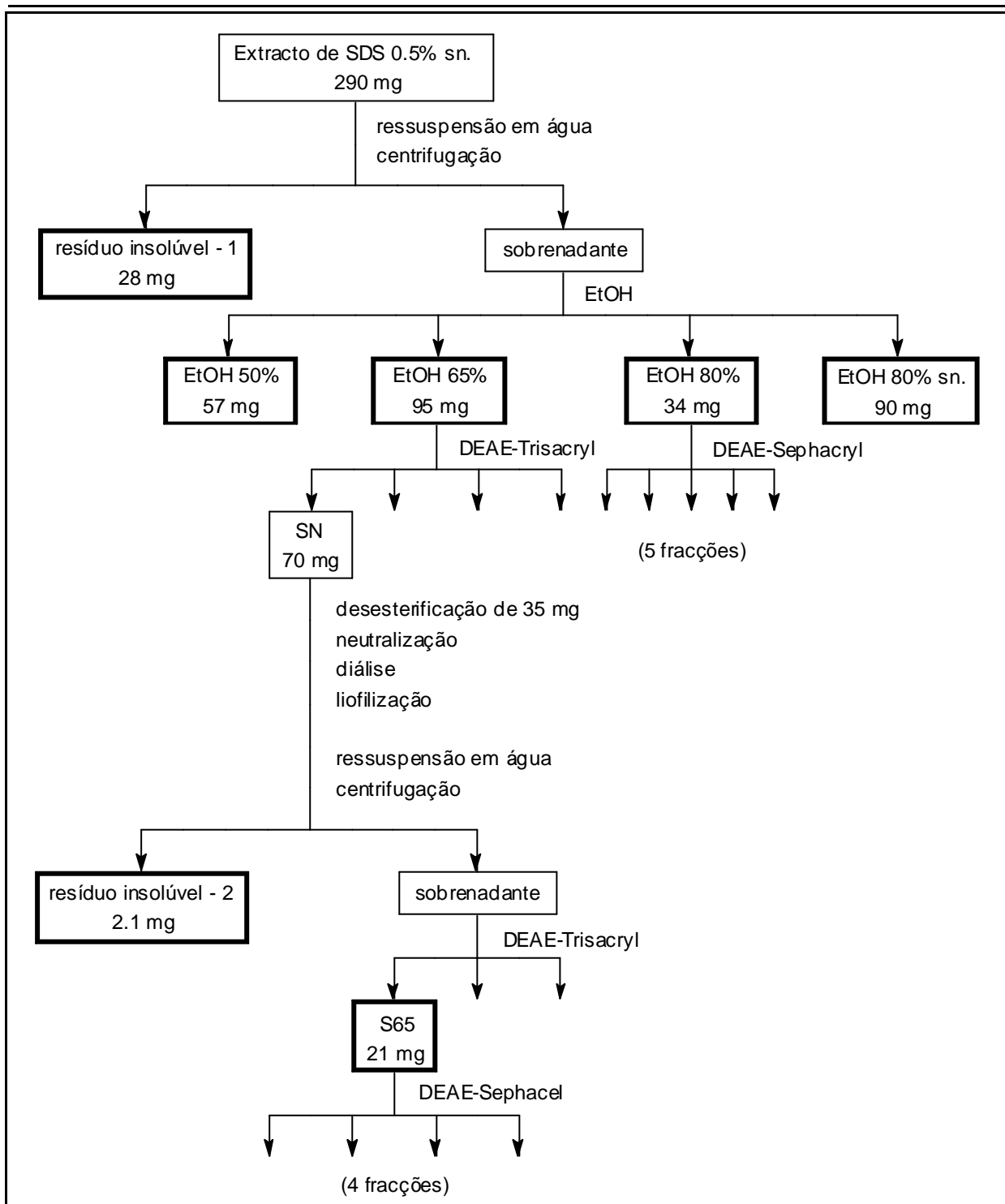

4.1 - Caracterização dos Polímeros do Extracto de SDS 0,5%

4.1.1 - Precipitação com Etanol

O material solubilizado com SDS 0,5% foi dialisado exaustivamente para remoção do detergente e o óleo remanescente foi removido por extracção com CHCl_3 :MeOH (2:1). Foram recolhidas e liofilizadas duas fracções, uma solúvel e outra insolúvel, tal como descrito no ponto 2.4.1 e Esquema 2.2. A fracção do extracto de SDS 0,5% que permaneceu solúvel em água foi seguidamente fraccionada por precipitação em etanol e cromatografia de troca aniónica; o procedimento utilizado encontra-se resumido no Esquema 4.1.

O material da fracção solúvel foi ressuspendido em água, sendo removido um resíduo insolúvel que se verificou ser pobre em açúcares; a parte solúvel foi submetida a precipitação gradual com soluções de etanol sendo obtidas 4 fracções. O rendimento e composição em açúcares das fracções obtidas são mostrados na Tabela 4.1. A primeira fracção precipitou com 50% de etanol e era muito rica em ácido urónico, possivelmente de origem péctica. A fracção mais abundante foi obtida com 65% de etanol, sendo rica em xilose, ácido urónico, arabinose e galactose. Esta composição em açúcares sugere a presença de xilanas, substâncias pécticas e possivelmente proteínas ricas em arabinogalactanas. Uma fracção rica em arabinogalactanas, provavelmente de origem proteica, foi precipitada com 80% de etanol. Esta fracção, para além de ser rica em arabinose e galactose, também continha quantidades apreciáveis de xilose e glucose, possivelmente provenientes de xilanas e xiloglucanas solúveis em água fria. A fracção solúvel em 80% de etanol corresponde a 31% do material e era relativamente pobre em açúcares.



Esquema 4.1 - Fraccionamento dos polímeros da fracção solúvel do extracto de SDS 0,5%.

4.1.2 - Fraccionamento dos Polímeros Precipitados com 65% de Etanol

O material precipitado com 65% de etanol foi dissolvido em 50mM de tampão fosfato e fraccionado por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl pH 6,5, originando 4 fracções

(Figura 4.1). A fracção eluída com tampão (SN) foi a mais abundante, sendo constituída principalmente por xilose (43%) e ácido urónico (35%), sugerindo a presença de xilanas e de polissacarídeos pécticos. As fracções retidas na coluna eram todas pobres em xilose e ricas em arabinose sendo provável que sejam compostas por polissacarídeos pécticos. Com o objectivo de ser obtida informação acerca da natureza da associação entre os polissacarídeos pécticos e as "xilanas", o complexo foi tratado com uma base em condições suaves de forma a hidrolisar ligações éster de "cross-linking".

Tabela 4.1 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas pelo SDS 0,5% a partir do CWM da polpa da azeitona fresca após precipitação com etanol seguida de cromatografia de troca aniónica.

Fracção	Rend. (%)	Hyp ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
SDS 0,5%											
resíduo insolúvel	9,7	1,0	2	v	22	20	4	13	9	30	396
EtOH 50%	19,7	1,2	2	v	20	17	3	8	7	43	791
EtOH 65%	32,8	3,5	2	v	19	32	1	12	5	29	778
DEAE-Trisacryl											
Tampão (SN)	78,9		1	1	7	43	1	6	6	35	782
0,125M NaCl	13,3		4	-	55	1	v	10	2	28	689
0,25M NaCl	5,6		4	1	39	3	3	19	14	17	447
0,5M NaCl	2,2		1	v	41	1	3	23	12	19	235
EtOH 80% (S80)	11,7	7,0	1	v	25	23	9	25	10	7	834
EtOH 80% sn.	31,0	2,8	5	-	45	7	8	10	19	6	310

* Valores expressos em μg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

Após desesterificação da fracção SN com uma solução diluída de NaOH foi obtido um resíduo insolúvel muito rico em ácido urónico em que a razão Xyl/Ác.Ur. era 1:3 (Tabela 4.2). O sobrenadante foi fraccionado por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl pH 6,5 dando 3 fracções (Figura 4.2). A fracção mais abundante (S65) continha material que não ficou retido na coluna, sendo muito rica em xilose com uma razão Xyl/Ác.Ur. de 4:1 (Tabela 4.2). As fracções acídicas não possuíam quantidades significativas de xilose e eram ricas em ácido urónico e arabinose, numa razão Ác.Ur./Ara de 2:1 e 3:1, característica de substâncias pécticas.

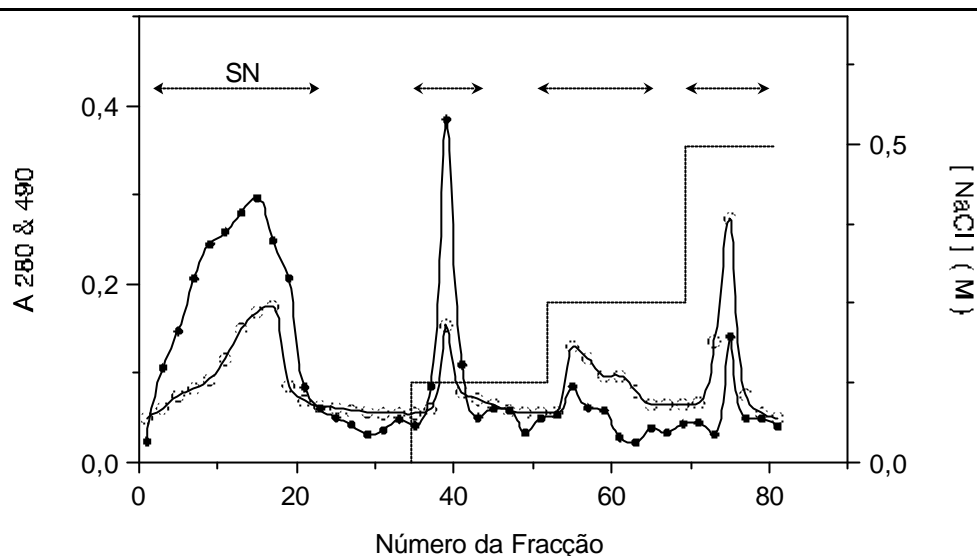


Figura 4.1 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M da fracção EtOH 65% do extracto de SDS 0,5%.

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

Tabela 4.2 - Composição em açúcares das fracções obtidas por desesterificação da fracção SN e cromatografia em DEAE-Trisacryl e DEAE-Sephacel (forma de borato) da fracção neutra.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>SN desesterific.</i>										
resíduo insol. - 2	6,0	1	v	5	22	1	4	5	62	749
Tampão (S65)	57,9	1	-	6	63	1	6	8	15	746
<i>DEAE-Sephacel</i>										
S65-A	18,7	v	v	5	54	v	10	18	13	782
S65-B	27,1	v	v	4	59	1	4	13	19	748
S65-C	9,0	v	-	8	35	4	8	28	17	583
S65-D	30,7	v	-	6	65	v	5	2	22	958
0,25M NaCl	4,6	3	-	24	4	3	15	9	42	423
0,5M NaCl	6,3	6	-	17	3	2	11	11	50	281

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

O facto de, por tratamento alcalino, se ter obtido uma fracção rica em substâncias pécicas (fracção insolúvel) e uma fracção rica em xilanas acídicas (fracção solúvel) sugere que a xilana e a pectina se encontravam associadas por ligações éster num complexo xilana-pectina.

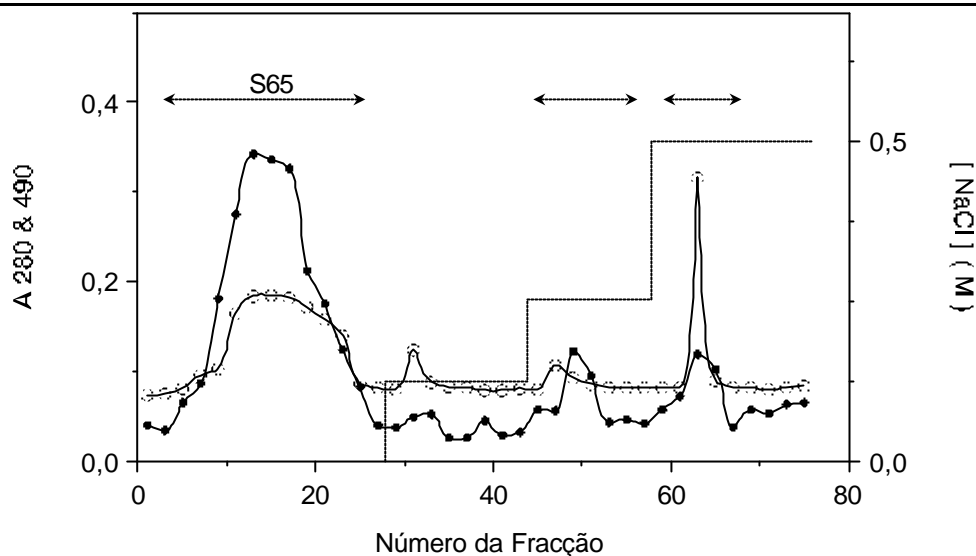


Figura 4.2 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M da fracção SN desesterificada.

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

A fracção S65 foi seguidamente fraccionada por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Sephacel em tampão borato, pH 8,0 com gradiente de borato de 30mM a 1M sendo obtidas 4 fracções (Figura 4.3 e Tabela 4.2). A composição em açúcares das fracções obtidas era comparável à da amostra inicial (S65), exibindo heterogeneidade em fracções ricas em xilanas e possivelmente também xiloglucanas (S65-A, b e C). Como a composição em açúcares era semelhante, a metilação foi efectuada na fracção S65, sendo os resultados apresentados e discutidos no ponto 4.1.4.

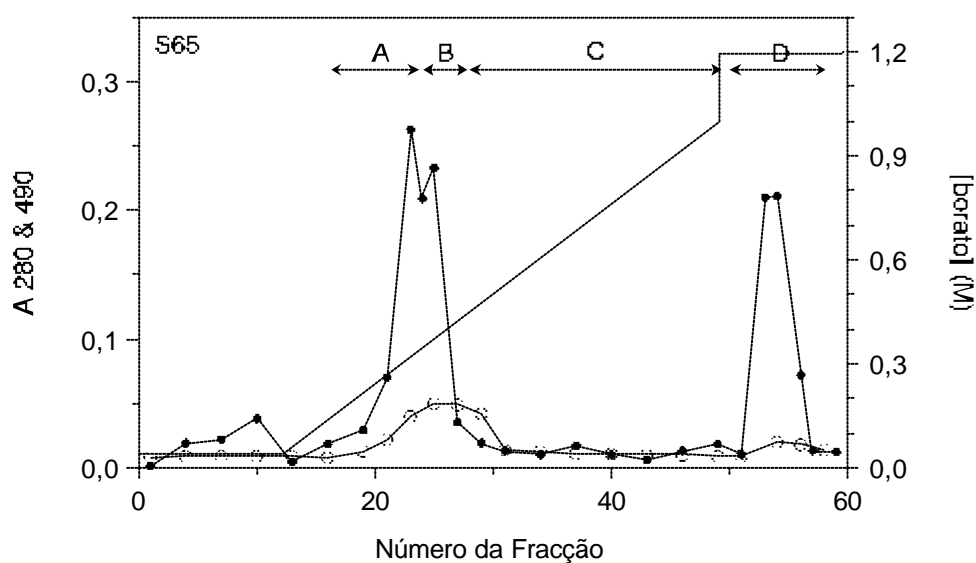


Figura 4.3 - Cromatografia em DEAE-Sephacel da fracção S65.

• - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de borato de sódio

4.1.3 - Fraccionamento dos Polímeros Precipitados com 80% de Etanol

O material precipitado com 80% de etanol foi fraccionado por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Sephacel em tampão borato, pH 8,0 com gradiente de borato de 30mM até 1M sendo obtidas 5 fracções (Figura 4.4 e Tabela 4.3). A fracção mais abundante (S80-B) foi eluída no início do gradiente e era muito rica em xilose (46mol%), encontrando-se presentes também arabinose, ácido urónico, galactose, glucose e manose, correspondendo os açúcares a 88% do material. A fracção S80-C, não totalmente resolvida da S80-B, era rica em manose e também arabinose e galactose; as fracções S80-D e S80-E eram ricas em arabinose e galactose. A presença de quantidades significativas de Hyp nas fracções S80-C, D e E permite inferir que estas fracções possuíam proteínas ricas em arabinogalactanas.

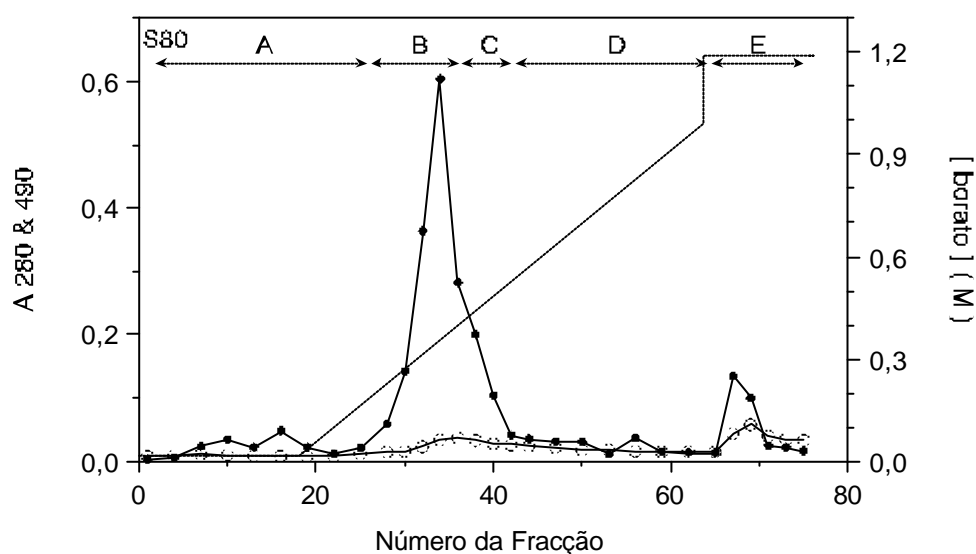


Figura 4.4 - Cromatografia em DEAE-Sephacel da fracção S80.

• - A_{490} ; ○ - A_{280} ; ----, gradiente de borato de sódio

Tabela 4.3 - Composição em açúcares das fracções obtidas por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Sephacel da fracção S80.

Fracção	Rend. (%)	Hyp ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.		
S80												
DEAE-Sephacel												
S80-A	3,6	nd	-	-	8	26	1	33	25	7	483	
S80-B	33,2	1,3	v	v	13	46	6	12	11	12	884	
S80-C	17,1	7,2	1	-	25	5	23	24	16	6	853	
S80-D	3,6	15,2	2	v	36	10	3	29	8	12	713	
S80-E	11,2	13,1	2	v	38	14	1	25	3	17	872	

* Valores expressos em μg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

nd = não determinada

4.1.4 - Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação

As fracções S65 (Tabela 4.2) e S80 (Tabela 4.1) foram metiladas e os grupos carboxílicos de parte da fracção S65 foram reduzidos com LiAlD_4 . A fracção S80 foi desesterificada com uma solução alcalina fria antes de ser metilada.

Globalmente, existe uma boa correspondência entre o total de ligações para cada açúcar e a composição em açúcares previamente determinada (Tabela 4.4). O ácido urónico presente na fracção S65 é o ácido glucurónico, existindo todo em ligação terminal. A reacção de redução ocorreu com um rendimento de 50%. A quantidade de galactose nas fracções analisadas é inferior à esperada, encontrando-se a quantidade de xilose ligeiramente inflacionada.

A não detecção, na fracção S65, de resíduos de ácido galacturónico e a presença de baixas quantidades de resíduos de arabinose em ligação (1 \rightarrow 5) sugere que o material pécico se encontra praticamente ausente nesta fracção, tendo sido completamente separado da xilana com o tratamento alcalino. Esta fracção era rica em xilanas acídicas de cadeia curta. A presença de resíduos de (1 \rightarrow 4)-Glc_p, (1 \rightarrow 4,6)-Glc_p e (1 \rightarrow 2)-Xyl_p permite inferir a presença de xiloglucanas muito ramificadas no extracto. Nesta fracção verificou-se um excesso de resíduos de (1 \rightarrow 2)-Xyl_p em relação aos de (1 \rightarrow 4,6)-Glc_p. O valor destes resíduos de xilose pode estar inflacionado visto que os resíduos de (1 \rightarrow

2)-Xylp co-eluem com os resíduos de (1→4)-Xylp sendo as quantidades relativas estimadas pela análise do espectro de massa resultante.

Tabela 4.4 - Composição das ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes do extracto de SDS 0,5% (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção		
	S65	S65*	S80
T-Arap	-	-	0,4
T-Araf	3,9	3,1	17,8
2-Araf	-	-	0,2
3-Araf	0,2	0,3	1,2
5-Araf	1,7	1,2	10,1
3,5-Araf	0,2	0,4	1,7
Arabinitol	1,6	-	-
T-Xylp	5,2	5,1	1,7
2-Xylp	8,9	8,4	3,8
4-Xylp	62,3	58,7	19,3
2,4-Xylp	4,5	6,8	1,4
Xilitol	0,6	-	0,2
4-Manp	0,5	-	7,3
4,6-Manp	-	-	1,3
3-Galp	-	-	3,6
4-Galp	1,5	1,1	1,3
6-Galp	0,2	-	1,6
3,6-Galp	0,8	1,1	13,8
T-Glcp	-	-	0,5
4-Glcp	2,4	2,7	5,7
4,6-Glcp	3,9	3,6	3,3
Glucitol	1,7	0,3	3,8
T-GlcpA	-	7,2	-

* Amostra reduzida com LiAlD₄.

A fracção S80 era rica em arabinogalactanas, uma inferência pela presença de resíduos de galactose em ligação (1→3), (1→6) e (1→3,6) e também pela grande quantidade de arabinose em ligação terminal. Estas arabinogalactanas poderão ser a parte glicosídica de proteínas ricas em arabinogalactanas, muito solúveis em água fria. Tendo em conta os 7,0 µg/mg (0,053 µmol/mg) de

Hyp na fracção S80 (Tabela 4.1) e o facto de a quase totalidade da galactose (223 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 1,24 $\mu\text{mol}/\text{mg}$) ser proveniente da arabinogalactana pode-se inferir a razão Hyp / Gal é de 1:23.

A fracção S80 era também rica em xilanas, substâncias pécticas (devido à presença de quantidades significativas de (1 \rightarrow 5)-Araf), mananas e xiloglucanas. Não foram detectados resíduos de galactose em ligação terminal, característicos de algumas xiloglucanas.

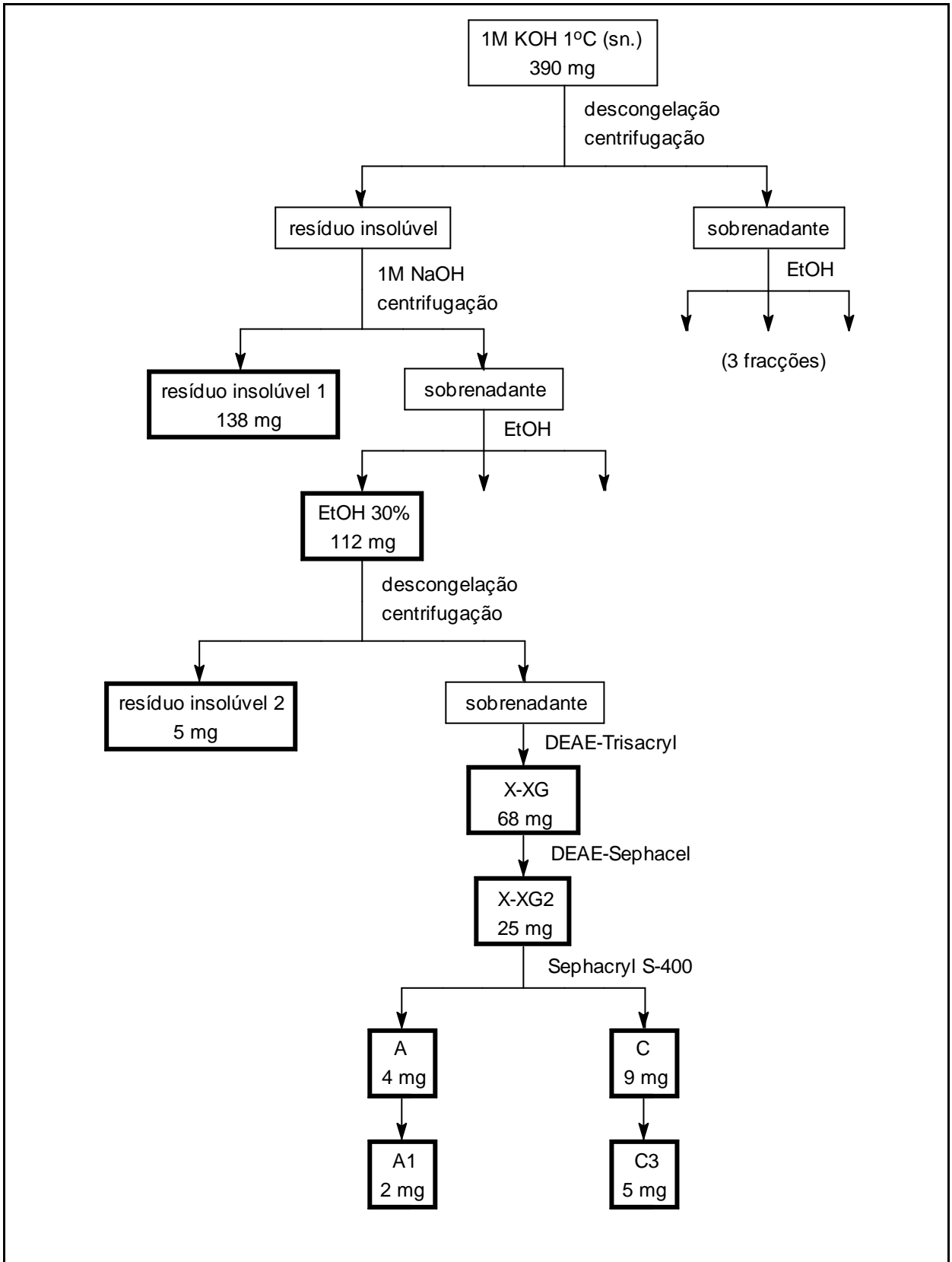
4.2 - Investigação Detalhada de Complexos Xilana-Xiloglucana

4.2.1 - Fraccionamento do Extracto de 1M KOH 1°C (Hemicelulose B)

a) Precipitação com Etanol

O material proveniente do extracto de 1M KOH a 1°C e que permaneceu solúvel em água após a diálise (hemicelulose B) foi fraccionado e analisado no capítulo 3, tendo sido obtida uma fracção (K1A) rica em xiloglucanas e glucuronoxilanas com grau de polimerização relativamente baixo. No Esquema 4.2 descreve-se o procedimento utilizado no fraccionamento em larga escala do restante material desta fracção e a origem das fracções obtidas.

Após a descongelação do extracto foi obtido um precipitado muito abundante que foi tratado com NaOH 1M. O resíduo insolúvel em NaOH 1M correspondia a 37% do material e era muito rico em açúcares, sendo a arabinose o açúcar mais abundante. As fracções solubilizadas com NaOH foram fraccionadas com etanol (Tabela 4.5). A mais abundante foi precipitada com etanol a 30%. Esta fracção era rica em açúcares, contendo principalmente xilose e também arabinose e glucose. A sua composição glicosídica permite supor que se trate de uma fracção rica em complexos de xilana-xiloglucana.



Esquema 4.2 - Isolamento de complexos xilana-xiloglucana.

Tabela 4.5 - Composição em açúcares das fracções obtidas com 1M KOH a 1°C (sobrenadante) fraccionadas de acordo com o Esquema 4.2.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>1M KOH 1 °C</i>										
EtOH 50%	13,8	1	1	15	32	1	9	34	7	904
EtOH 75%	27,2	1	v	13	50	2	4	13	17	929
EtOH 75% sn.	3,1	5	v	34	29	2	6	5	19	185
<i>Mater.sol.NaOH</i>										
EtOH 30%	28,7	1	v	16	56	1	4	15	7	907
res.insol. 2	5,0	1	1	4	75	v	1	3	15	858
Tampão (X-XG)	69,0	1	1	13	58	v	4	14	9	920
0,125M NaCl	9,0	2	1	48	26	v	4	4	15	549
0,25M NaCl	5,0	3	1	60	11	1	5	5	14	593
0,5M NaCl	4,0	6	-	34	11	2	3	9	35	139
EtOH 50%	3,1	1	v	17	36	9	9	24	4	913
EtOH 50% sn.	4,4	3	1	38	17	3	15	9	14	212
res. insolúvel 1	36,9	3	v	69	2	v	5	3	18	849

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

b) Fraccionamentos por Cromatografia de Troca Aniónica

A fracção precipitada com 30% de etanol foi suspensa em água e a fracção solúvel foi fraccionada em DEAE-Trisacryl, pH 6,5, tendo sido obtidas 4 fracções (Figura 4.5). A fracção mais abundante não ficou retida na coluna, sendo eluída com a solução tampão (X-XG). A composição em açúcares desta fracção não diferiu significativamente da fracção inicial, no entanto permitiu a separação de material predominantemente pécico que lhe estava associado e que foi eluído com soluções de força iónica mais elevadas (Tabela 4.5).

A fracção X-XG foi, após a remoção de um pequeno resíduo insolúvel, fraccionada numa coluna de DEAE-Sephacel na forma de borato a pH 8,0 (Figura 4.6 e Tabela 4.6). Este gel é composto à base de celulose, permitindo que o efeito de separação pela carga possa ser complementado pelo efeito de adsorção de polímeros que contenham afinidade com a celulose como, por

exemplo, sequências de resíduos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 4). Foram obtidas 6 fracções, todas ricas em xilose. A fracção mais abundante (X-XG2) era também a mais rica em glucose (26mol%) e tinha pequenas mas significativas quantidades de arabinose, galactose e ácido urónico. Esta fracção foi utilizada nos estudos que se seguiram para a obtenção de informação mais detalhada acerca da estrutura dos complexos xilana-xiloglucana.

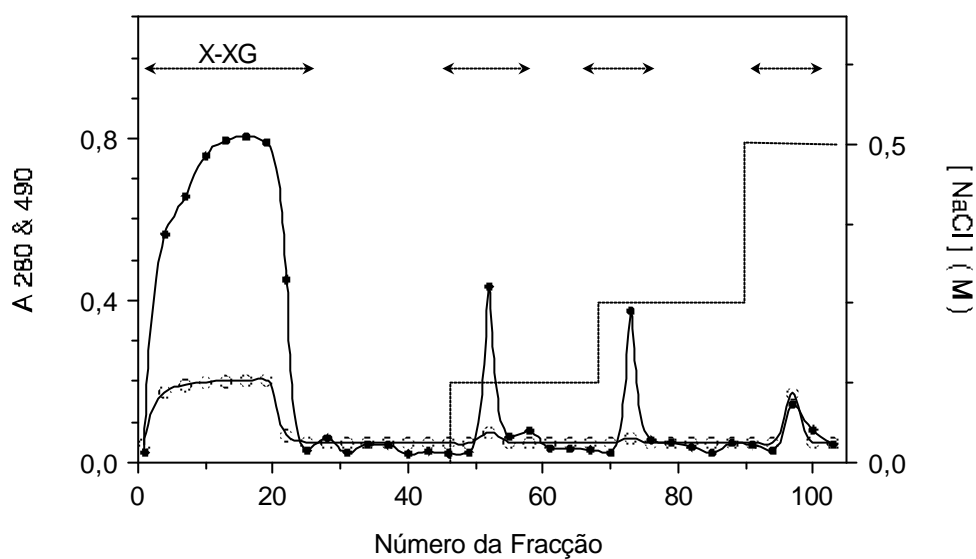


Figura 4.5 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl M da fracção X-XG.
 • - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl

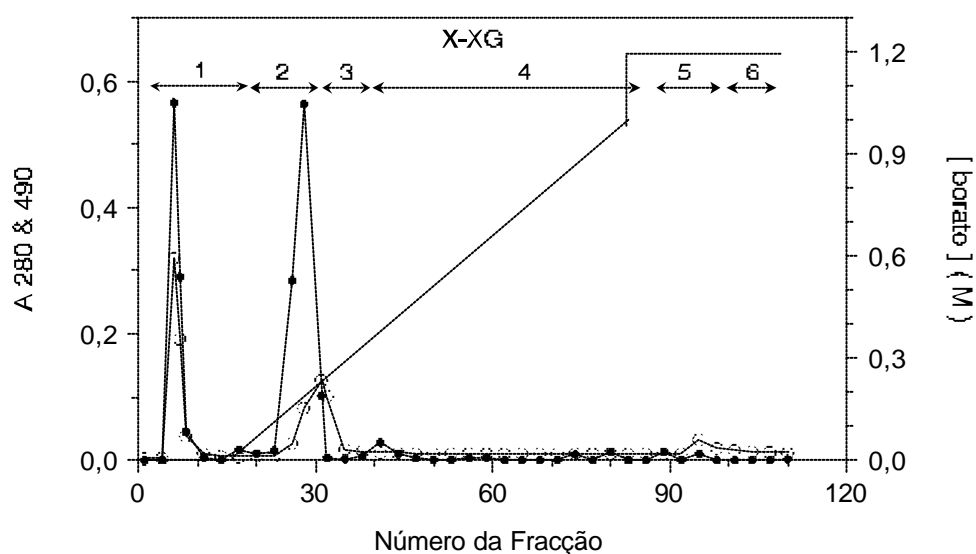


Figura 4.6 - Cromatografia em DEAE-Sephacel da fracção X-XG.
 • - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de borato de sódio

Tabela 4.6 - Composição em açúcares das fracções obtidas por cromatografia em DEAE-Sephacel (forma de borato) da fracção X-XG.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
X-XG										
resíduo insol.	6,6	2	1	21	49	v	3	10	14	752
X-XG1	12,6	1	1	24	55	v	3	2	14	687
X-XG2	38,9	1	1	8	51	1	6	26	6	858
X-XG3	4,0	1	v	6	54	8	5	19	7	553
X-XG4	4,2	2	-	6	63	2	4	10	13	436
X-XG5	11,2	3	-	32	45	v	2	3	15	719
X-XG6	4,0	3	-	26	39	1	3	7	21	347

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

c) Fraccionamento por Cromatografia de Exclusão em Gel

A fracção X-XG2 foi fraccionada por cromatografia de exclusão em gel de Sephacryl S-400 tendo sido obtidas 5 fracções, não totalmente resolvidas (Figura 4.7).

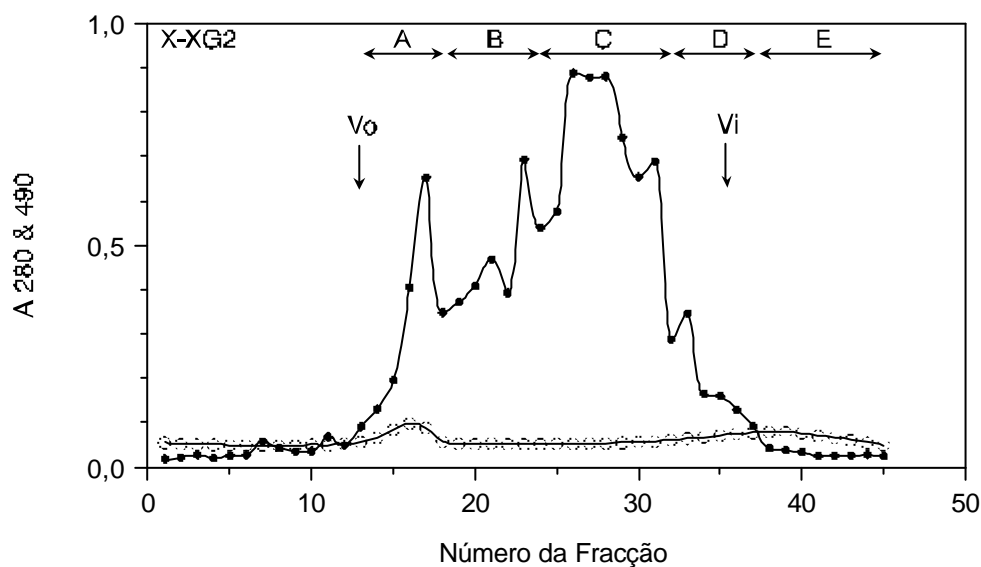


Figura 4.7 - Cromatografia em Sephacryl S-400 da fracção X-XG2.

• - A₄₉₀; o - A₂₈₀; Vo - volume morto; Vi - volume interno da coluna

Com o objectivo de aumentar a resolução dos polímeros envolvidos, cada fracção foi refraccionada. A fracção A foi separada em 2 fracções e a C em 4. Os resultados dos rendimentos obtidos e da análise de açúcares para cada fracção são mostrados na Tabela 4.7. Para poder ser obtida uma ideia da massa molecular dos polissacarídeos presentes, a coluna utilizada foi calibrada com dextranas de massa molecular 2 000, 487, 266 e 72 kdaltons (Figura 4.8). A glucose foi utilizada para determinação do volume interno da coluna.

Tabela 4.7 - Composição em açúcares das fracções obtidas por cromatografia de exclusão em gel em Sephacryl S-400 da fracção X-XG2 seguido de refraccionamento de algumas fracções.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
X-XG2										
X-XG2 A	21,2									
X-XG2 A1	55,0	v	-	2	53	v	1	24	20	576
X-XG2 A2	47,5	1	-	4	48	1	3	19	24	301
X-XG2 B	27,5	v	1	9	32	v	8	41	9	615
X-XG2 C	46,0									
X-XG2 C1	19,5	1	-	2	37	1	1	20	38	162
X-XG2 C2	35,6	-	1	9	33	v	7	36	14	481
X-XG2 C3	51,7	v	1	9	37	v	8	38	7	827
X-XG2 C4	9,2	v	v	6	44	2	3	26	19	435
X-XG2 D	16,9	1	1	6	48	1	4	23	16	577
X-XG2 E	2,6									

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

O refraccionamento da fracção A (Figura 4.9) originou maioritariamente um pico bem definido (X-XG2 A1) que, por comparação com polissacarídeos de referência possuía 2 000 kD. Esta fracção era rica em xilose, glucose e ácido urónico, uma composição com características de complexo xilana-xiloglucana.

O refraccionamento da fracção C (Figura 4.10) originou 4 fracções. A maior parte do material foi recolhido nas fracções C2 (36%) e C3 (52%), não completamente resolvidas. A fracção mais abundante aparentava possuir uma massa molecular de 100 kD e a fracção C2 uma massa

molecular superior, estimada em 400 kD. Ambas eram constituídas em iguais proporções por xilose e glucose, sendo a fracção C3 a mais pobre em ácido urónico.

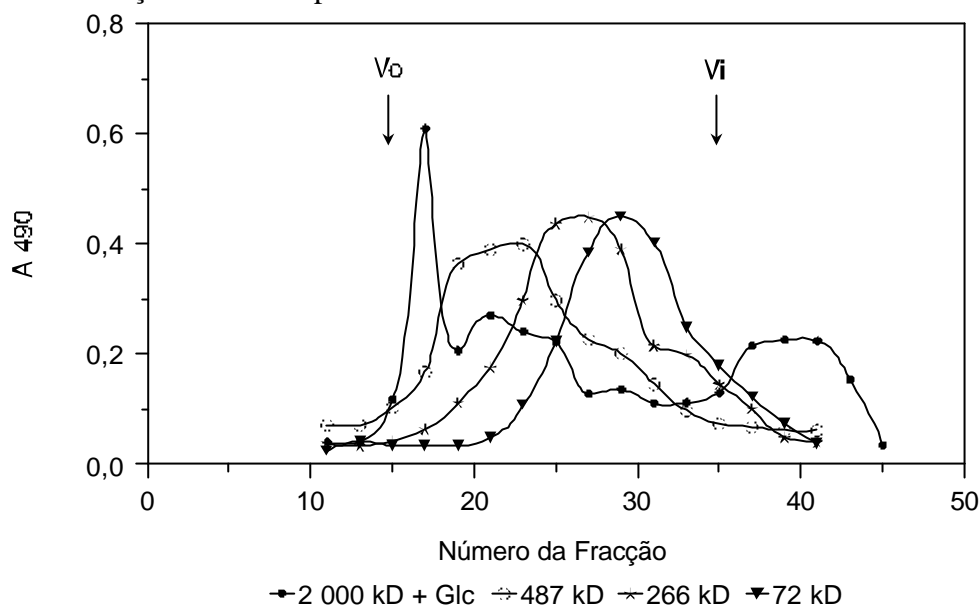


Figura 4.8 - Cromatografia em Sephacryl S-400 de dextranas de massa molecular conhecida. V₀ - volume morto; V_i - volume interno da coluna

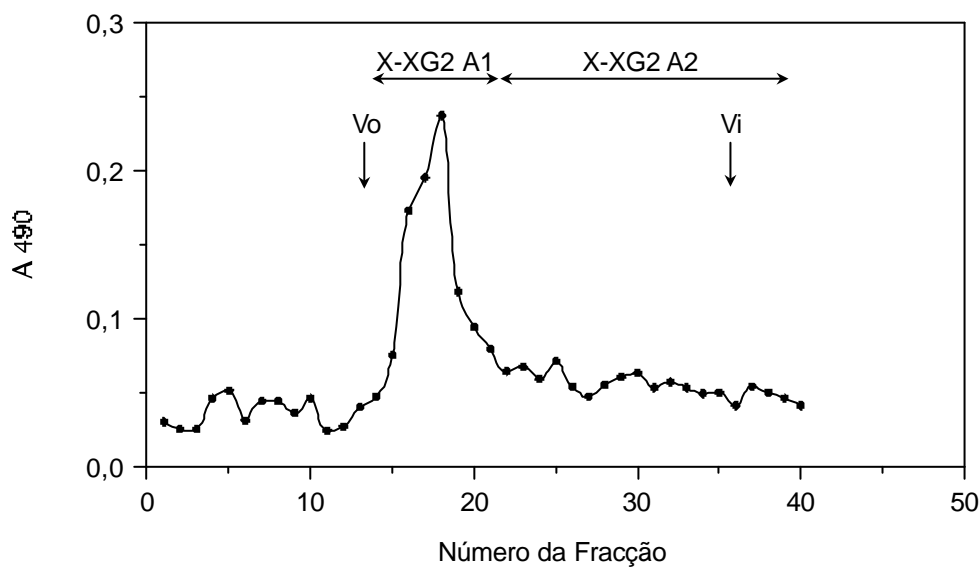


Figura 4.9 - Cromatografia em Sephacryl S-400 da fracção X-XG2 A. V₀ - volume morto; V_i - volume interno da coluna

Os resultados obtidos mostram que o fraccionamento dos polímeros constituintes da fracção X-XG2 originou o aparecimento de duas fracções distintas: uma de massa molecular elevada (2 000

kD), rica em xilose, contendo também glucose e ácido urônico, e outra de massa molecular muito inferior (100 kD), em que xilose e glucose se encontram em iguais proporções.

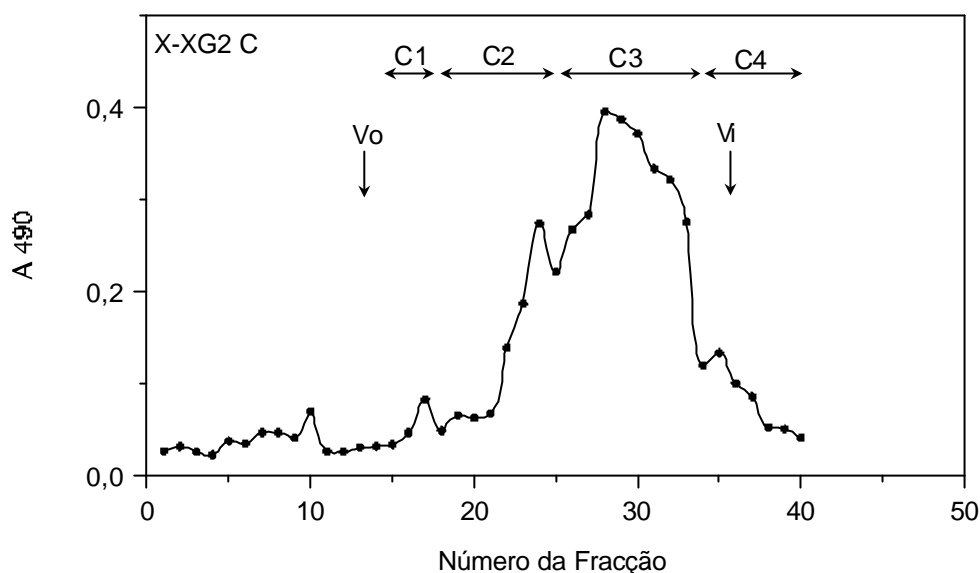


Figura 4.10 - Cromatografia em Sephacryl S-400 da fração X-XG2 C.
Vo - volume morto; Vi - volume interno da coluna

4.2.2 - Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação

A fração X-XG2 foi metilada e os grupos carboxílicos de parte da fração foram reduzidos com LiAlD₄; as frações A1 e C3, resultantes do fracionamento de X-XG2 em Sephacryl S-400 foram também metiladas e os grupos carboxílicos de parte da fração C3 foram reduzidos com LiAlD₄. Os resultados são apresentados na Tabela 4.8.

A análise das ligações glicosídicas da fração X-XG2 revela a presença de xilose em ligação (1→4) e (1→2,4) e resíduos de ácido glucurônico em ligação terminal, resíduos característicos de - glucuronoxilanas; e de glucose em ligação (1→4) e (1→4,6) e xilose em ligação (1→2), resíduos característicos de xiloglucanas. A fração apresenta cerca de 3 vezes mais resíduos de (1→4,6)-Glc_p do que (1→4)-Glc_p, mostrando conter xiloglucanas muito ramificadas, com um grau de polimerização relativamente baixo, uma inferência baseada na proporção de resíduos de glucose terminais em

relação ao total de resíduos de glucose. Uma percentagem significativa de arabinose em ligação terminal também foi detectada.

Tabela 4.8 - Composição das ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes da fracção X-XG2 após fraccionamento em Sephacryl S-400 (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção				
	X-XG2	X-XG2*	X-XG2		
			A1	C3	C3*
T-Fucp	0,1	-	-	0,8	0,1
T-Araf	6,5	6,8	1,7	8,3	8,1
3-Araf	0,3	-	-	-	0,2
5-Araf	0,5	-	0,4	0,7	1,0
2,5-Araf	-	-	0,5	-	-
3,5-Araf	-	-	-	0,3	-
Arabinitol	0,1	0,1	-	-	-
T-Xylp	13,4	12,8	2,8	11,5	12,3
2-Xylp	18,1	16,1	-	10,1	12,2
4-Xylp	36,1	32,3	73,2	13,4	8,1
2,4-Xylp	2,5	4,2	5,5	1,3	2,2
Xilitol	0,1	0,1	0,5	0,4	0,3
4-Manp	0,5	-	-	0,2	-
T-Galp	0,3	0,1	-	10,1	11,5
2-Galp	-	-	-	0,5	0,4
4-Galp	0,5	0,5	-	-	0,3
6-Galp	0,2	-	-	0,1	-
4,6-Galp	-	-	-	0,3	0,4
T-Glcp	0,5	0,4	0,7	-	0,2
4-Glcp	4,6	5,4	6,1	12,4	11,8
4,6-Glcp	13,2	16,8	3,9	27,1	28,0
2,3,4-Glcp	-	-	-	-	0,5
2,4,6-Glcp	0,1	-	-	-	0,2
3,4,6-Glcp	1,0	-	-	-	-
Glucitol	1,4	0,2	4,7	2,6	0,5
T-GlcpA	-	4,2	-	-	2,2

* Amostra reduzida com LiAlD₄.

A fracção A1, resultante do refraccionamento da fracção A, de massa molecular aparente de 2 000 kD, era muito rica em (1→4)-Xylp; 7% destes resíduos encontravam-se ramificados em O-2.

Nesta fracção foram também encontrados resíduos de glucose característicos das xiloglucanas. Os resultados da análise por metilação permite inferir que este complexo de elevada massa molecular era constituído maioritariamente por xilanas acídicas. O facto de ter sido detectada uma grande quantidade de resíduos de glucose em ligação terminal faz supor que as xiloglucanas presentes possuam cadeias muito curtas.

A fracção C3, resultante do fraccionamento da fracção C, de massa molecular aparente de 100 kD, era rica em resíduos característicos de xiloglucanas muito ramificadas e de grau de polimerização superior ao da fracção A1. De registar também a ocorrência em quantidade significativa de resíduos de galactose e arabinose em ligação terminal, possivelmente como cadeias laterais da xiloglucana. Nesta fracção foram também detectados resíduos glicosídicos característicos das -glucuronoxilanas como (1→4)- e (1→4,6)-Xylp e ácido glucurónico em ligação terminal. Estes complexos parecem diferir dos de massa molecular superior nas proporções de xilanas e xiloglucanas presentes.

4.2.3 - Tratamentos com Xilanase

a) Cromatografia de Exclusão em Gel de Sephacryl S-400

Com o fim de se verificar definitivamente se as fracções A1 e C3 continham complexos xilana-xiloglucana ou se os dois polímeros co-eluíram simultaneamente, foi utilizada xilanase. A xilanase não apresentava actividade de celulase nem nenhuma actividade de glucanase relacionada. Se, por tratamento com xilanase, ocorrer um desvio da massa molecular em direcção a massas moleculares mais baixas em toda a fracção poder-se-à concluir que se trata de um complexo; se só parte da fracção migrar, então é porque a xilana foi degradada, concluindo-se que os polímeros não se encontravam associados.

O material das fracções X-XG2 A1 e X-XG2 C3 foi tratado com xilanase e o material degradado foi cromatografado em coluna de Sephacryl S-400.

O perfil de eluição da fracção X-XG2 A1 foi completamente alterado pelo tratamento com a xilanase, tendo a quase totalidade do material eluído fora do limite de exclusão do gel, sendo

recolhido na fracção A1X (Figura 4.11), que foi dialisada, liofilizada e metilada. Os grupos carboxílicos de uma parte da fracção A1X foram reduzidos com LiAlD_4 .

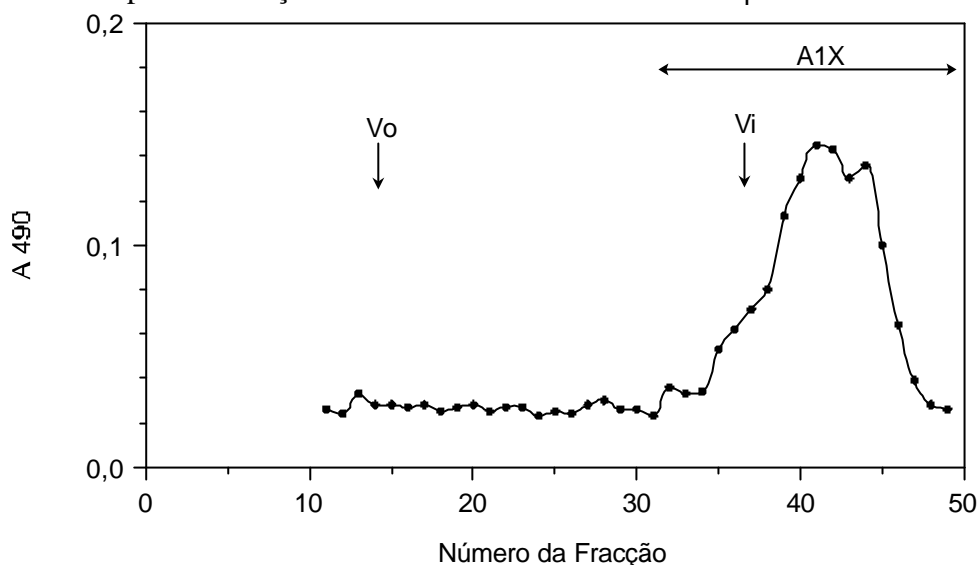


Figura 4.11 - Cromatografia em Sephacryl S-400 da fracção X-XG2 A1 após tratamento com xilanase. Vo - volume morto; Vi - volume interno da coluna

O tratamento do material da fracção X-XG2 C3 com xilanase provocou o desvio de parte do material para uma região de menor massa molecular. Uma fracção do material sofreu uma ligeira migração, permanecendo na zona estimada 50 kD (C3X) (Figura 4.12). O material da fracção C3X foi dialisado, liofilizado e refraccionado, tendo o material sido recolhido em duas fracções, C31X e C3X2. A fracção C3X1 tinha uma massa molecular estimada em 50 kD e a fracção C3X2 compreendia os resíduos de massa molecular excluída pela coluna (menor que 10 kD) (Figura 4.13). Estas duas fracções foram metiladas e os resultados são apresentados na Tabela 4.9.

b) Análise das Ligações Glicosídicas

A análise das ligações glicosídicas da fracção A1X (Tabela 4.9) mostrou a presença de (1→4)-Glc_p e (1→4)-Xyl_p como resíduos glicosídicos maioritários. A remoção da maior parte dos resíduos de xilose em ligação (1→4) permite verificar um aumento na percentagem de xiloglucana presente, detectando-se a presença de resíduos de (1→2)-Xyl_p. Esta xiloglucana apresenta um grau de polimerização de cerca de 15 resíduos de glucose e uma percentagem de pontos de ramificação

de 30%. Não foram detectados resíduos de galactose em ligação terminal. Dos resíduos glicosídicos remanescentes pertencentes à xilana verificou-se que a proporção de resíduos de xilose ramificados e terminais aumentou significativamente, sendo de registar também o valor de 6,7mol% para os resíduos de ácido glucurónico em ligação terminal.

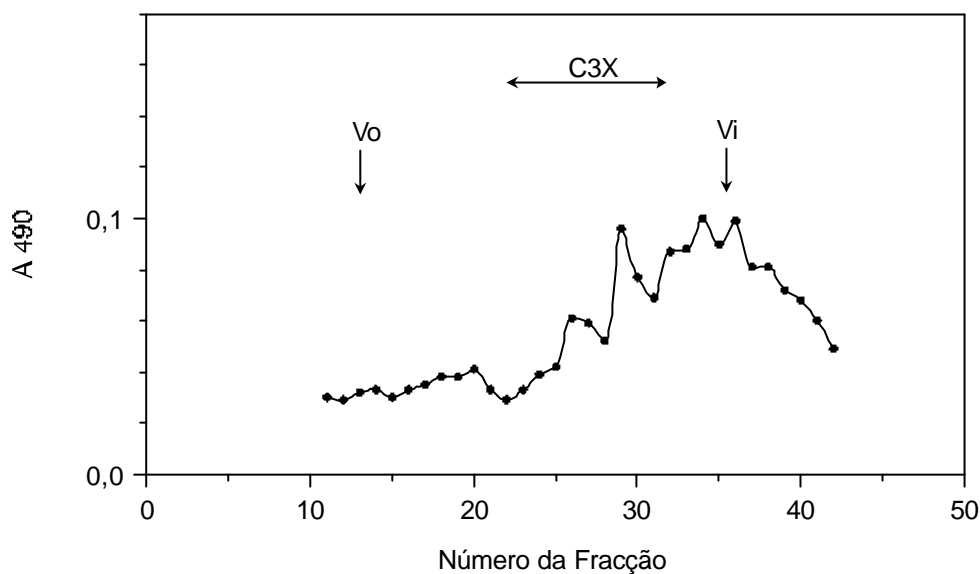


Figura 4.12 - Cromatografia em Sephacryl S-400 da fracção X-XG2 C3 após tratamento com xilanase. Vo - volume morto; Vi - volume interno da coluna

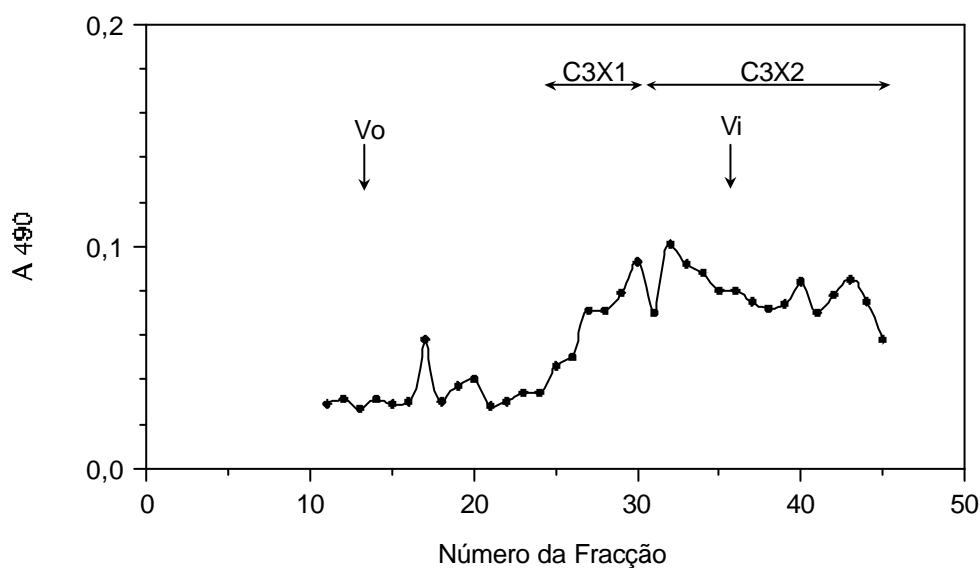


Figura 4.13 - Cromatografia em Sephacryl S-400 da fracção X-XG2 C3X após tratamento com xilanase. Vo - volume morto; Vi - volume interno da coluna

A análise das ligações glicosídicas da fracção C3X1 (Tabela 4.9) mostrou que era rica em resíduos de glucose em ligação (1→4) e (1→4,6) e que continha também resíduos de xilose em ligação (1→2) e terminal e resíduos de arabinose e galactose em ligação terminal. A composição glicosídica permite inferir que cerca de 50% dos resíduos de glucose se encontram ramificados. Os resíduos de xilose em ligação (1→4) passaram a representar somente 2mol% mostrando que as xilanas desta fracção foram extensivamente degradadas pela xilanase, possivelmente fruto da baixa percentagem de ramificação destes polissacarídeos.

Tabela 4.9 - Composição das ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes da fracção X-XG2 após fraccionamento em Sephacryl S400 e tratamento com xilanase (valores expressos em percentagens molares relativas).

<i>Ligação</i>	<i>Fracção</i>		
	<i>AIX*</i>	<i>C3X1</i>	<i>C3X2</i>
T-Fucp	-	0,6	0,7
T-Araf	2,3	6,7	7,9
3-Araf	-	-	0,5
5-Araf	-	1,2	1,3
3,5-Araf	-	0,6	-
Arabinitol	1,4	0,7	0,3
T-Xylp	11,9	8,6	10,0
2-Xylp	7,8	11,3	10,3
4-Xylp	19,7	2,3	1,7
2,4-Xylp	5,7	1,1	0,8
Xilitol	2,3	1,3	0,7
4-Manp	2,4	1,0	1,1
T-Galp	-	8,6	11,3
6-Galp	-	0,2	0,3
4,6-Galp	-	0,4	0,3
T-Glcp	2,1	0,6	0,9
4-Glcp	22,1	21,1	19,7
6-Glcp	-	0,7	0,6
2,4-Glcp	0,3	0,2	0,4
4,6-Glcp	9,0	23,7	26,6
2,4,6-Glcp	-	0,4	0,3
3,4,6-Glcp	0,3	0,6	0,4
Glucitol	6,0	8,3	3,9
T-GlcpA	6,7	-	-

* Amostra reduzida com LiAlD₄.

A análise das ligações glicosídicas da fracção C3X2 (Tabela 4.9) mostrou uma composição muito semelhante a C3X1. É possível que esta fracção contenha o mesmo tipo de complexos, com cadeias de xiloglucanas mais curtas que em C3X1.

4.3 - Discussão Geral

A ocorrência de pequenas quantidades de complexos entre os vários polímeros constituintes das paredes celulares das plantas têm sido referidos por vários autores, entre eles os complexos xiloglucanas-substâncias pécicas (Bauer *et al.*, 1973; Selvendran, 1985) e complexos polissacarídeos-proteína (O'Neill e Selvendran, 1985). Recentemente, uma fracção contendo uma arabinana associada a uma xilana neutra foi também isolada da vagem da ervilha (Ralet *et al.*, 1993). Apesar de este tipo de complexos existir em pequena quantidade, a ocorrência de diferentes tipos em diferentes tecidos sugere mecanismos alternativos, possivelmente múltiplos, para o desenvolvimento da parede e crescimento da célula (Talbot e Ray, 1992).

A evidência da existência de complexos nem sempre é conclusiva, seja pela falta de pureza das preparações, pela labilidade das ligações envolvidas ou pela insuficiência de material disponível, entre outras razões. A insuficiência de material foi também determinante neste trabalho, onde se tentou utilizar o maior número possível de purificações sem prejudicar a obtenção de material suficiente para as várias análises. A disponibilidade de técnicas experimentais mais precisas utilizando um mínimo de material permitiu que a abordagem ao estudo deste tipo de complexos fosse realizada.

Neste trabalho verificou-se que o material solubilizado com 0,5% SDS durante a moagem em moínho de bolas para preparação do CWM da polpa da azeitona continha vários tipos de polímeros provenientes das paredes celulares. Este material é muito solúvel em água, sendo geralmente rejeitado durante a preparação do CWM.

Do extracto de SDS 0,5% foi purificado um complexo xilana-pectina. Este complexo foi separado por desesterificação, sendo muito provável que os polímeros se encontrem associados por ligações éster. Tanto quanto é conhecido, esta é a primeira vez que é referida a existência de uma ligação éster entre uma xilana e um polissacarídeo pécico.

Complexos xilanas-pectinas já tinham sido detectados durante as etapas iniciais da lenhificação de talos de espargo (Waldron e Selvendran, 1992), tendo sido sugerido que possam ser a parte glicosídica inicial que, em tecidos que desenvolvam células com parede celular secundária, possa desencadear o processo de lenhificação.

Do extracto de SDS 0,5% foram também detectadas proteínas ricas em arabinogalactanas. Estas glicoproteínas continham hidroxiprolina e possuíam resíduos característicos de (1→3)-, (1→6)- e (1→3,6)-Galp e resíduos de Araf em ligação terminal.

A existência de complexos xilana-xiloglucana, que se tenha conhecimento, nunca foi referida na literatura, sendo possível que a existência nas paredes celulares de alguns tecidos de largas quantidades de xiloglucanas possa ter ofuscado esta realidade.

O fraccionamento exaustivo dos polímeros contidos no extracto de 1M KOH levou ao isolamento de uma fracção rica em xilanas e xiloglucanas. O facto de não terem sido separadas pelos vários métodos utilizados permite inferir que se encontravam associadas por ligações muito fortes, possivelmente glicosídicas.

Dois tipos de complexos xilana-xiloglucana foram separados por diferenças de massa molecular aparente:

- a fracção de massa molecular mais baixa, que se estimou ser de aproximadamente 100 kD, era rica em xiloglucanas muito ramificadas contendo (1→2)-Xylp e resíduos de galactose e arabinose em ligação terminal, encontrando-se também presentes cadeias curtas de glucuronoxilanas. Não foi possível determinar o tipo de associação entre estes polímeros mas o facto de as xiloglucanas serem muito mais ramificadas do que as xilanas faz supor que estas últimas possam ocorrer como cadeias laterais das xiloglucanas.

- a fracção de massa molecular mais elevada, que se estimou ser de aproximadamente 2000 kD, era muito rica em glucuronoxilanas e em curtas cadeias de resíduos característicos das xiloglucanas, possivelmente como cadeias laterais; não foi detectada a presença de galactose.

A ocorrência de uma fracção de elevada massa molecular, rica em xilanas acídicas, contrasta com as glucuronoxilanas de cadeia curta (20-40 kD) anteriormente encontradas na polpa da azeitona (fracção K10 do capítulo 3). Essas glucuronoxilanas foram facilmente extraídas com 1M KOH e precipitadas após a neutralização do extracto (ponto 3.3.2 e 3.4.2).

A massa molecular aparente do complexo rico em xiloglucana (fracção C3) é semelhante à referida por Gil Serrano e Tejero Mateo (1988) para a polpa da azeitona (103 kD), sendo também da mesma ordem de grandeza dos valores encontrados para as xiloglucanas de outros tecidos (Selvendran *et al.*, 1985; Hayashi, 1989).