorrência de ramnose como principal desoxi-hexose.

As fracções extraídas com Na_2CO_3 contêm uma razão Ác.Ur./Ara de 1:1, sendo a primeira fracção (Na_2CO_3 -1) mais rica em ácido urónico do que a segunda, extraída a 20°C (Na_2CO_3 -2).

3.3.2 - Extracções com Soluções de KOH

Por neutralização dos extractos alcalinos originaram-se precipitados, os quais foram removidos por centrifugação e analisados separadamente dos polímeros das fracções solúveis. Os precipitados (16,5% do CWM) continham predominantemente xilanas acídicas, especialmente os das fracções de 1M KOH, visível pela presença de xilose como açúcar maioritário e também de ácido urónico. Os polissacarídeos no sobrenadante (11,1% do CWM) eram maioritariamente xiloglucanas (fracções ricas em glucose e xilose) e polissacarídeos pécticos (fracções ricas em ácido urónico e arabinose). A extracção com 1M KOH a 1°C solubilizou quantidades significativas de hemiceluloses (xilanas acídicas) juntamente com polissacarídeos pécticos enquanto o 4M KOH extraiu principalmente hemiceluloses (xiloglucanas) e só pequenas quantidades de polissacarídeos acídicos.

O precipitado obtido por diálise do material solubilizado com 1M KOH a 20°C tinha um conteúdo em açúcares relativamente baixo (37%), tendo-se verificado possuir quantidades significativas de material que absorvia luz ultra-violeta. O material solubilizado com 4M KOH + borato (sobrenadante) era muito rico em arabinose e relativamente pobre em ácido urónico, sendo demonstrado por análise das ligações glicosídicas (ponto 3.5.4) que a maior parte desta arabinose era proveniente de glicoproteínas ricas em Hyp. Das paredes celulares da batata (Ryden e Selvendran, 1990b) e do feijão (Ryden e Selvendran, 1990a) foram também solubilizadas glicoproteínas com 4M KOH + borato. O precipitado obtido durante a diálise do extracto obtido com 4M KOH + borato era castanho escuro, continha uma baixa quantidade de açúcares e possuía uma quantidade significativa de material com absorção no ultra-violeta.

3.3.3 - Extracções a partir de RC1

O resíduo que permanece após a extracção com 4M KOH + borato (RC1) foi neutralizado e dialisado. O material polimérico isolado a partir do sobrenadante e que constituía 4,3% do CWM, era rico em polissacarídeos pécticos tal como é mostrado pelas quantidades elevadas de arabinose e ácido urónico.

A ionização dos grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ da celulose em meio fortemente alcalino poderá impedir a difusão dos polissacarídeos pécticos carregados negativamente que se encontravam imersos na matriz celulósica, expandida devido ao meio alcalino. Este fenómeno deve ser, no entanto, distinguido do que envolve a solubilização de xiloglucanas ligadas às microfibrilhas de celulose por soluções alcalinas concentradas, o qual é predominantemente um efeito de desadsorção de superfície (Hayashi *et al.*, 1987).

O resíduo proveniente de RC1 (RC2) representa 31,5% do peso seco das paredes celulares e contém hidroxiprolina (2,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$). O RC2 foi tratado com clorito / ácido acético a fim de solubilizar glicoproteínas das paredes celulares e polissacarídeos pécticos ainda associados. O resíduo insolúvel na solução de clorito foi lavado abundantemente com água e extraído com 1M KOH deixando um resíduo final (RF). O baixo teor em açúcares deste resíduo final (73%) pode ser devido à presença de compostos fenólicos ou mesmo lenhina.

3.4 - Fraccionamento dos Extractos

Os polímeros presentes nos vários extractos foram fraccionados por cromatografia de troca aniónica em gel de DEAE-Trisacryl M (Tabelas 3.6 a 3.9); alguns extractos (CDTA-1, Na_2CO_3 -1 e 1M KOH 1°C) foram previamente submetidas a precipitação com concentrações crescentes de etanol e as maiores fracções foram seguidamente resolvidas por cromatografia de troca aniónica.

3.4.1 - Fraccionamento dos Extractos de CDTA e Na₂CO₃

O fraccionamento por cromatografia de troca aniónica da fracção de CDTA-1 originou 4 fracções, sendo as mais abundantes a fracção neutra (eluída com tampão) e a fracção eluída com tampão + 0,125M NaCl (Figura 3.1 e Tabela 3.6). Estas duas fracções contêm 48,4% do material inicial num total de 86% do material eluído. Ambas as fracções apresentam a mesma composição - glicosídica onde 96% dos açúcares são ácido urónico e arabinose, numa razão de 4:1. A percentagem de recuperação do material eluído foi de 56%, possivelmente devido à retenção irreversível de parte do material na coluna.

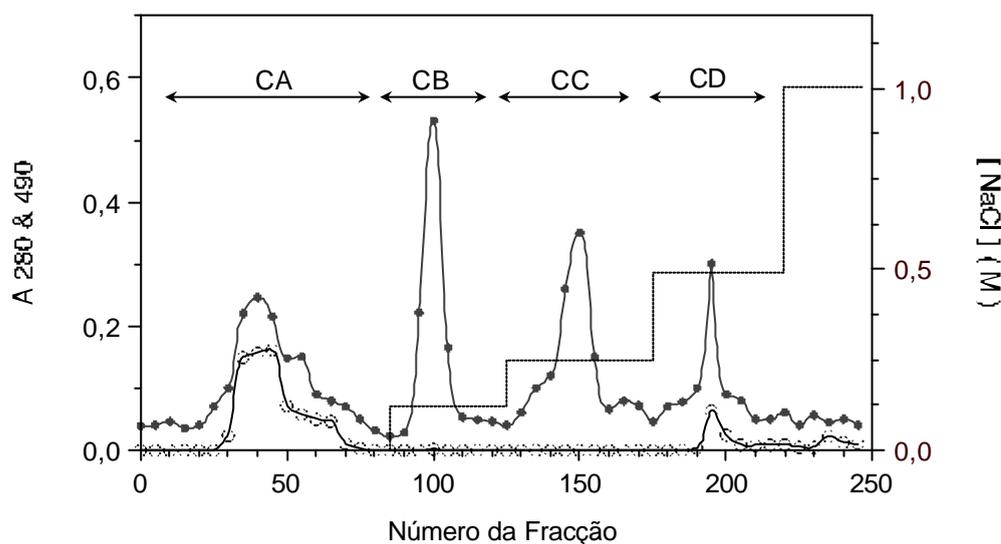


Figura 3.1 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M do extracto de CDTA-1.

• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

Com o objectivo de resolver os polissacarídeos presentes na fracção neutra, esta foi desesterificada em condições suaves (Na₂CO₃ 50mM a 1°C). Como resultado obteve-se uma pequena percentagem de material insolúvel, revelando a análise de açúcares que era muito rico em ácido urónico (Tabela 3.6). O sobrenadante foi recromatografado por cromatografia de troca aniónica com gradiente de NaCl até 1M (Figura 3.2). Foram obtidas 3 fracções, sendo a fracção eluída com baixa concentração de NaCl a mais abundante (60%). A fracção neutra obtida no refraccionamento compreende 6% do material inicial e a recuperação do material eluído foi de 84%. O comportamento ácido apresentado por este material após tratamento com uma solução alcalina

revela que a maior parte dos resíduos de ácido urónico que compunham a fracção se encontravam esterificados. Tendo em conta que os resíduos de ácido urónico constituíam 78% dos resíduos de açúcares presentes, pode-se inferir que esta fracção estava muito esterificada, encontrando-se também muito esterificada a maior parte do material extraído com CDTA.

Tabela 3.6 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas pelo CDTA após cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl, desesterificação da fracção neutra (CA) e refraccionamento.

Fracção	Rendim. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>CDTA-1</i>										
Tampão (CA)	21,4	1	v	18	v	1	1	1	78	750
Desesterif. de CA resíduo insol.	5,3	1	v	10	1	v	1	8	79	715
C1des.A (CAa)	6,3	1	v	70	4	4	8	8	5	682
C1des.B (CAb)	60,0	2	v	20	1	1	1	5	70	824
C1des.C (CAc)	12,6	3	1	35	22	7	4	17	11	40
0,125M NaCl (CB)	27,0	1	v	19	v	v	1	1	78	634
0,25M NaCl (CC)	5,0	1	v	9	v	v	1	1	88	668
0,5M NaCl (CD)	2,6	1	v	12	1	1	1	5	79	352

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

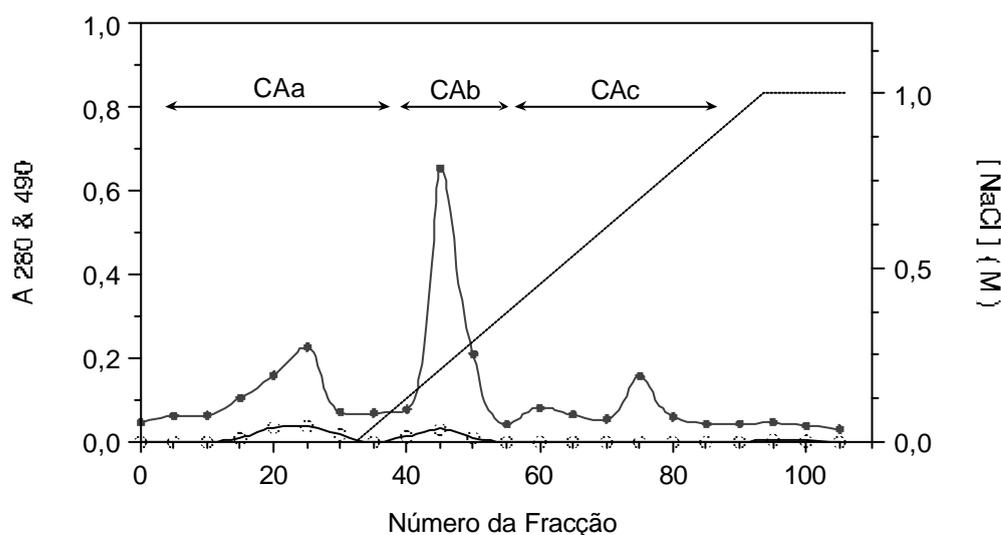


Figura 3.2 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M da fracção CA após desesterificação.

• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

Com o objectivo de melhorar o rendimento do fraccionamento dos polímeros do extracto de CDTA-1 foi tentado, antes do fraccionamento em coluna, o fraccionamento por precipitação em soluções de concentração crescente de etanol (ver ponto 2.10.1).

A precipitação do extracto de CDTA-1 em etanol originou 4 fracções (Tabela 3.7). A maioria dos polissacarídeos pécnicos precipitaram com 60% de etanol. O material que permaneceu solúvel em 85% de etanol era muito pobre em açúcares, tendo sido detectado por espectroscopia de RMN de ^{13}C que a maior parte do material da fracção era CDTA. A fracção que precipitou com 60% de etanol foi resolvida por cromatografia de troca aniónica em 4 fracções (Figura 3.3) sendo o rendimento dos polímeros eluídos pela coluna superior a 95%. O decréscimo da razão açúcares neutros/ácido urónico não foi significativo, indicando que o grau de esterificação dos polissacarídeos pécnicos foi o principal responsável pela separação.

Tabela 3.7 - Composição em açúcares das fracções obtidas a partir dos extractos de CDTA-1 e Na_2CO_3 -1 após precipitação com etanol seguida de cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>CDTA-1</i>										
EtOH 60% (C1-60)	35,6	2	v	29	v	-	1	1	67	472
Tampão (C1A)	64,0	2	1	26	v	1	1	2	67	554
0,125M NaCl	12,0	3	v	34	1	v	2	2	58	489
0,25M NaCl	12,0	2	v	31	1	1	2	2	61	531
0,5M NaCl	6,7	2	1	17	1	v	2	6	72	428
EtOH 75%	20,0	3	v	25	v	-	2	1	69	615
EtOH 85%	5,3	2	v	29	1	-	1	2	65	586
EtOH 85% sn.	37,7	32	-	48	7	-	-	-	13	12
<i>Na₂CO₃ 1 °C</i>										
resíduo insolúvel	3,0	2	v	41	1	v	3	3	50	495
EtOH 70%	89,3	2	v	36	v	v	2	1	59	914
Tampão	3,1	2	v	50	8	1	3	15	21	164
0,125M NaCl	4,9	3	-	71	1	v	4	2	19	581
0,25M (NC1)	38,2	3	-	68	v	v	3	1	25	804
(NC2)	47,4	2	-	12	1	1	2	1	81	590
0,5M NaCl	5,2	1	v	17	1	1	2	2	76	605

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

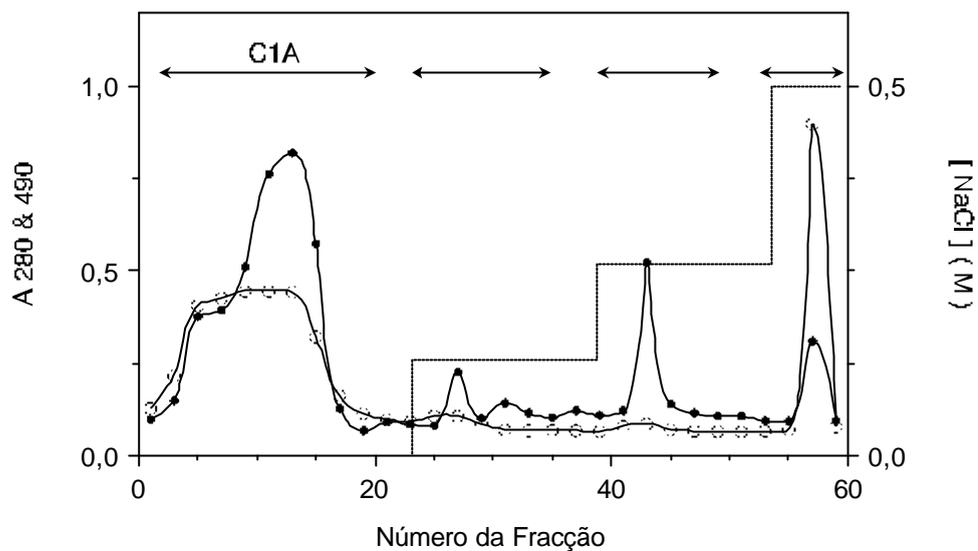


Figura 3.3 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M da fracção C1-60, do extracto de CDTA-1.

• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

O extracto de Na₂CO₃-1 foi, de maneira semelhante, submetido a precipitação gradual com soluções de etanol e o material precipitado com 70% de etanol (maior fracção) foi fraccionado por cromatografia de troca aniónica originando 4 fracções (Tabela 3.7). A recuperação do material eluído foi de 99%. A terceira fracção (eluída com 0,25M NaCl) apresentava uma sobreposição de compostos em que o primeiro componente (NC1) possuía absorção no ultra-violeta (Figura 3.4). A fracção NC1 mostrou ser muito rica em arabinose e relativamente pobre em ácido urónico quando comparada com a fracção NC2 (segundo componente) (Tabela 3.7).

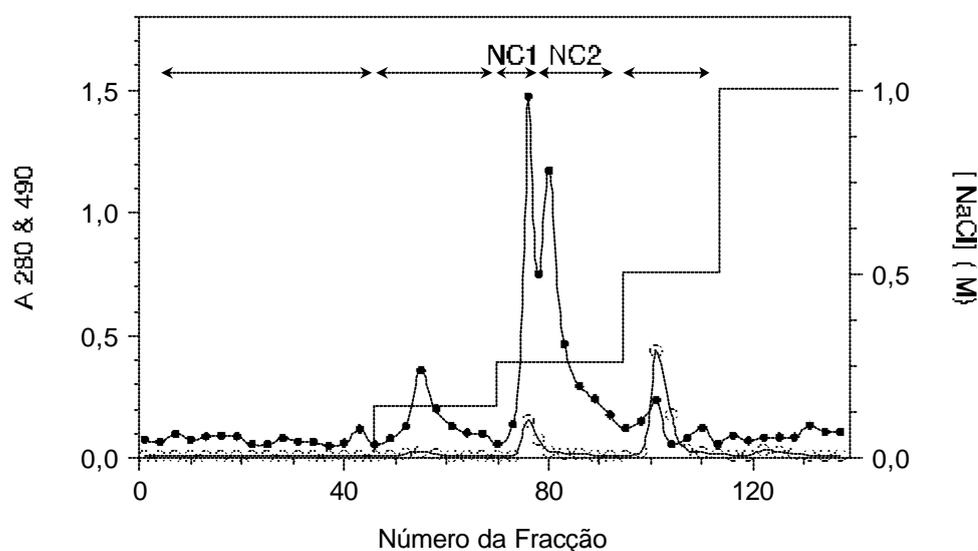
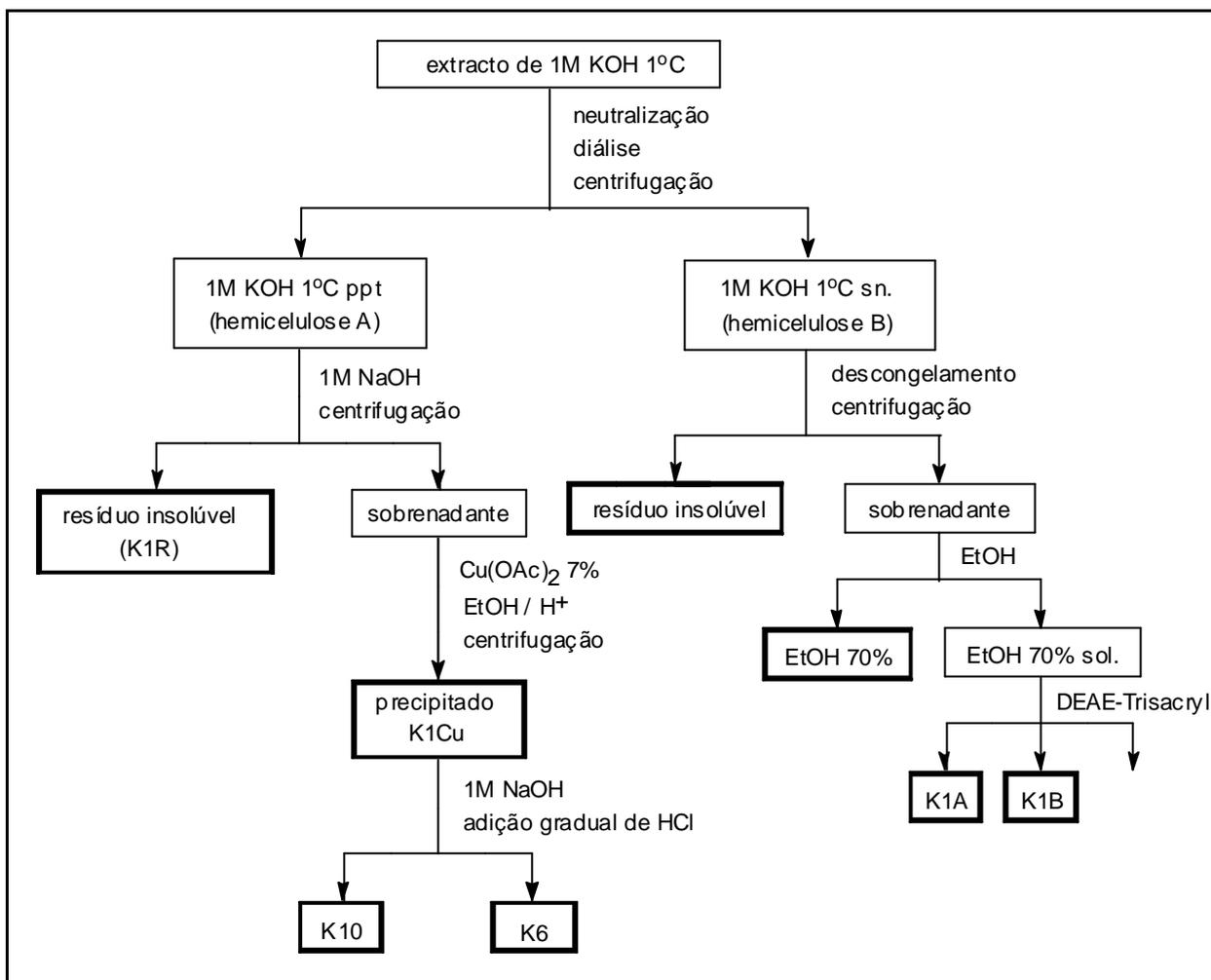


Figura 3.4 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M da fracção precipitada em EtOH 70% a partir do extracto de Na₂CO₃-1.

• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

3.4.2 - Fraccionamento dos Extractos de KOH e Clorito

O fraccionamento do extracto obtido com 1M KOH 1°C encontra-se resumido no Esquema 3.1.



Esquema 3.1 - Fraccionamento do extracto obtido com 1M KOH 1°C.

A parte solúvel do extracto de 1M KOH 1°C (hemicelulose B) originou um precipitado muito abundante após descongelamento. O material solúvel foi tratado com etanol, precipitando somente uma quantidade muito pequena com 70% de álcool. Como não se verificou mais precipitação de material com adição de etanol, o sobrenadante foi concentrado e fraccionado por cromatografia de troca aniónica (Figura 3.5).

O material eluído só com solução tampão (K1A) era muito rico em xilose e glucose e continha uma quantidade relativamente pequena de ácido urónico (Tabela 3.8). Estes resultados denunciam a presença de xilanas e xiloglucanas. O material eluído com 0,125M NaCl (K1B) era rico em xilose, arabinose e ácido urónico e é provável que seja um complexo xilana-polissacarídeo péctico.

Tabela 3.8 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas com 1M KOH a 1°C.

Fracção	Rend. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>1M KOH 1°C sn.</i>										
resíduo insolúvel	41,5	1	1	54	16	1	4	6	17	158
EtOH 70%	2,0	1	1	17	45	1	6	20	9	861
EtOH 70% sn.	25,0	1	1	15	46	2	6	21	8	796
Tampão (K1A)	62,9	1	1	10	44	2	7	28	7	915
0.125M (K1B)	17,1	1	-	15	64	v	2	4	14	796
0.25M NaCl	2,9	2	-	39	20	2	4	10	23	774
<i>1M KOH 1°C ppt.</i>										
res.insol. NaOH (K1R)	6,7	1	v	11	11	v	1	74	2	212
sn. NaOH Cu(OAc) ₂ ppt. (K1Cu)	43,9	1	-	1	91	-	v	1	6	923
pH 10 ppt. (K10)	85,0	1	-	1	87	v	v	2	9	869
pH 10 sn. (K6)	10,0	2	v	3	78	1	1	4	11	821

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

O material insolúvel proveniente do extracto de 1M KOH 1°C (hemicelulose A) foi disperso em 1M NaOH e uma pequena quantidade que permaneceu insolúvel foi removida por centrifugação (K1R). A fracção solúvel foi tratada com uma solução saturada de acetato de cobre e o precipitado azul formado foi desfeito por tratamento com uma solução de ácido clorídrico em etanol. O precipitado branco resultante foi dissolvido em NaOH 1M e o pH da solução foi descido por adição gradual de HCl tendo-se obtido um precipitado a pH 10 (K10). O pH do sobrenadante foi baixado até 6 e como não foi formado mais nenhum precipitado a solução foi dialisada e liofilizada dando a fracção K6. A composição em açúcares destas fracções encontram-se na Tabela 3.8. Estas fracções

eram ricas em xilose, mostrando conterem xilanas, sendo provável que a fracção K10 seja uma xilana acídica pura.

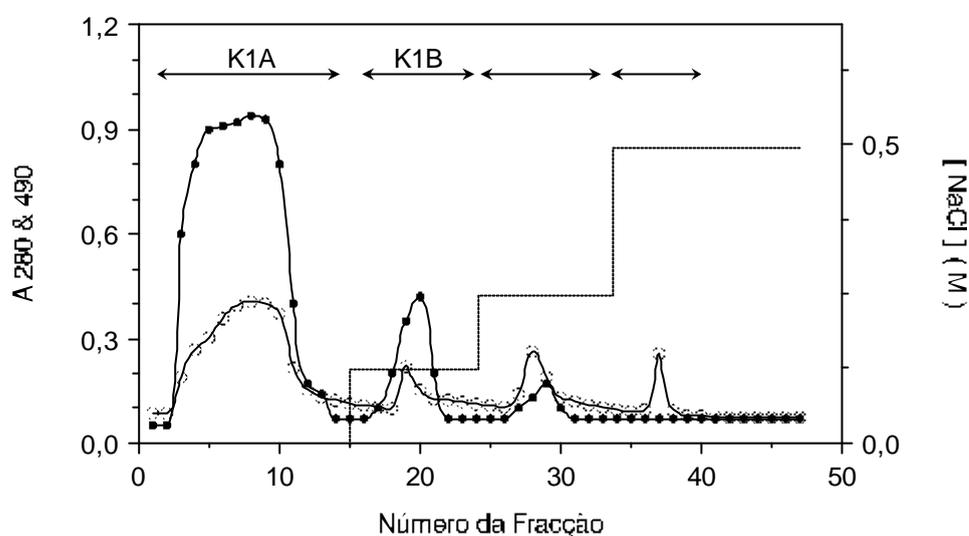


Figura 3.5 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M da fracção solúvel em EtOH 70% a partir do extracto de 1M KOH (hemicelulose B).
• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

A fracção do sobrenadante do extracto de 4M KOH foi dispersa em água e o resíduo insolúvel (10%) foi removido por centrifugação. O sobrenadante foi sujeito a cromatografia de troca aniónica tendo sido obtidas 4 fracções (Figura 3.6).

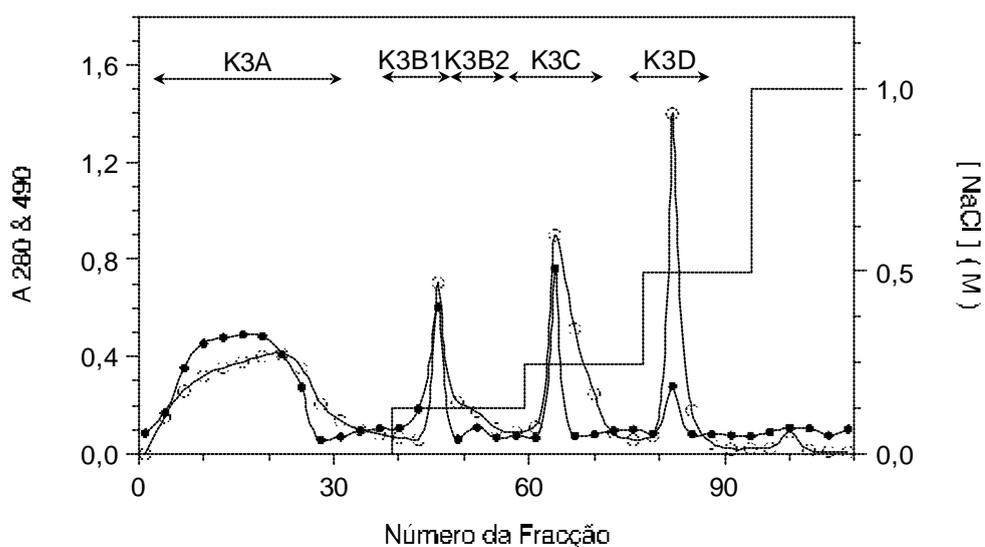


Figura 3.6 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M do extracto de 4M KOH (sobrenadante).
• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

Todas estas fracções exibiam absorvância no ultra-violeta. Com a possível excepção da fracção K3A, todas as restantes fracções, particularmente K3B2 e K3D, possuíam baixo teor em açúcares. Este facto pode ser devido a estes polissacarídeos se encontrarem associados a substâncias fenólicas como pode ser visto na Figura 3.6. A fracção K3B possui um ombro e o componente mais retardado (K3B2) mostrou ser muito rico em substâncias fenólicas por absorção no ultra-violeta. A fracção eluída com tampão (K3A) continha quantidades significativas de arabinose, glucose e manose (Tabela 3.9) e a maioria da arabinose era proveniente das glicoproteínas das paredes celulares tal como foi visto por análise das ligações glicosídicas e presença de hidroxiprolina (25 µg/mg). A percentagem de recuperação do material após a eluição foi de 84%.

Tabela 3.9 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas com 4M KOH, 4M KOH + borato, clorito e 1M KOH (depois da extracção com clorito) após cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl (o extracto de 1M KOH foi fraccionado com gradiente de NaCl - Figura 3.8).

Fracção	Rendim. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>4M KOH sn.</i>										
resíduo insolúvel	10,0	1	v	32	21	9	6	20	11	590
Tampão (K3A)	34,0	1	1	41	5	18	9	21	4	509
0,125M NaCl (K3B1)	12,0	2	v	69	3	2	4	7	13	324
(K3B2)	6,0	2	1	46	7	10	3	31	-	63
0,25M NaCl (K3C)	18,0	3	1	48	2	2	4	8	32	212
0,5M NaCl (K3D)	4,0	2	2	23	2	12	2	29	28	88
<i>4M KOH + borato sn.</i>										
Tampão (K4A)	21,3	1	v	66	3	10	6	10	4	679
0,125M NaCl (K4B)	9,3	2	-	76	2	1	3	4	12	635
0,25M NaCl (K4C)	4,7	3	v	62	2	v	4	5	24	561
0,5M NaCl (K4D)	1,3	3	1	28	2	38	3	18	7	355
<i>Clorito</i>										
resíduo insolúvel	25,8	2	-	71	1	-	4	3	19	712
Tampão (ChA)	10,0	1	-	80	2	-	3	2	12	858
0,125M NaCl (ChB)	14,2	2	v	72	1	-	5	2	18	861
0,25M NaCl (ChC)	30,0	2	-	74	1	-	3	-	20	838
0,5M NaCl (ChD)	2,5	2	v	65	1	-	4	3	25	520
<i>1M KOH após clorito</i>										
KCA	16,8	v	v	19	14	21	12	29	5	630
KCB	3,9	2	v	62	5	1	5	8	17	618

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

A fracção extraída com 4M KOH + borato dissolveu completamente em água e em cromatografia de troca aniónica originou 4 fracções principais (Tabela 3.9). As 3 primeiras fracções eram muito ricas em arabinose; a maioria da arabinose presente na fracção K4A foi mostrado derivar das glicoproteínas da parede celular por análise das ligações glicosídicas e presença de hidroxiprolina (37 $\mu\text{g}/\text{mg}$). A percentagem de recuperação do material após a eluição foi de 37%.

A fracção solúvel em clorito foi dispersa em água e o resíduo insolúvel (26%) foi removido por centrifugação. O material solúvel foi fraccionado por cromatografia de troca aniónica dando 3 fracções principais, ricas em arabinose e ácido urónico (Figura 3.7 e Tabela 3.9). Uma quantidade significativa de arabinose na fracção ChA deriva também das glicoproteínas da parede celular e a restante de polissacarídeos pécicos tal como indica a presença de 10,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de hidroxiprolina nesta fracção. As restantes fracções (resíduo insolúvel, ChB e ChC) apresentam valores para a hidroxiprolina na ordem dos 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$, indicando tratar-se de material predominantemente pécico. A percentagem de recuperação do material após a eluição foi de 82,5%.

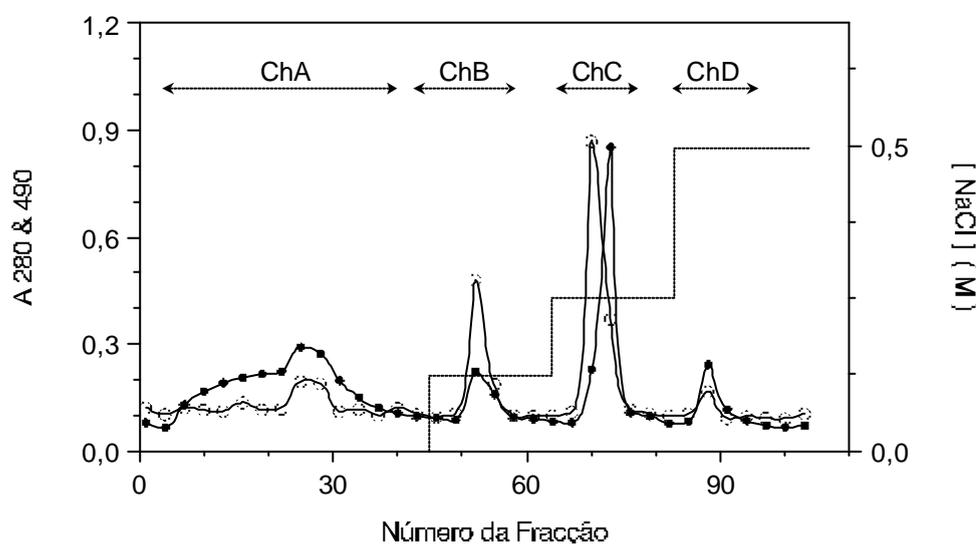


Figura 3.7 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M do extracto de clorito / ácido acético.

• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

O material extraído com 1M KOH após o tratamento com clorito / ácido acético foi fraccionado por cromatografia de troca aniónica por eluição com gradiente de NaCl até 1M (Figura 3.8). Pela Tabela 3.9 pode-se verificar que a fracção neutra (KCA) foi a mais abundante. Esta fracção era composta por glucose, manose, arabinose, xilose e galactose, possivelmente provenientes

de polissacarídeos de diferentes origens como xiloglucanas, mananas e glicoproteínas. A fracção acídica (KCB) era provavelmente de origem pécica. A percentagem de recuperação do material após a eluição foi de 21%.

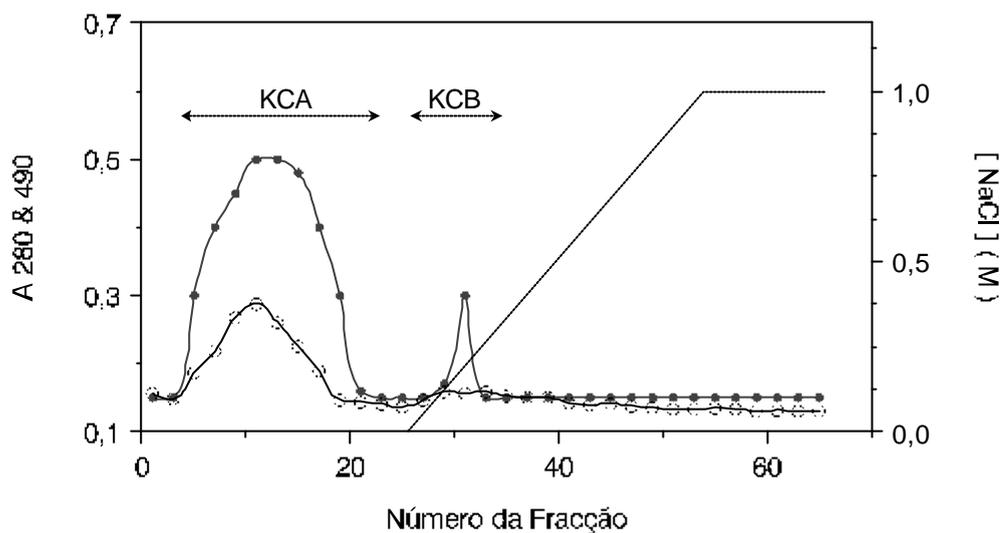


Figura 3.8 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M do extracto de 1M KOH após o tratamento com clorito.
● - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

Os resultados do fraccionamento dos diversos extractos obtidos a partir do CWM da polpa da azeitona mostraram que a percentagem de recuperação do material após a eluição em DEAE-Trisacryl M é muitas vezes baixa. Estes resultados contrastam com as recuperações entre 90 e 100% do material obtido a partir do CWM de batata (Ryden e Selvendran, 1990b), de parênquima da vagem do feijão verde (Ryden e Selvendran, 1990a) e de cebola (Redgwell e Selvendran, 1986) após fraccionamento com a mesma resina. A introdução de um fraccionamento prévio por precipitação gradual com soluções de concentração crescente de etanol proporcionou melhores rendimentos no fraccionamento em coluna com DEAE-Trisacryl M.

3.5 - Análise das Ligações Glicosídicas

Algumas fracções seleccionadas foram metiladas e os grupos carboxílicos reduzidos com LiAlD₄. As fracções K1R, K3A e K4A não foram reduzidas por serem pobres em ácido urónico; o CWM, AIR-1, AIR-4, CR2 e o resíduo final (RF) também não foram reduzidos. As fracções provenientes do extracto de CDTA (C1-60 e C1A) foram desesterificadas com uma solução alcalina fria antes de serem metiladas.

Os resultados da metilação que envolve redução de grupos carboxílicos não foi quantitativa tal como mostram os baixos rendimentos em ácido galacturónico (16-54%) e em ácido glucurónico (40-70%). As fracções de CDTA analisadas apresentam valores mais elevados para a redução dos grupos carboxílicos do ácido galacturónico (80%).

A análise por metilação é quantitativa para todos os açúcares neutros presentes nas fracções, existindo também uma boa correspondência entre a ligação e a composição em açúcares. Estas observações contrastam com a baixa recuperação dos resíduos de galactose nas análises por metilação de um grande número de plantas (Ryden e Selvendran, 1990a,b; Seymour *et al.*, 1990; Waldron e Selvendran, 1992), podendo ser devidas ao baixo teor em galactose nas fracções obtidas.

A proporção entre os diversos tipos de ligação não parece ser alterada com a redução dos grupos carboxílicos, tal como se demonstra com várias fracções de diferente composição (Tabelas 3.11, 3.13, 3.15 e 3.16); nas referidas tabelas, as amostras reduzidas com LiAlD₄ encontram-se marcadas com um asterisco (*).

3.5.1 - Metilação do CWM, AIR-1 e AIR-4

Ao longo dos anos, a metilação do CWM tem sido utilizada para a caracterização estrutural das paredes celulares de diferentes tipos de tecidos de plantas (Talmadge *et al.*, 1973; Burke *et al.*, 1974; Ring e Selvendran, 1978; O'Neill e Selvendran, 1980b; Stevens e Selvendran, 1980a; Lomax *et al.*, 1983; Düsterhöft *et al.*, 1992). Recentemente, a análise por metilação foi utilizada na caracterização das paredes celulares de vários tipos de tecidos dos talos de espargo tendo

proporcionado muito boas indicações quanto aos principais tipos de polissacarídeos presentes (Waldron e Selvendran, 1990a).

A análise das ligações glicosídicas do CWM da polpa da azeitona (Tabela 3.10) mostra que a maioria dos resíduos de glucose se encontram em ligação (1→4), sendo provenientes da celulose. A presença de uma pequena quantidade de resíduos de (1→4,6)-Glc_p, assim como de resíduos de (1→2)-Xyl_p sugere a ocorrência de xiloglucanas no CWM. A maior parte dos resíduos de xilose detectados encontram-se em ligação (1→4), sendo também detectados resíduos de xilo-piranosose em ligação terminal. É muito provável que estes resíduos sejam, na maior parte, provenientes de xilanas.

A manose encontra-se em muito pequena quantidade; os resíduos mais abundantes são (1→4)- e (1→4,6)-Man_p, sugerindo a possível ocorrência de de mananas e/ou glucomananas.

A presença de quantidades aproximadamente iguais de resíduos de arabinose em ligação (1→5), (1→3,5) e terminais indica que a arabinose se encontra em estruturas muito ramificadas, possivelmente constituídas por cadeias curtas de resíduos de arabinose. A presença de 1,4-di-*O*-acetil-2,3,5-tri-*O*-metilarabinitol em elevadas quantidades sugere que os resíduos de arabinose em ligação terminal se encontram na forma de furanose.

Os resultados da metilação do AIR-1 foram muito semelhantes aos obtidos para o CWM (Tabela 3.10). Foram detectados os resíduos glicosídicos da celulose, xiloglucanas e xilanas; uma pequena quantidade de resíduos de galactose em ligação (1→4) e (1→4,6) e resíduos de arabinose em ligações várias, característicos das substâncias pécticas. Também foram detectados no AIR-1 a presença de ramnose em ligação (1→2) e (1→2,4) e galactose em ligação (1→4). As proporções relativas dos diferentes resíduos glicosídicos foram semelhantes às encontradas para o CWM.

No AIR-4 (Tabela 3.10) verificou-se muito xilitol, resultado de submetilação. É possível que este material, por estar mais próximo do caroço, se encontrasse mais lenhificado, tendo a lenhina impedido a metilação das glucuronoxilanas.

Tabela 3.10 - Composição das ligações glicosídicas do CWM da polpa da azeitona e dos AIR's da camada exterior (AIR-1) e interior (AIR-4) da polpa da azeitona (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Amostra		
	CWM	AIR-1	AIR-4
2-Rhap	1,6	1,1	1,0
3-Rhap	0,1	-	-
2,4-Rhap	0,5	0,4	0,4
T-Fucp	0,1	-	0,2
T-Arap	-	-	0,5
T-Araf	13,2	9,6	8,0
2-Araf	0,6	1,1	1,4
3-Araf	5,0	4,4	2,6
5-Araf	12,7	11,6	9,2
3,5-Araf	12,6	9,8	6,8
Arabinitol	0,9	2,4	1,3
T-Xylp	1,5	1,4	1,5
2-Xylp	3,3	2,0	1,9
4-Xylp	6,0	4,0	5,8
2,3-Xylp	0,4	-	0,3
2,4-Xylp	0,8	0,7	2,3
Xilitol	2,1	1,7	12,1
4-Manp	2,3	2,5	2,3
4,6-Manp	0,7	0,8	0,6
2-Galp	0,3	-	-
4-Galp	0,3	2,1	1,4
6-Galp	0,1	0,2	0,2
3,4-Galp	0,2	-	-
3,6-Galp	-	-	0,5
4,6-Galp	0,2	0,2	0,2
T-Glcp	0,3	0,8	0,5
4-Glcp	27,2	21,3	25,5
6-Glcp	-	0,4	-
2,4-Glcp	0,2	0,3	-
3,4-Glcp	0,1	0,2	0,2
3,6-Glcp	-	0,5	-
4,6-Glcp	2,8	3,0	3,1
3,4,6-Glcp	-	0,4	0,9
2,4,6-Glcp	-	-	0,2
Glucitol	3,9	17,1	8,1

3.5.2 - Fracções Extraídas com CDTA e Na₂CO₃

A análise das ligações glicosídicas na fracção C1A cujos grupos carboxílicos foram reduzidos (Tabela 3.11) mostraram a presença de pequenas quantidades de resíduos de ácido galacturónico terminal juntamente com GalpA em ligação (1→4), encontrando-se uma quantidade significativa destes resíduos substituídos em O-3 e O-2. Igual resultado foi registado na análise das ligações glicosídicas da fracção C1-60, fracção que deu origem à C1A por cromatografia de troca aniónica. Em ambas as fracções foi obtido um bom rendimento na redução dos grupos carboxílicos (80%), verificando-se também semelhança quanto à composição glicosídica. Foram detectados resíduos de ramnose de ligações várias, sendo preponderantes as ligações (1→2) e (1→2,4). As proporções relativas das várias ligações dos resíduos de arabinose na fracção mais purificada (C1A) são: T-Araf: 3-Araf: 5-Araf: 3,5-Araf = 2,1:1,0:2,6:2,8. Esta característica estrutural da "arabinana" é semelhante na fracção C1-60 e encontra-se também presente nas outras fracções ricas em polissacarídeos pécticos tais como NC1, NC2 e sn-RC (Tabelas 3.11 e 3.16). Todas estas fracções pécticas possuem também pequenas quantidades de Xylp em ligação (1→4) e por vezes terminal. É possível que resíduos de xilose se encontrem ligados directamente aos resíduos de ácido galacturónico formando regiões de xilogalacturonanas, tal como parece ocorrer nas substâncias pécticas das paredes celulares da maçã (DeVries *et al.*, 1983; Renard *et al.*, 1991b), vagem do feijão (Ryden e Selvendran, 1990a), batata (Ryden e Selvendran, 1990b) ou vagem da ervilha (Ralet *et al.*, 1993). Muito recentemente, Thibault *et al.*, (1993) confirmaram a presença de xilose, principalmente nas regiões pouco ramificadas das substâncias pécticas.

Uma pequena quantidade de GalpA em ligação (1→3,4) foi detectada em NC1 e NC2 mostrando que uma pequena porção de resíduos de GalpA em ligação (1→4) se encontravam substituídos na posição 3 e possivelmente 2 tal como foi observado nas fracções provenientes do CDTA e também tem vindo a ser observado com os polissacarídeos pécticos de outros tecidos (Ryden e Selvendran, 1990a; Waldron e Selvendran, 1992).

Tabela 3.11 - Composição das ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes dos extractos de CDTA e Na₂CO₃ (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção						
	CDTA			Na ₂ CO ₃			
	CI-60*	CIA	CIA*	NCI	NCI*	NC2	NC2*
T-Rhap	-	0,3	-	-	-	2,3	1,6
2-Rhap	1,0	1,8	1,1	1,8	3,2	1,6	1,7
3-Rhap	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	0,7	0,8
2,3-Rhap	-	0,4	-	-	-	0,3	-
2,4-Rhap	1,2	1,7	1,1	1,2	2,3	1,2	1,6
3,4-Rhap	-	-	0,2	0,1	0,1	1,3	1,0
T-Fucp	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,5	0,5
T-Araf	7,3	14,4	8,9	22,2	21,3	11,9	11,0
2-Araf	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3	-	0,3
3-Araf	3,6	7,6	4,5	9,6	9,6	6,0	5,2
5-Araf	10,1	21,3	11,4	25,8	26,3	17,1	13,3
2,3-Arap	-	-	-	0,6	-	2,4	-
2,5-Araf	-	-	-	0,9	1,3	0,5	0,4
3,5-Araf	11,6	25,7	12,5	25,3	25,4	18,0	14,2
Arabinitol	0,7	5,9	0,7	0,8	0,8	2,2	0,6
T-Xylp	-	0,3	-	0,3	0,4	1,0	0,8
4-Xylp	1,3	0,7	0,4	0,3	0,3	3,5	2,4
2,4-Xylp	0,3	1,4	0,3	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	0,4	0,1	-	0,6
T-Galp	0,6	1,0	0,7	1,1	1,0	1,5	1,2
3-Galp	0,3	0,4	-	0,2	0,9	0,4	0,3
4-Galp	0,6	0,9	0,5	0,7	0,5	3,7	3,5
3,4-Galp	0,3	0,4	0,2	0,4	0,4	-	0,4
3,6-Galp	-	-	-	-	-	-	-
4,6-Galp	-	-	-	-	-	1,3	-
T-GalpA	0,8	-	0,7	-	0,2	-	1,6
4-GalpA	45,4	-	41,9	-	4,8	-	33,3
2,4-GalpA	4,6	-	4,2	-	-	-	-
3,4-GalpA	4,0	-	3,7	-	0,2	-	0,7
Galactitol(A)	1,5	-	1,4	-	-	-	-
T-Glcp	0,3	0,3	0,2	0,2	-	-	-
4-Glcp	1,6	4,0	2,2	0,7	-	6,1	3,0
2,4-Glcp	0,4	0,9	0,4	0,1	0,2	1,3	-
3,4-Glcp	-	0,4	0,3	-	-	-	-
4,6-Glcp	-	0,9	0,5	-	-	0,9	-
Glucitol	0,9	6,1	0,7	6,7	-	14,4	-

* Amostras reduzidas com LiAlD₄.

A composição em ligações glicosídicas das fracções NC1 e NC2 é relativamente semelhante e não difere significativamente em relação às fracções de CDTA analisadas. Para além dos resíduos de ramnose em ligações várias, a fracção NC2 apresenta resíduos de ramnose em ligação terminal, originados possivelmente por quebra de cadeias de pectinas durante a extracção.

Nas fracções pécticas analisadas verificaram-se valores muito elevados para o glucitol das amostras não submetidas a redução do grupo carboxílico. Estes valores não são, no entanto, concordantes com as análises de açúcares das respectivas fracções (Tabela 3.7) nem com a análise por metilação das amostras em que o grupo carboxílico é reduzido. Uma explicação possível para este facto é as mangas de diálise em que as amostras são dialisadas (pontos 2.17.1-b e 1.17.2-a) libertarem acetato de celulose que após a hidrólise seria determinado como glucitol-hexaacetato. Nas amostras em que o grupo carboxílico é reduzido (ponto 2.17.3), a solução alcalina resultante da reacção de redução seria suficiente para desacetilar o acetato de celulose e a extracção com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) extraía os polímeros metilados para a fase orgânica, separando-os do material contaminante.

a) Espectroscopia de RMN de ^{13}C das Fracções NC1 e NC2

A espectroscopia de RMN de ^{13}C das fracções NC1 e NC2 confirmou os resultados da análise por metilação, proporcionando informação adicional acerca das configurações anoméricas da arabinose em NC1 e ácido galacturónico em NC2 (Figuras 3.9 e 3.10). A identificação dos sinais (Tabela 3.12) foi baseada nos valores de espectros publicados de "arabinanas" (Joseleau *et al.*, 1977, 1983; Capek *et al.*, 1983; Swamy e Salimath, 1991), arabinosídeos (Akiyama *et al.*, 1980) e pectinas (Pressey e Himmelsbach, 1984; Keenan *et al.*, 1985; Ryden *et al.*, 1989).

O espectro da fracção NC1 revela a presença de resíduos de $\alpha\text{-L-Araf}$ em ligação (1 \rightarrow 5), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 3,5) e terminal. A presença de sinais intensos a 103,7, 78,6, 76,6, 84,3 e 65,3 ppm mostra que 30 a 40% da arabinose em ligação terminal existe como anómero β . O interesse deste resultado reside no facto de, até ao momento, não serem conhecidas referências quanto à presença de resíduos de $\beta\text{-L-Araf}$ em pectinas; estes resíduos são geralmente apontados como sendo característicos de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Akiyama *et al.*, 1980).

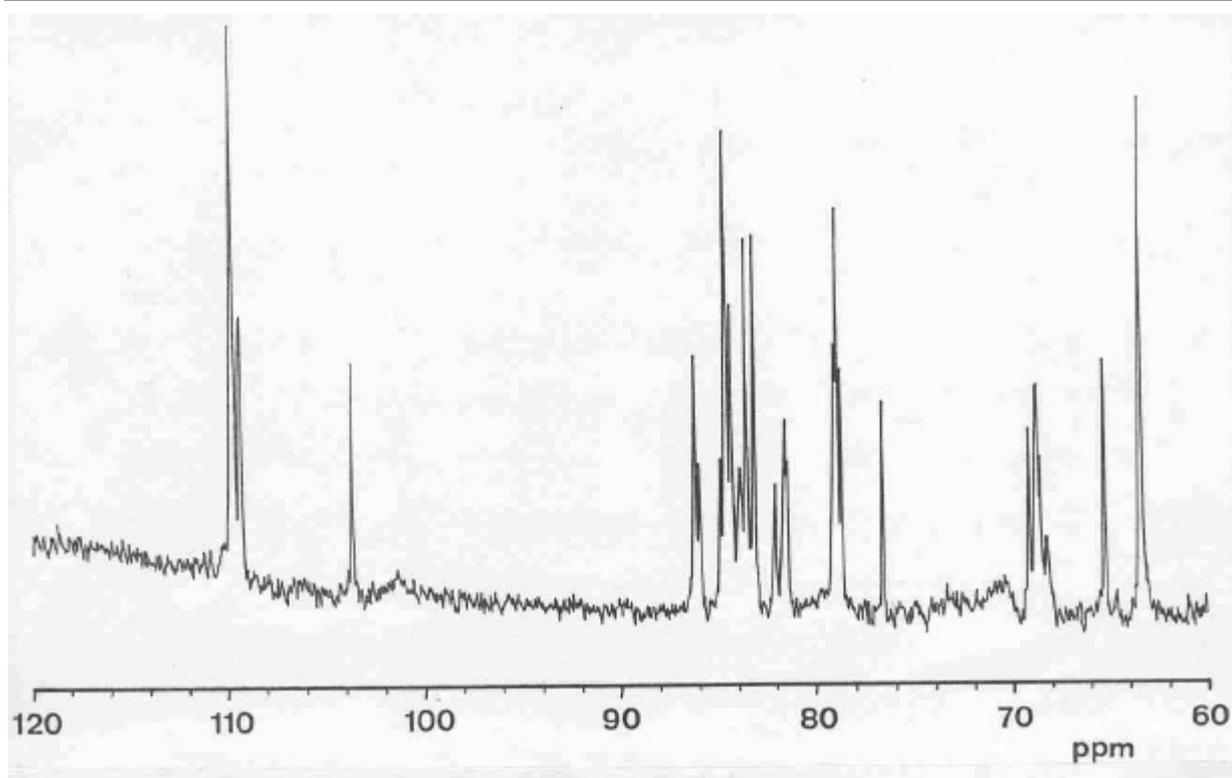


Figura 3.9 - Espectro de RMN de ¹³C do polissacarídeo pécico da fracção NC1.

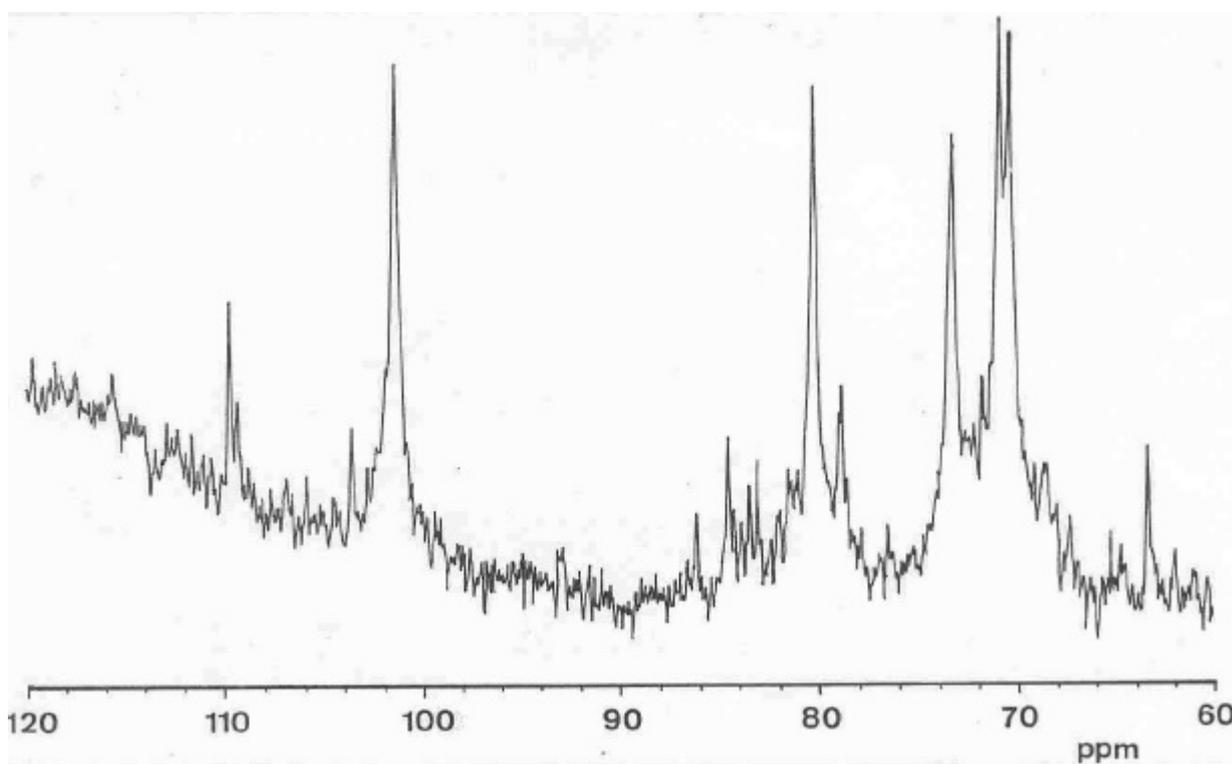


Figura 3.10 - Espectro de RMN de ¹³C do polissacarídeo pécico da fracção NC2.

Tabela 3.12 - Identificação dos sinais dos espectros de ^{13}C das fracções NC1 e NC2.

Resíduo	desvio químico (δ)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
T- α -L-Araf	109,8	83,5	78,8	86,1	63,4	-
T- β -L-Araf	103,7	78,6	76,6	84,3	65,3	-
(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf	109,4	83,1	84,8?	84,6?	63,4	-
(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf	109,8	83,5	79,0	84,6	69,2	-
(1 \rightarrow 3,5)- α -L-Araf	109,4	83,1	84,6	83,8	68,8	-
(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA	101,4	70,4	71,0	80,3	73,3	178

O espectro da fracção NC2 mostra sinais muito mais largos do que os do espectro anterior. Este alargamento dos sinais, característicos do ácido galacturónico, é devido possivelmente à rigidez motricional da cadeia de ácido galacturónico, que contrasta com a mobilidade das cadeias laterais (Seymour *et al.*, 1990). A maior parte dos resíduos encontram-se em ligação (1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA. No espectro é ainda notada a presença de sinais característicos dos resíduos de arabinose encontrados em NC1.

3.5.3 - Fracções Extraídas com 1M KOH

A ocorrência de xiloglucanas pode ser inferida pela presença de Glcp em ligação (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 4,6), Xylp em ligação terminal e (1 \rightarrow 2) e Galp em ligação terminal. A presença de xilanas acídicas pode ser inferida pela presença de Xylp em ligação (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 2,4) e GlcpA em ligação terminal. Na maioria das fracções hemicelulósicas (K1A, K1B, K1Cu, K10 e K6) foi obtida evidência da ocorrência de resíduos GlcpA em ligação terminal (Tabela 3.13). A fracção K1A contém quer xiloglucanas quer glucuronoxilanas. Como o grau de polimerização é relativamente baixo, é possível que K1A seja um complexo contendo principalmente glucuronoxilana e xiloglucana.

A fracção K1B foi retida na coluna de troca aniónica, sendo eluída com 0,125M NaCl. Ela continha ligações glicosídicas usualmente associadas às glucuronoxilanas e polissacarídeos pécticos, sendo muito provavelmente um complexo constituído por estes dois polissacarídeos.

Tabela 3.13 - Composição das ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes dos extractos de 1M KOH a 1° C (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção							
	sobrenadante (Hemicel. B)			precipitado (Hemicelulose A)				
	K1A*	K1B	K1B*	K1R	K1Cu*	K10	K10*	K6*
2-Rhap	-	0,4	0,4	-	-	-	-	0,2
3-Rhap	0,2	0,4	0,4	-	0,3	0,5	0,2	0,3
2,4-Rhap	-	0,5	0,6	-	-	-	-	0,3
3,4-Rhap	-	-	-	-	-	-	0,2	-
T-Fucp	0,3	-	-	-	-	-	-	-
T-Araf	6,1	2,9	2,9	1,7	0,5	0,4	0,3	2,4
2-Araf	0,4	-	-	-	-	-	-	-
3-Araf	0,7	1,5	1,5	1,1	-	-	-	0,6
5-Araf	2,6	4,6	4,7	2,9	2,8	-	-	2,0
3,5-Araf	2,6	6,2	5,6	3,9	-	0,7	-	2,2
Arabinitol	0,2	0,6	0,5	1,3	-	-	-	-
T-Xylp	3,4	0,6	0,5	-	0,4	0,3	0,4	0,7
2-Xylp	7,6	-	-	-	-	-	-	-
4-Xylp	23,3	63,1	61,3	9,0	79,4	80,8	81,5	71,9
2,4-Xylp	8,5	11,2	10,4	2,2	10,8	11,8	12,5	12,4
Xilitol	0,8	0,9	0,9	0,4	1,1	0,7	0,5	0,7
4-Manp	2,1	-	-	-	-	-	-	-
4,6-Manp	0,5	-	-	-	-	-	-	-
T-Galp	4,0	-	-	-	-	-	-	-
4-GalpA	-	-	1,1	-	-	-	-	0,6
T-Glcp	0,3	0,4	0,3	0,8	0,5	0,4	0,4	-
4-Glcp	9,0	1,0	0,8	61,0	-	1,3	-	-
2,4-Glcp	0,5	-	-	2,4	-	-	-	-
3,4-Glcp	0,5	-	-	2,8	-	-	-	-
4,6-Glcp	21,2	3,2	1,5	3,9	-	-	-	0,6
Glucitol	1,7	2,8	1,8	6,6	0,2	3,2	0,2	0,3
T-GlcpA	3,5	-	4,8	-	4,2	-	3,8	4,8
D.p. Xyl ⁺					227	310	236	121
B.p. Xyl [#]					12	13	13	15

* Amostras reduzidas com LiAlD₄;

+ Grau de polimerização das xilanas;

Percentagem de pontos de ramificação das xilanas.

K1R era a fracção insolúvel obtida do extracto de 1M KOH 1°C. Este material foi difícil de dispersar em DMSO, permanecendo uma pequena porção insolúvel, facto que deve estar relacionado

com o alto valor encontrado para o glucitol. No entanto, pode ser inferido que esta fracção tinha quantidades significativas de uma glucana e uma porção muito pequena de xilana.

O material precipitado com a solução alcalina de acetato de cobre (K1Cu) era uma glucuronoxilana. Esta fracção foi purificada por fraccionamento por diminuição do pH (ver ponto 2.12.2) originando a fracção K10 cujo maior componente (>95%) era uma xilana contendo 13% de ramificação e um grau de polimerização médio de 250, tal como inferido pela razão da totalidade dos resíduos de xilose em relação aos resíduos de xilose em ligação terminal.

O maior componente da fracção K6 era uma xilana que possivelmente se encontrava contaminada com uma pequena quantidade de um polissacarídeo pécico.

a) Espectroscopia de RMN de ^{13}C da Xilana da Fracção K10

A espectroscopia de RMN de ^{13}C (Figura 3.11) foi utilizada para determinar a configuração anomérica dos resíduos de açúcar da xilana da fracção K10 e também para comparar as proporções relativas das diversas ligações dos vários resíduos. A identificação dos sinais (Tabela 3.14) foi baseada nos valores publicados para β -metil glicosídeos de (1 \rightarrow 4)- β -D-xilo-oligossacarídeos (Kováč e Hirsch, 1982) e para o ácido tri-D-xilo-4-O-metil-D-glucurónico (Excoffier *et al.*, 1986).

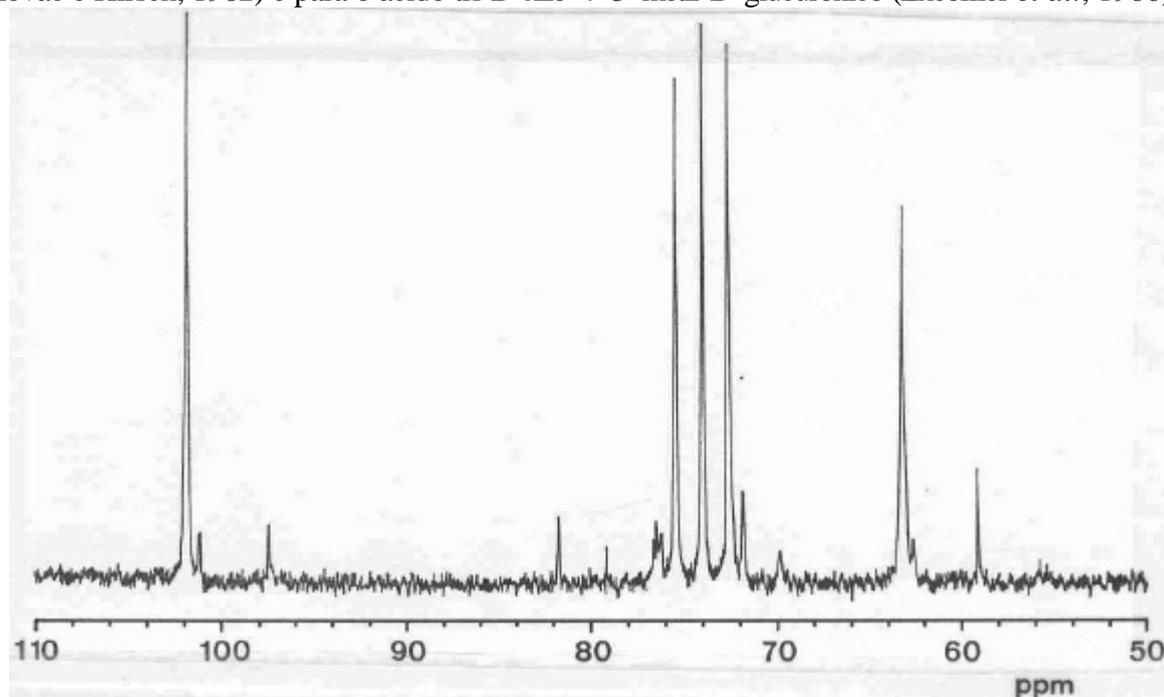


Figura 3.11 - Espectro de RMN de ^{13}C da xilana da fracção K10.

Tabela 3.14 - Identificação dos sinais do espectro de ^{13}C da fracção K10.

Resíduo	desvio químico (δ)						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	4-O-Me
(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp	101,7	72,6	74,0	75,4	63,2	-	-
(1 \rightarrow 2,4)- β -D-Xylp	101,1	79,1	(*)	76,6	62,6	-	-
T- α -D-GlcpA	97,4	71,8	(*)	81,7	69,8	171,6	59,1

(*) - sinais não identificados no espectro.

Do espectro de RMN de ^{13}C pode ser inferido que os resíduos de xilose se encontram em ligação β -(1 \rightarrow 4) e o ácido glucurónico terminal se encontra em ligação α e, pelo sinal a 59,1 ppm para o 4-O-Me, pode ser inferido que a maioria do ácido glucurónico possui um grupo metilo substituinte no carbono 4. A partir da razão das áreas do C-1 dos resíduos de xilose em ligação (1 \rightarrow 4) + (1 \rightarrow 2,4) em relação aos resíduos de xilose em ligação (1 \rightarrow 2,4) pode ser inferido que 1 em 11 resíduos de xilose se encontra ramificado. Este valor é ligeiramente superior mas da mesma ordem de grandeza do valor encontrado para o grau de pontos de ramificação obtidos por análise das ligações glicosídicas, a qual sugere que 1 em cada 8 resíduos de xilose é ramificado.

3.5.4 - Fracções Extraídas com 4M KOH

Pode-se inferir que os maiores componentes das fracções K3A e K4A (Tabela 3.15) são xiloglucomananas pouco ramificadas (ou uma mistura de xiloglucanas e glucomananas) pela ocorrência de Glcp e Manp em ligação (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 4,6). Estas fracções também contêm quantidades significativas de resíduos de Ara β em ligação (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3) e terminal, os quais são característicos de glicoproteínas da parede celular ricas em hidroxiprolina (O'Neill e Selvendran, 1980a). A ocorrência de Ara β em ligação (1 \rightarrow 3) não é diagnóstica neste caso uma vez que os polissacarídeos pécticos da polpa da azeitona (C1-60, C1A, NC1 e NC2) contêm quantidades significativas destes resíduos. A quantidade de hidroxiprolina (Hyp) em K3A e K4A foi de 2,5% e 3,7% (0,19 e 0,28 $\mu\text{mol}/\text{mg}$), respectivamente, em relação ao peso seco. Estes

Tabela 3.15 - Composição das ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes dos extractos de 4M KOH e 4M KOH + borato (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Frac�o							
	4M KOH			4M KOH + borato				
	K3A	K3C	K3C*	K4A	K4B	K4B*	K4C	K4C*
2-Rhap	-	1,7	2,4	0,4	1,7	2,7	2,0	3,0
3-Rhap	-	0,2	0,3	-	-	-	0,2	0,3
2,4-Rhap	-	0,8	1,8	0,3	0,9	1,8	1,2	2,1
3,4-Rhap	-	0,4	2,4	-	-	-	0,3	0,3
T-Fucp	-	0,4	0,5	-	-	-	0,3	0,3
T-Araf	10,9	16,6	18,5	16,1	24,4	22,1	21,6	19,2
2-Araf	13,0	4,2	2,1	20,3	7,0	3,4	6,7	3,1
3-Araf	7,1	6,3	5,8	12,2	11,5	10,0	9,3	8,1
5-Araf	4,0	15,2	15,3	7,3	24,2	24,6	19,2	19,8
3,5-Araf	3,4	15,2	15,7	6,9	21,3	21,2	19,0	19,7
Arabinitol	0,3	3,5	0,7	0,5	0,7	0,8	1,1	0,9
T-Xylp	0,6	1,7	2,6	0,4	0,5	0,5	1,0	1,1
2-Xylp	0,9	-	-	0,7	-	-	0,1	0,1
4-Xylp	2,1	0,7	1,5	1,3	-	-	0,5	0,5
2,3-Xylp	-	0,5	0,6	-	-	-	0,3	-
2,4-Xylp	-	-	-	-	0,6	0,5	0,5	0,4
Xilitol	-	0,7	0,5	-	0,2	-	0,4	0,3
T-Manp	0,6	-	-	0,3	-	-	-	-
4-Manp	17,5	1,7	1,0	10,4	0,5	0,7	1,0	0,8
6-Manp	0,5	-	-	-	-	-	-	-
4,6-Manp	5,3	0,2	-	3,1	-	-	-	-
T-Galp	6,7	7,1	8,6	3,7	2,7	2,5	3,8	3,4
2-Galp	1,4	-	-	0,7	-	-	-	-
3-Galp	0,4	-	-	0,3	-	-	-	-
4-Galp	0,5	1,1	1,0	1,4	0,2	1,0	0,8	1,2
6-Galp	-	0,3	-	-	-	-	-	-
3,4-Galp	-	-	-	-	0,3	0,4	0,3	0,4
3,6-Galp	1,0	1,1	-	0,7	-	0,4	-	-
4,6-Galp	-	0,2	3,2	-	-	-	0,2	-
T-GalpA	-	-	0,7	-	-	0,3	-	0,7
4-GalpA	-	-	4,9	-	-	3,9	-	6,0
2,4-GalpA	-	-	-	-	-	-	-	0,4
3,4-GalpA	-	-	0,9	-	-	0,2	-	0,5
T-Glcp	0,4	-	-	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
4-Glcp	18,3	4,4	4,6	10,0	0,2	1,2	4,2	3,9
2,4-Glcp	-	0,4	0,2	-	-	-	0,4	0,3
4,6-Glcp	4,9	2,5	3,2	2,8	1,2	1,0	1,9	2,1
Glucitol	0,2	13,1	2,0	-	1,5	0,4	2,3	0,9
T-GlcpA	-	-	0,3	-	-	0,3	-	-
2,3-GlcpA	-	-	0,6	-	-	-	-	-

* Amostras reduzidas com LiAlD₄.

valores são significativos quanto à presença deste aminoácido nestas fracções. Os resíduos de Hyp, T-Araf, (1→2)-Araf e (1→3)-Araf encontram-se numa razão de 1 : 1,8 : 2,2 : 1,2 em K3A e 1 : 2,5 : 3,2 : 1,9 em K4A, sendo provável que a maioria destes resíduos seja proveniente dos tetra-arabino-sídeos ligados à Hyp em que a proporção de T-Araf para (1→2)-Araf para (1→3)-Araf é 1:2:1 (Akiyama *et al.*, 1980). As pequenas quantidades de resíduos de Araf em ligação (1→5) e (1→3,5) e alguns resíduos de Araf em ligação terminal em ambas as fracções poderão ter sido provenientes dos polissacarídeos pécticos associados.

A partir da composição glicosídica das fracções K3C, K4B e K4C pode ser visto que os maiores componentes destas fracções são polissacarídeos pécticos e glicoproteínas ricas em Hyp. Os vários resíduos de arabinose provenientes dos polissacarídeos pécticos parecem reter as mesmas proporções relativas verificadas nas fracções de CDTA e Na₂CO₃. O facto destas fracções terem sido retidas na coluna de troca aniónica e eluídas como picos homogéneos, permite que se infira serem semelhantes aos complexos isolados de *Vicia faba* (Pusztai e Watt, 1969) e parênquima da vagem do feijão (Ryden e Selvendran, 1990a).

3.5.5 - Fracções do resíduo rico em celulose (RC1)

A fracção sn-RC (Tabela 3.16, colunas 1 e 2) era rica em polissacarídeos pécticos comparáveis aos presentes nas fracções C1-60, C1A, NC1 e NC2. O resíduo insolúvel continha muita celulose e uma pequena mas significativa quantidade de polissacarídeos pécticos e glicoproteínas. A maioria destes polímeros foram solubilizados com clorito/ácido acético e a fracção neutra obtida pela passagem pela coluna de troca aniónica continha quantidades significativas de polissacarídeos pécticos e glicoproteínas ricas em Hyp. As fracções ChB e ChC eram ricas em polissacarídeos pécticos comparáveis às várias fracções pécticas analisadas. O facto de ter sido necessária a utilização de clorito para a sua solubilização mostra que estes polímeros estavam ligados por ligações de "cross-linking" dentro da matriz de celulose por compostos fenólicos.

Tabela 3.16 - Composição das ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes de RC1 (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção									
	sn-RC	sn-RC*	RC2	Clorito						RF
				ChA	ChA*	ChB	ChB*	ChC	ChC*	
2-Rhap	2,1	3,7	1,0	1,6	1,9	2,1	2,9	2,7	3,9	0,9
3-Rhap	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,1	-
2,4-Rhap	1,1	2,2	0,8	1,4	1,5	1,1	2,1	1,3	2,4	0,3
3,4-Rhap	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1	-
T-Fucp	-	0,2	0,4	-	-	-	-	0,2	0,2	-
T-Arap	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
T-Araf	22,1	21,5	6,9	12,3	15,3	23,1	21,3	24,0	19,8	4,5
2-Araf	0,6	0,4	0,4	4,8	2,4	1,2	0,7	0,6	0,4	0,3
3-Araf	10,4	9,5	2,6	11,1	11,8	9,6	8,9	10,0	8,7	1,7
5-Araf	26,7	23,8	8,2	24,3	24,4	26,3	25,1	28,0	24,1	5,2
2,5-Araf	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
3,5-Araf	27,2	24,3	8,0	27,1	26,7	24,8	23,8	25,0	22,1	5,2
Arabinitol	1,0	0,7	0,6	1,5	-	1,0	0,8	1,1	0,7	0,8
T-Xylp	0,5	0,4	0,6	-	-	0,4	0,4	0,5	0,4	0,7
2-Xylp	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	1,4
4-Xylp	1,9	0,8	6,0	2,9	2,9	-	-	0,3	0,2	6,8
2,3-Xylp	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	-
2,4-Xylp	1,6	-	-	1,1	1,3	0,6	0,7	0,6	0,5	0,8
Xilitol	-	0,4	1,4	-	-	0,4	-	0,2	-	0,5
4-Manp	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	2,4
4,6-Manp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
T-Galp	1,2	1,2	0,6	0,8	0,9	1,5	2,2	1,7	1,3	-
3-Galp	-	0,8	-	0,4	-	-	-	-	0,6	-
4-Galp	1,6	1,3	-	3,2	3,2	0,8	1,1	0,7	1,4	-
3,4-Galp	-	0,4	-	-	-	0,3	0,4	0,4	-	0,1
3,6-Galp	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
4,6-Galp	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,2
T-GalpA	-	0,3	-	-	0,4	-	0,3	-	0,6	-
4-GalpA	-	5,9	-	-	5,0	-	4,5	-	9,6	-
2,4-GalpA	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,2	-
3,4-GalpA	-	0,2	-	-	-	-	0,3	-	0,3	-
T-Glcp	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,6
4-Glcp	-	0,5	56,2	1,3	1,2	2,8	2,6	0,5	0,5	62,4
2,4-Glcp	-	0,1	-	0,3	-	-	-	0,1	0,2	0,3
3,4-Glcp	-	-	1,2	-	-	-	-	-	0,4	0,4
4,6-Glcp	-	0,4	3,3	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	2,3
Glucitol	2,0	0,2	1,8	5,2	0,5	2,2	0,5	0,9	0,3	1,5

* Amostras reduzidas com LiAID₄.

A ocorrência no resíduo final (RF) de pequenas mas significativas quantidades de resíduos de arabinose possuindo diversas ramificações, resíduos de xilose e resíduos de manose juntamente com resíduos de glucose em ligação (1→4) mostra que os polímeros que se encontram interligados no complexo celulósico não podem ser completamente removidos.

3.6 - Discussão Geral

Os maiores problemas do estudo dos aspectos estruturais das paredes celulares prendem-se com o isolamento e solubilização dos polímeros constituintes com a menor degradação possível. Os procedimentos utilizados neste estudo removeram uma grande porção dos componentes intracelulares incluindo o óleo, o qual foi completamente removido; uma pequena quantidade das substâncias fenólicas encontrava-se associada ao material da parede celular (CWM) tendo sido impossível a sua remoção, proporcionando uma cor verde clara ao CWM. O CWM foi mantido hidratado, tendo sido guardado como suspensão congelada em vez de ter sido liofilizado. O resíduo rico em celulose (RC1) obtido após extracção sequencial com vários solventes inorgânicos continha quantidades significativas de polissacarídeos pécticos e pequenas quantidades de glicoproteínas da parede celular. Uma porção destes polissacarídeos pécticos (aparentemente) interligados por ligações de "cross-linking" foi solubilizada simplesmente ao deixar o RC1 mergulhado em água destilada. Esta observação é pertinente visto que em trabalhos anteriores, como com o parênquima da vagem do feijão, o resíduo rico em celulose (α -celulose) era directamente tratado com clorito / ácido acético para solubilização de polímeros ligados por ligações de "cross-linking" (Ryden e Selvendran, 1990a). A ocorrência de polissacarídeos pécticos e algumas glicoproteínas ricas em Hyp em RC2 e a sua solubilização com clorito / ácido acético sugere claramente que estes polímeros estão contidos e - entrelaçados de uma maneira muito forte com as microfibrilhas de celulose, tendo esta propriedade que ser tomada em atenção em qualquer modelo realístico da parede celular de tecidos parenquimatosos.

Os polissacarídeos pécticos da polpa da azeitona consistiam num conjunto de polímeros estruturalmente semelhantes que diferiram largamente na facilidade de extracção da matriz da parede celular. Curiosamente, as proporções relativas das várias ligações dos resíduos de arabinose em todos os polissacarídeos pécticos examinados são altamente comparáveis. A este propósito, deve ser lembrado o facto de que nas fracções pécticas que possuem quantidades significativas de glicoproteínas da parede celular deve ser feita uma correcção para a ocorrência de resíduos de arabinose encontrados nas glicoproteínas da parede. Alguns dos polímeros pécticos (como as fracções K3C, K4B, K4C e ChA) podem estar unidos por ligações fenólicas com as glicoproteínas ricas em Hyp. A ocorrência de complexos entre polissacarídeos pécticos e glicoproteínas têm sido descritos em outros tecidos (Ryden e Selvendran, 1990a, Pusztai e Watt, 1969). Outra semelhança com o material glicosídico das glicoproteínas ricas em Hyp é a presença nas substâncias pécticas da polpa da azeitona de quantidades relativamente elevadas de resíduos de β -arabinose.

As fracções solúveis em 1M KOH continham quantidades significativas de xilanas juntamente com polissacarídeos pécticos. Xilanas relativamente puras, livres de polissacarídeos pécticos associados, foram isoladas dos precipitados obtidos por neutralização destes extractos. Curiosamente, as hemiceluloses do sobrenadante parecem ser constituídas por xiloglucanas associadas a xilanas. Este facto contrasta com as quantidades significativas de xiloglucanas puras que têm sido isoladas de outros tecidos moles como o parênquima da vagem do feijão (Ryden e Selvendran, 1990a), batata (Ryden e Selvendran, 1990b) e cebola (Redgwell e Selvendran, 1986). É muito provável que uma grande quantidade das glucuronoxilanas fosse proveniente dos escleritos lenhificados da polpa da azeitona (Winton e Winton, 1932). Uma glucuronoxilana foi também isolada da polpa da pêra (Jermyn e Isherwood, 1956) e da polpa do damasco mongol (Odonmazig *et al.*, 1985 e 1990), sendo muito provável que a xilana seja proveniente das células lenhificadas que se encontram dispersas na polpa e que servem de pontos de junção das células de parênquima fortalecendo a estrutura. Recentemente, em polpa de goiaba, Marcelin *et al.* (1993) mostraram que xilanas acídicas também ocorrem nas células parenquimatosas da polpa destes frutos depois da remoção dos escleritos. Por microscopia óptica, que mostrou uma quantidade significativa de escleritos na vizinhança do caroço, e também por análises de açúcar e de metilação das diferentes camadas da polpa, verificou-se um claro aumento de escleritos na direcção do caroço.