

## 5.1 - Preparação dos CWM

O CWM da polpa da azeitona processada em verde (CWMv), segundo o estilo espanhol, e em preto (CWMp), segundo o estilo americano (ver ponto 1.4.3) foi preparado utilizando o procedimento de preparação do CWM da polpa da azeitona em fresco (ponto 2.4 e Esquema 2.2).

Na Tabela 5.1 mostra-se o rendimento e a composição em açúcares dos CWM obtidos e do material solubilizado em cada etapa de purificação para cada um dos tipos de processamento a estudar. Nas Figuras 5.1 e 5.2 são comparados os rendimentos, respectivamente em massa e em açúcares, dos extractos de SDS e PAW e do CWM da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto.

Tabela 5.1 - Composição em açúcares do material purificado das paredes celulares da polpa da azeitona processada em verde (CWMv) e em preto (CWMp) e do material solubilizado durante a purificação (os valores entre parêntesis referem-se à percentagem total de açúcares nas fracções).

Fracção	Rendimento (g/kg peso fr. de polpa)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>Azeitona Verde</i>										
1,5% SDS										
sn.	1,3 (3,2%)	3	1	59	5	1	20	5	6	503
ppt. <sup>f</sup>	9,1 (4,4%)	4	14	33	6	4	8	13	18	100
0,5% SDS										
sn.	0,4 (1,0%)	2	v	46	23	v	16	2	11	502
ppt. <sup>f</sup>	4,7 (9,0%)	3	v	42	1	v	4	3	47	397
PAW	< 0,1									
CWMv Purific.	32,0 (82,4%)	1	v	25	15	3	5	31	20	533
<i>Azeitona Preta</i>										
1,5% SDS										
sn.	1,1 (2,7%)	6	1	55	5	1	20	5	8	512
ppt. <sup>f</sup>	5,8 (14,2%)	3	v	11	4	1	2	69	10	505
0,5% SDS										
sn.	0,4 (1,0%)	7	-	39	29	1	4	3	17	502
ppt. <sup>f</sup>	3,0 (7,8%)	3	-	40	4	1	3	5	44	534
PAW	0,6 (0,3%)	6	1	25	13	5	3	32	16	94
CWMp Purific.	38,3 (74,0%)	2	v	24	17	2	4	32	19	397

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

<sup>f</sup> Material precipitado no decorrer da diálise.

v = Quantidades vestigiais.

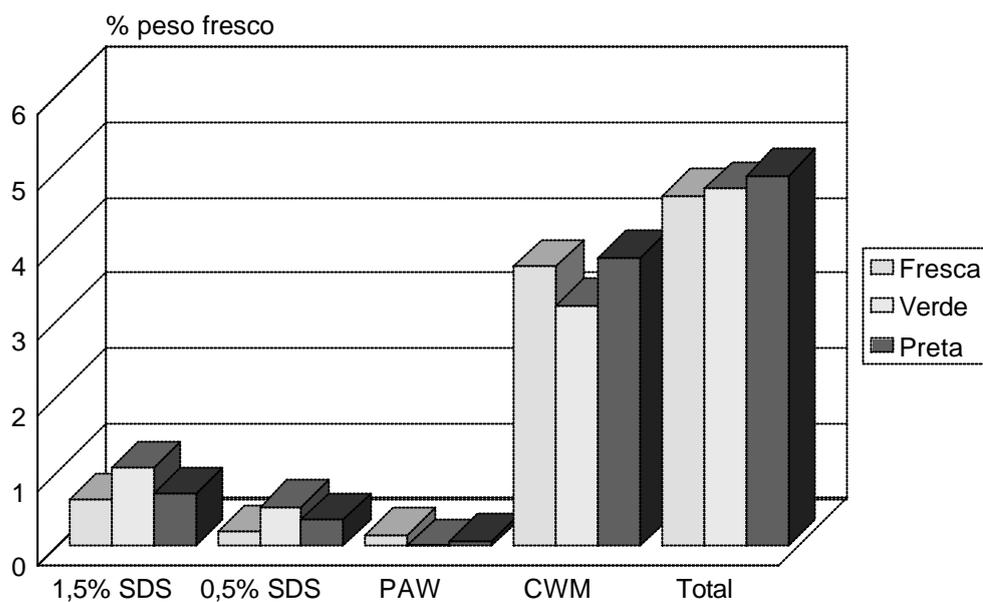


Figura 5.1 - Comparação dos rendimentos, em massa, dos extractos de SDS e PAW e do CWM da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto.

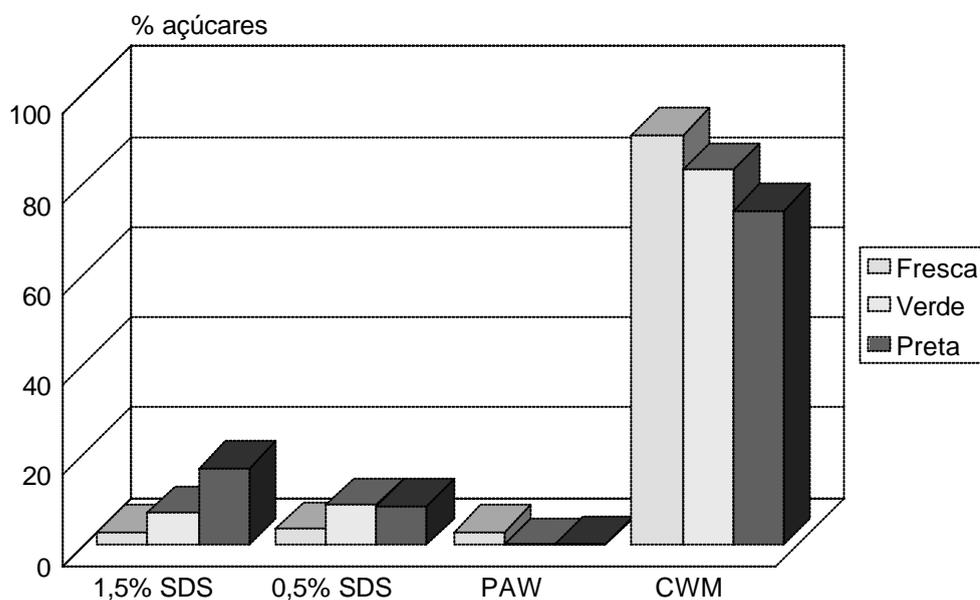


Figura 5.2 - Comparação dos rendimentos, em percentagem de açúcares, dos extractos de SDS e PAW e do CWM da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto.

### 5.1.1 - Azeitonas Processadas em Verde

O CWMv apresentou uma composição em açúcares semelhante à do CWM da polpa das

azeitonas em fresco (Tabela 3.4). Algumas ligeiras variações podem, no entanto, ser notadas ao nível da percentagem de ácido urónico que diminuiu, verificando-se também uma ligeira diminuição da arabinose; como consequência, registou-se um ligeiro aumento de glucose e xilose. O rendimento obtido foi inferior ao das azeitonas frescas (Figura 5.1), sendo a quantidade de açúcares presentes também inferior (Figura 5.2).

Na preparação do CWMv foram solubilizados 17,6% de açúcares pertencentes às paredes celulares, o dobro dos açúcares solubilizados na preparação do CWM das azeitonas em fresco. A totalidade do material foi solubilizado pelas soluções de SDS, sendo estes extractos muito ricos em arabinose; o material que permaneceu solúvel em água era também rico em galactose, provavelmente proveniente de glicoproteínas ricas em arabinogalactanas, e o material insolúvel era rico em arabinose e ácido urónico, possivelmente de origem péctica. Curiosamente, o PAW não solubilizou quantidades significativas de material das paredes celulares; o material solubilizado pelo PAW consistia predominantemente em óleo, removido por extracção com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH.

### 5.1.2 - Azeitonas Processadas em Preto

No CWMp nota-se, relativamente ao CWM e tal como no CWMv, uma diminuição das percentagens de ácido urónico e arabinose e um aumento das percentagens de glucose e xilose (Tabela 5.1). O rendimento obtido foi ligeiramente maior do que o de CWM e significativamente maior do que o de CWMv (Figura 5.1); ao invés, a percentagem de açúcares na preparação é inferior (Figura 5.2). O CWMp apresentava no final uma coloração castanha que foi impossível de remover totalmente. Esta cor é resultado de substâncias fenólicas condensadas co-precipitadas, possivelmente responsáveis pelo aumento no rendimento.

Na preparação do CWMp foram solubilizados 26% de açúcares pertencentes às paredes celulares, um valor muito superior ao solubilizado nas outras preparações. A maior parte do material foi solubilizado pelas soluções de SDS e, tal como nas azeitonas verdes, estes extractos eram muito ricos em arabinose. As fracções solúveis eram também ricas em galactose e a fracção de SDS 0,5% precipitada após a diálise continha muito ácido urónico. O resíduo insolúvel da fracção de SDS 1,5% possuía quantidades elevadas de glucose cuja origem não foi averiguada.

### 5.1.3 - Efeito do Processamento na Preparação do CWM

O facto de se terem solubilizado polímeros ricos em arabinose e ácido urónico durante a preparação do CWMv e CWMp sugere que as paredes celulares da polpa destas azeitonas se encontravam parcialmente degradadas, tornando a solubilização destes polímeros mais acessível. Enquanto durante a preparação do CWM da azeitona fresca foram solubilizados nos extractos de SDS e PAW 9,4% (2,4 g/kg de polpa) dos açúcares constituintes das paredes celulares, durante a preparação do CWMv e CWMp foram solubilizados 17,6 (3,6 g/kg) e 24,6% (4,9 g/kg), respectivamente (Figura 5.3).

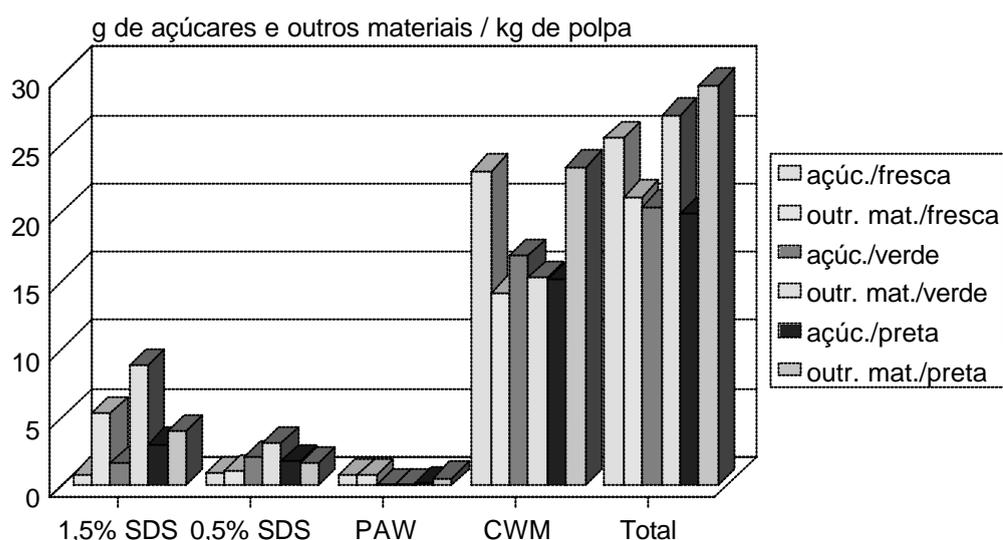


Figura 5.3 - Comparação da massa de açúcares e da do restante material recolhido nos extractos de SDS e PAW e no CWM da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto.

A massa de açúcares por peso fresco de polpa, calculada por adição da massa de açúcares solubilizados em cada extracto à massa de açúcares no CWM, foi de 20,7 g de açúcares / kg de polpa para a azeitona verde e de 20,5 g/kg para a azeitona preta (Figura 5.3). Estes valores são aproximadamente 5 g menores do que os encontrados para a azeitona fresca (25,3 g/kg). A perda de material pode ser devida à difusão de açúcares constituintes das paredes celulares para o meio durante as diversas fases do processamento.

Por análise das águas das salmouras e do tratamento alcalino verificaram-se conteúdos de material

após diálise que correspondiam a 1% do material da polpa dissolvido ao fim de 20 dias de salmoura e 5% em salmouras com 1 ano; o tratamento alcalino dissolveu 6% do material. O aumento da massa e volume da polpa provocados pelo processamento pode também ser responsável pela diminuição da massa de açúcares / kg de polpa nas azeitonas processadas; a massa da polpa, quando em meio alcalino, tende a aumentar ligeiramente.

Na Figura 5.4 são comparadas as quantidades detectadas de arabinose, xilose, glucose e ácido urónico durante a preparação dos respectivos CWM mais a dos CWM. Verificou-se que o facto de na preparação da azeitona em fresco a quantidade de açúcares detectados ser superior à das processadas é reflexo da diminuição total de ácido urónico e arabinose. Esta diminuição é mais sentida na azeitona preta, possivelmente devido a ser uma azeitona em estado de maturação mais adiantado e que foi submetida à acção de NaOH.

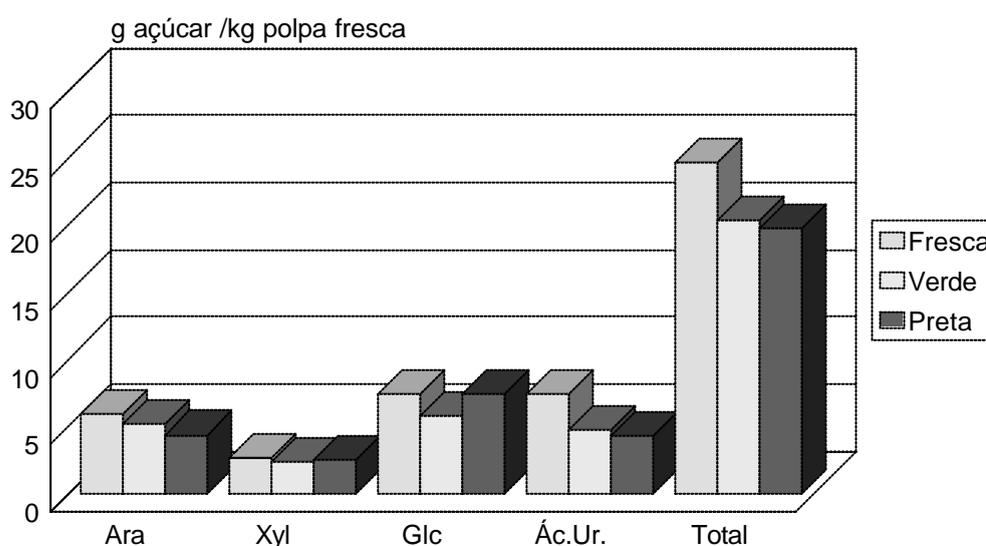


Figura 5.4 - Comparação da quantidade dos vários açúcares nas paredes celulares da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto.

## 5.2 - Extracção Sequencial do CWM

### 5.2.1 - Azeitonas Processadas

O CWM das azeitonas processadas (CWMv e CWMp) foi sequencialmente extraído com solventes aquosos utilizando o procedimento de extracção do CWM das azeitonas em fresco até à obtenção do resíduo rico em celulose (RC2).

A composição em açúcares das fracções obtidas pela extracção sequencial do CWMv encontra-se na Tabela 5.2 e a composição em açúcares das fracções obtidas pela extracção sequencial do CWMp encontra-se na Tabela 5.3.

#### a) Azeitonas Processadas em Verde

Tabela 5.2 - Composição em açúcares de fracções do material da parede celular da polpa da azeitona processada em verde (CWMv) obtido 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	20,0	2	-	62	v	1	4	v	31	621
CDTA-2	1,9	3	-	67	1	v	6	4	19	500
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -1	3,9	3	-	64	4	v	5	1	23	593
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -2	1,2	3	-	52	16	2	7	2	18	360
1M KOH 1°C										
sn.	3,6	1	v	4	59	3	4	13	16	846
ppt. <sup>f</sup>	3,1	1	-	1	82	1	1	3	13	856
1M KOH 20°C										
sn.	1,8	1	v	8	52	4	5	20	10	560
ppt. <sup>f</sup>	1,4	1	-	3	74	1	1	6	14	268
4M KOH										
sn.	7,4	v	v	7	22	22	12	33	4	700
ppt. <sup>f</sup>	2,1	1	v	4	61	7	3	14	10	230
4M KOH + borato										
sn.	1,4	1	v	15	23	15	10	26	10	391
ppt. <sup>f</sup>	2,1	2	-	22	26	5	3	25	17	51
RC1										
sn-RC	2,2	2	-	50	1	-	6	8	33	227
RC2	47,9	1	-	18	7	1	2	63	8	614

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

<sup>f</sup> Material precipitado no decorrer da diálise.

v = Quantidades vestigiais

Os extractos de CDTA da azeitona verde eram muito ricos em arabinose e a razão Ác.Ur./Ara foi 1:2 e 1:3 no primeiro e segundo extractos, respectivamente. As extracções com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dissolveram material rico em arabinose e ácido urónico, no entanto, a quantidade de material solubilizado foi significativamente baixa. O extracto  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -2 possui 16% de xilose, sendo provável que este açúcar seja proveniente de material hemicelulósico.

A primeira extracção com CDTA (CDTA-1) solubilizou 20,0% do material num total de 27,0% solubilizado pelo CDTA e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Este facto pode significar que os polímeros normalmente dissociados do CWM por desesterificação se encontravam somente associados por pontes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

O material extraído com 1M KOH (1°C e 20°C) era muito rico em xilose, sendo provável a ocorrência de xilanas. O sobrenadante destes extractos, ao contrário dos precipitados, continha quantidades significativas de glucose, possivelmente originárias de xiloglucanas.

O sobrenadante do extracto de 4M KOH era muito rico em glucose, xilose, manose e galactose, sendo provável que contivesse uma mistura de xiloglucanas e mananas. O extracto obtido com 4M KOH + borato era muito pobre em açúcares, contendo uma mistura de xiloglucanas, mananas, substâncias pécnicas e possivelmente também glicoproteínas ricas em arabinose.

A fracção sn-RC era muito pobre em açúcares e a parte glicosídica era essencialmente material pécnico. O RC2 representava 47,9% do material dos quais só 61,4% eram açúcares; para além de glucose possuía arabinose, ácido urónico e xilose. Este resíduo, contudo, apresentava somente 8mol% em ácido urónico, um valor inferior às 14mol% de ácido urónico presentes no RC2 da azeitona fresca (Tabela 3.5).

## **b) Azeitonas Processadas em Preto**

Os extractos de CDTA obtidos a partir da azeitona preta eram ricos em arabinose e ácido urónico e, tal como se verificou com a azeitona verde, a primeira extracção solubilizou a maior parte do material pécnico. Os extractos de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  eram também ricos em arabinose e ácido urónico e a extracção com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20°C solubilizou material rico em xilose.

Tabela 5.3 - Composição em açúcares de fracções do material da parede celular da polpa da azeitona processada em preto (CWMp) obtido 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	15,9	3	-	53	1	1	4	-	38	594
CDTA-2	1,2	3	-	64	2	1	5	-	25	524
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -1	2,7	3	-	64	6	v	5	3	19	500
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -2	2,3	2	-	52	19	-	5	3	19	405
1M KOH 1°C										
sn.	2,2	v	1	12	35	4	8	36	4	901
ppt. <sup>f</sup>	8,4	1	-	7	67	v	10	2	13	665
1M KOH 20°C										
sn.	2,7	v	v	10	20	19	13	35	3	862
ppt. <sup>f</sup>	8,1	2	v	10	56	5	4	13	10	178
4M KOH										
sn.	3,0	2	-	16	13	27	12	25	5	209
ppt. <sup>f</sup>	3,5	6	-	22	21	10	6	28	7	47
4M KOH + borato										
sn.	1,3	2	-	32	8	20	10	19	9	315
ppt. <sup>f</sup>	1,8	7	-	45	6	6	4	22	10	43
RC1										
sn-RC	1,7	3	-	62	1	v	4	2	29	237
RC2	45,2	1	-	19	7	1	2	61	10	603

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

<sup>f</sup> Material precipitado no decorrer da diálise.

v = Quantidades vestigiais

Os extractos de KOH produziram precipitados muito abundantes mas muito pobres em açúcares, à excepção do obtido a partir da extracção com 1M KOH a 1°C. Este último era rico em xilose e ácido urónico, açúcares característicos das xilanas. Os sobrenadantes dos extractos de 1M KOH possuíam uma composição em açúcares que indicava a presença de xiloglucanas. Na fracção obtida a 20°C a detecção de manose sugere a solubilização de mananas juntamente com xiloglucanas. Xiloglucanas, mananas e glicoproteínas ricas em arabinose parecem entrar na composição dos extractos de 4M KOH e 4M KOH + borato.

A fracção sn-RC era, tal como na azeitona verde, muito pobre em açúcares e continha essencialmente material péctico. O RC2 representava 45,2% do material, dos quais só 60,3% eram açúcares; era rico em glucose e possuía também arabinose, ácido urónico (10mol%) e xilose.



### c) Efeito do Processamento na Extração Sequencial do CWM

A quantidade de material e açúcares solubilizados do CWM da polpa da azeitona fresca e processada em verde e preto pelos vários solventes aquosos foi comparada nas Figuras 5.5 e 5.6.

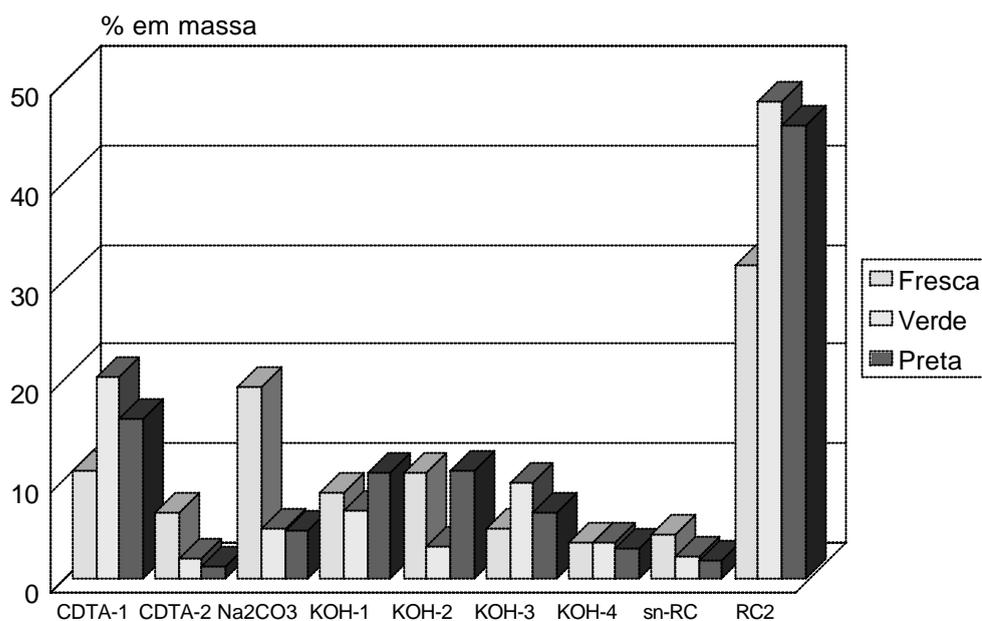


Figura 5.5 - Percentagem de material extraído do CWM da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto com os vários solventes (KOH-3 = 4M KOH; KOH-4 = 4M KOH + borato).

Nas azeitonas processadas, a primeira extracção com CDTA solubilizou a maior parte do material péctico presente no CWM; na azeitona fresca, ao contrário, uma grande parte do material péctico foi solubilizado com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O facto destes polímeros terem sido solubilizados pela introdução de um agente quelante permite inferir que se encontravam associados à parede celular principalmente por ligações Ca<sup>2+</sup>, não necessitando do tratamento com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para terem sido solubilizados. A maioria dos polissacarídeos pécticos extraídos com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> poderiam estar "bloqueados" pelos polímeros extractáveis com agentes quelantes ou mesmo também associados por pontes de Ca<sup>2+</sup>.

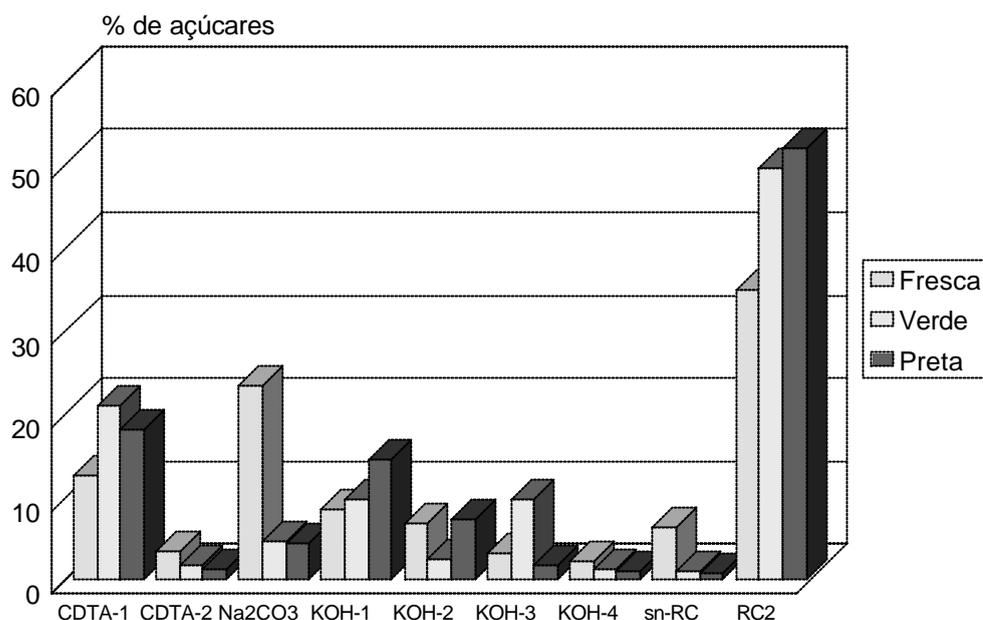


Figura 5.6 - Percentagem de açúcares extraídos do CWM da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto com os vários solventes (KOH-3 = 4M KOH; KOH-4 = 4M KOH + borato).

A azeitona processada em preto apresenta menor percentagem de material pécico do que a verde (Figura 5.7). Este facto poderá ser devido a perda deste tipo de material durante a maturação tal como acontece com as substâncias pécticas de outros tecidos parenquimatosos como o tomate (Gross, 1984, Seymour *et al.*, 1990, Greve e Labavitch, 1991), o kiwi (Redgwell *et al.*, 1990, 1991, 1992) e a uva (Villar *et al.*, 1992). Este tipo de polímeros pode também ter difundido durante o tempo prolongado das salmouras a que a azeitona a processar em preto é sujeita.

A quantidade de material extraído com cada uma das soluções de KOH não apresentou variação significativa, sendo somente de registar na azeitona processada em verde o baixo rendimento da extracção com KOH a 20°C, compensada com a extracção com 4M KOH (Figuras 5.5 e 5.6).

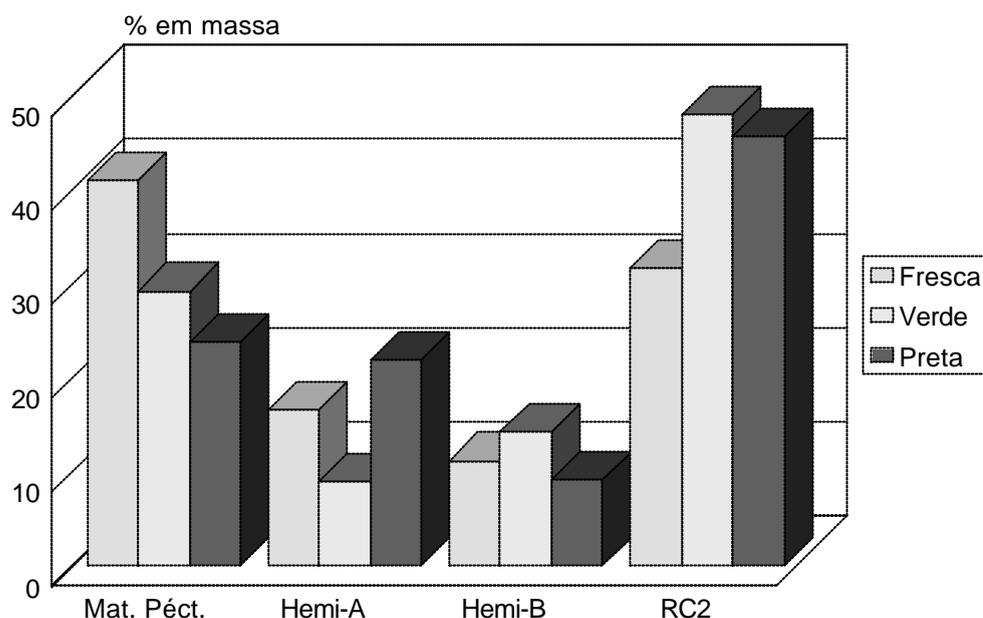


Figura 5.7 - Percentagem dos diferentes tipos de material extraído do CWM da polpa da azeitona em fresco e processada em verde e em preto.

A Figura 5.7 mostra que o material hemicelulósico precipitado após a diálise (Hemi-A) foi mais abundante na azeitona preta e menos na verde. A existência de material fenólico condensado, verificado pelo baixo teor em açúcares destas fracções da azeitona preta (Tabela 5.3), poderá explicar este aumento da massa de Hemi-A; na azeitona verde, as fracções de Hemi-A são mais ricas em açúcares pelo que o efeito de co-precipitação de polissacarídeos com compostos fenólicos é menor.

Globalmente, os extractos de KOH das azeitonas processadas em relação aos extractos da azeitona fresca apresentam uma diminuição do teor em arabinose (Tabelas 3.5, 5.2 e 5.3). Estes resultados são sinal de degradação das pectinas existentes nestes extractos.

Os RC2 de ambos os CWM das azeitonas processadas possuem muito mais material do que o CWM da azeitona em fresco apresentando-se também mais ricos em açúcares (Figura 5.6). Estes resultados sugerem que os tratamentos a que estas azeitonas foram submetidas originaram, para além de degradação nos polissacarídeos, também precipitação de substâncias que permaneceram insolúveis e associadas ao material das paredes celulares após os tratamentos de extracção a que este foi sujeito. Este material era, possivelmente, de origem fenólica e impediu a extracção de parte do material glicosídico.

### 5.2.2 - Extração do CWM de Azeitonas Frescas com Água Quente

A extensão e tipo de degradação provocados pelo processamento foi comparado com os efeitos de degradação dos polissacarídeos pécnicos do CWM provocados pela extração com água quente e oxalato a quente: o CWM da polpa da azeitona em fresco foi extraído sequencialmente com água a 80°C, oxalato de amónio a 1% a 80°C, 1M KOH e 4M KOH (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Composição em açúcares de fracções do material da parede celular da polpa da azeitona fresca obtidos por extração sequencial com água quente, oxalato quente, 1M e 4M KOH.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
H <sub>2</sub> O 80°C	33,1	3	1	44	1	-	2	1	48	923
oxalato 80°C										
sn.	8,4	2	v	35	v	v	3	1	59	774
ppt. <sup>f</sup>	0,8	2	v	28	3	1	3	7	56	830
1M KOH										
sn.	5,2	1	1	19	36	7	5	18	13	894
ppt. <sup>f</sup>	5,0	1	-	3	80	1	1	6	8	357
4M KOH										
sn.	3,3	v	v	19	27	1	8	29	16	253
ppt. <sup>f</sup>	3,7	-	v	56	9	-	5	4	26	582
RC1										
sn-RC	2,3	-	v	56	9	-	5	4	26	582
RC2	38,2	1	-	20	8	1	3	58	9	597

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

<sup>f</sup> Material precipitado no decorrer da diálise.

v = Quantidades vestigiais

A extração do CWM da polpa da azeitona fresca com água quente originou uma fracção abundante (33,1%) muito rica em ácido urónico e arabinose e que continha também ramnose; era uma fracção muito rica em açúcares. A extração com 1% de oxalato de amónio, pH 5,0 a 80°C solubilizou exclusivamente material pécnico, rico em ácido urónico; registou-se também a ocorrência de substâncias pécnicas no extracto de 1M KOH. O material pécnico da fracção sn-RC era muito rico em arabinose. O RC2 continha ainda material pécnico; a quantidade de ácido urónico presente (9mol%) não era, contudo, tão abundante quanto a obtida a partir do CWM da azeitona em fresco extraída com CDTA e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14mol%).

### **5.3 - Fraccionamento dos Extractos**

#### **5.3.1 - Fraccionamento de Extractos Ricos em Substâncias Pécicas**

Todas as fracções analisadas foram primeiro fraccionadas por precipitação com soluções de concentração crescente de etanol e algumas fracções mais significativas foram fraccionadas por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl.

##### **a) Extractos de CDTA**

O extracto de CDTA-1 da azeitona verde originou um resíduo insolúvel muito abundante após descongelação da amostra (Tabela 5.5). O fraccionamento com etanol originou 5 fracções ricas em arabinose e ácido urónico. As fracções precipitadas com concentrações mais elevadas de etanol eram menos ricas em ácido urónico. A fracção mais abundante foi precipitada com 30% de etanol (C30v) tendo sido posteriormente analisada quanto ao tipo de ligações glicosídicas (ponto 5.4.1). A fracção precipitada com 80% de etanol, por ser das mais ricas em arabinose, foi fraccionada por cromatografia de troca aniónica (Figura 5.8), tendo a maior parte do material eluído com 0,25M de NaCl. O facto de não ter sido obtido material na fracção neutra permite inferir que este material não se encontrava significativamente esterificado. As fracções analisadas continham uma percentagem em ácido urónico muito superior à fracção C30v, sugerindo que parte da arabinose tivesse ficado retida na coluna ou possa ter difundido através da membrana de diálise.

O extracto de CDTA-1 da azeitona preta originou, por precipitação com etanol, 4 fracções ricas em arabinose e ácido urónico. A fracção mais abundante foi precipitada com 30% de etanol e era a mais rica em ácido urónico (Tabela 5.5). A fracção precipitada com 80% de etanol, por ser das mais ricas em arabinose, foi fraccionada por cromatografia de troca aniónica. A percentagem de recuperação foi muito baixa sendo possível que o material tivesse ficado retido irreversivelmente na coluna ou tivesse difundido pela membrana de diálise.

Tabela 5.5 - Composição em açúcares das frações solubilizadas pelo CDTA (CWMv e CWMp) e água quente (CWM da polpa da azeitona fresca) após precipitação com etanol seguida de cromatografia de troca aniônica.

Fração	Rendim. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>Verde (CDTA-1)</i>										
resíduo insol.	23,2	3	v	50	1	v	4	2	40	657
EtOH 15%	7,8	2	v	45	1	-	4	v	48	627
EtOH 30% (C30v)	61,1	3	v	57	1	v	4	1	35	692
EtOH 50%	6,4	3	v	52	1	2	4	3	35	742
EtOH 80% (C80v)	12,2	3	v	57	1	1	4	2	32	736
0,125M NaCl	8,6									
0,25M NaCl	65,7	4	-	39	v	-	3	1	53	946
0,5M NaCl	5,7	6	-	35	v	v	2	4	53	592
EtOH 80% sn.	5,6	3	v	63	1	v	4	2	27	807
<i>Preta (CDTA-1)</i>										
EtOH 30% (C30p)	60,0	5	1	37	1	6	4	8	39	664
EtOH 50%	9,7	4	v	56	1	v	4	1	34	574
EtOH 80% (C80p)	21,7	3	v	56	1	-	4	v	36	764
0,25M NaCl	6,0	8	v	58	1	1	5	3	24	489
0,5M NaCl	14,0	7	-	40	2	v	3	1	48	653
EtOH 80% sn.	2,7	3	v	68	1	v	3	2	23	551
<i>Fresca (ág. 80°C)</i>										
resíd. insol. (HW)	76,5	2	v	54	1	v	3	3	37	756
EtOH 80%	17,4	1	v	34	1	1	2	1	60	840
Tampão	38,5	2	-	34	v	v	1	1	62	855
0,125M NaCl	40,4	1	v	32	v	v	2	1	64	933
0,25M NaCl	9,6	2	v	22	1	1	2	4	68	542
0,5M NaCl	4,8	2	-	30	1	1	2	13	51	220
EtOH 80% sn.	6,2	2	-	83	1	1	1	3	8	706
Tampão (HWA)	68,8	2	-	87	v	1	1	2	7	922
0,125M NaCl	18,8	2	-	27	3	3	2	6	57	408

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

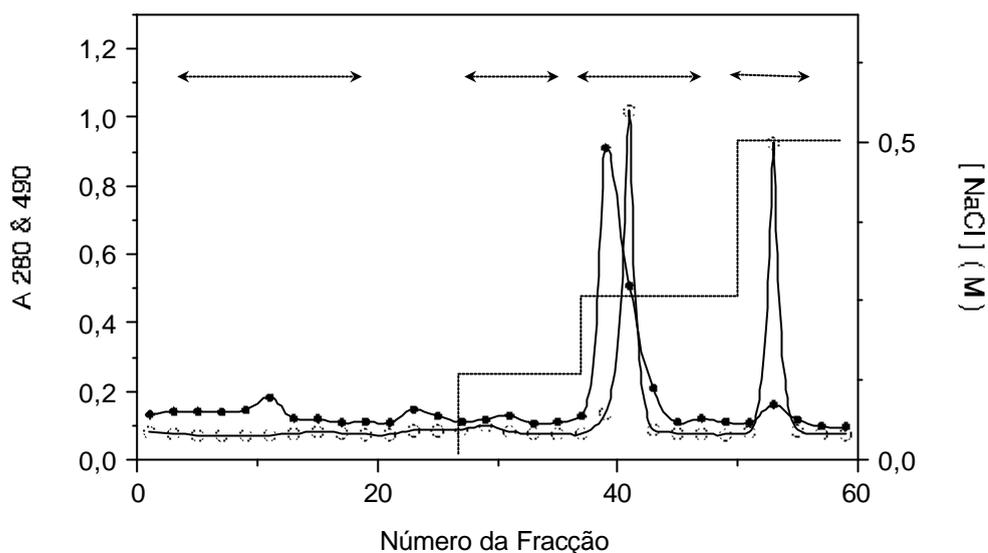


Figura 5.6 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl da fracção C80v.

• - A<sub>490</sub>; ○ - A<sub>280</sub>; ----, gradiente de NaCl

### b) Extracto Obtido com Água Quente

A descongelação do material obtido na extracção do CWM da azeitona fresca com água quente originou um precipitado muito abundante (Tabela 5.5). Ao sobrenadante foi adicionado etanol, tendo parte do material precipitado quando a concentração de etanol atingiu 80%. Este material era rico em ácido urónico, com uma proporção  $\text{Ác.Ur./Ara}$  de 2:1; a fracção solúvel em etanol, ao contrário, era pobre em ácido urónico, com uma razão  $\text{Ác.Ur./Ara}$  de 1:10.

O fraccionamento por cromatografia de troca aniónica da fracção insolúvel em 80% de etanol originou 4 fracções (Figura 5.9), todas ricas em ácido urónico. A fracção neutra e a fracção eluída com 0,125M de NaCl foram as mais abundantes e ambas com elevado teor em açúcares; o facto de serem ricas em ácido urónico sugere que estes resíduos se encontravam extensamente esterificados.

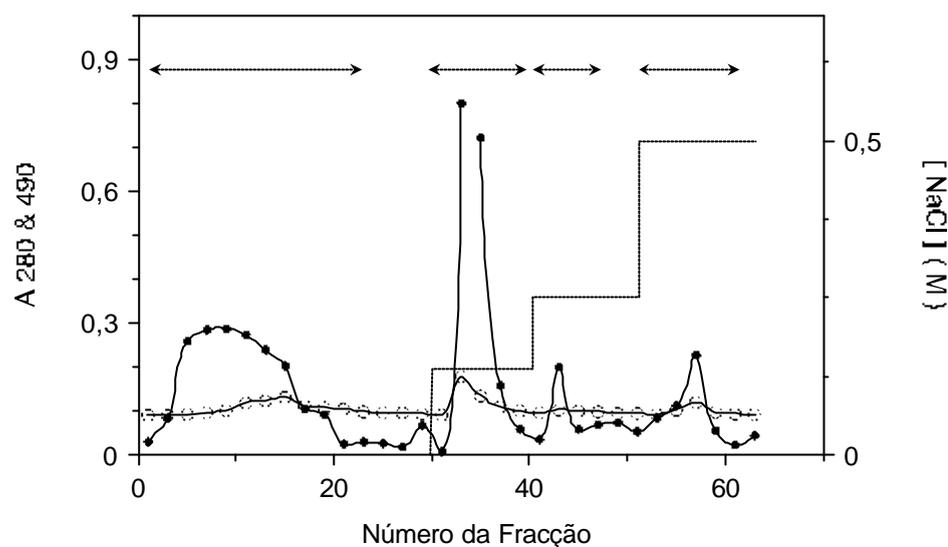


Figura 5.9 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl da fracção EtOH 80%, proveniente da extracção com água quente. • - A<sub>490</sub>; o - A<sub>280</sub>; ----, gradiente de NaCl

A fracção solúvel em etanol originou duas fracções por cromatografia de troca aniónica (Figura 5.10). A maior parte do material não ficou retido na coluna e era rico em arabinose (HWA), sendo a razão  $\text{Ác.Ur./Ara}$  de 1:12. A "arabinana" detectada nesta fracção possui uma composição glicosídica semelhante à que foi caracterizada por Stevens e Selvendran (1980b) a partir das paredes celulares de folhas de couve por extracção com água quente e à descrita por Pilnik e Rombouts (1985) como resultado da turvação de sumos de maçã tratados enzimaticamente. O facto deste polímero ter sido detectado após extracção com água quente e não ter sido detectado por extracção com CDTA ou  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sugere que se trate de um produto de degradação.

"Arabinanas" semelhantes não foram detectadas pelo fraccionamento do extracto de CDTA-1 das azeitonas processadas. A hipótese de que estes polímeros pudessem ter sido solubilizados durante a fase de preparação dos respectivos CWM foi testada tendo as fracções de SDS 0,5% sido fraccionadas por precipitação em etanol.

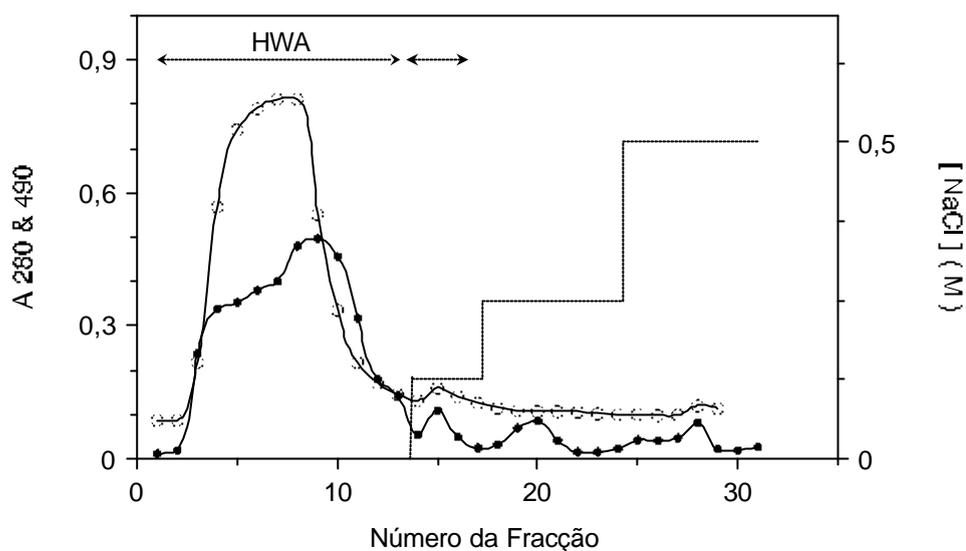


Figura 5.10 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl da fracção solúvel em 80% de etanol, proveniente da extracção com água quente. ● - A<sub>490</sub>; ○ - A<sub>280</sub>; ----, gradiente de NaCl

### c) Extractos de SDS 0,5%

Uma parte significativa do material do extracto de SDS 0,5% da polpa da azeitona processada em verde permaneceu insolúvel após ter sido descongelado e foi removido por centrifugação. A adição gradual de etanol ao sobrenadante originou 4 fracções (Tabela 5.6). As menos solúveis em etanol (EtOH 40% e EtOH 60%) eram ricas em xilose e galactose e continham também ácido urónico e arabinose; as fracções mais solúveis em etanol eram muito ricas em arabinose, contendo a fracção "EtOH 80% sn." 89mol% de arabinose. Esta fracção tinha uma composição glicosídica semelhante à fracção HWA, extraída com água quente.

Um pequeno resíduo que permaneceu insolúvel após a descongelação da fracção de SDS 0,5% da polpa da azeitona processada em preto foi removido e o sobrenadante precipitado com soluções de concentração crescente de etanol, tendo sido obtidas 5 fracções. Tal como para a azeitona verde, verificou-se um aumento da percentagem de arabinose à medida que a concentração de etanol aumentava. No entanto, neste extracto, não foi possível encontrar uma fracção "pura" de "arabinanas". Este resultado era esperado visto tratar-se de uma azeitona madura, em que a

quantidade de açúcares neutros de origem pécica é menor (Seymour *et al.*, 1990; Redgwell *et al.*, 1991, 1992).

Tabela 5.6 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas com SDS 0,5% durante a preparação do CWMv e CWMp após precipitação com etanol.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>Verde</i>										
resíduo insol.	31,2	3	1	39	20	1	18	4	14	280
EtOH 40%	20,6	v	v	7	59	v	14	2	18	744
EtOH 60%	2,4	5	1	31	27	v	21	2	13	679
EtOH 80%	34,8	4	v	62	4	v	17	3	10	670
EtOH 80% sn.	11,5	2	v	89	1	1	1	2	4	475
<i>Preta</i>										
resíduo insol.	3,5	5	v	31	22	2	9	12	19	146
EtOH 30%	27,3	3	v	11	60	v	5	5	16	494
EtOH 55%	8,8	5	v	35	29	v	15	6	10	478
EtOH 70%	9,2	5	-	55	9	v	13	6	12	487
EtOH 80%	11,5	5	v	66	4	v	9	4	12	593
EtOH 80% sn.	3,5									

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

Em resumo, da polpa da azeitona, tal como de outros tecidos parenquimatosos, não é possível isolar arabinanas a não ser que sejam utilizados meios degradativos para as pectinas como a extracção com água quente. As pectinas da polpa das azeitonas processadas estudadas encontram-se degradadas e foi possível isolar este tipo de polissacarídeo a partir da azeitona verde. A composição em açúcares das fracções solúveis dos extractos de SDS 1,5% (Tabela 5.1) das azeitonas processadas revela que eram muito ricas em arabinose, sendo provável que se encontrassem também "arabinanas" nestas fracções.

### 5.3.2 - Fraccionamento dos Extractos Ricos em Glucuronoxilanas

O material insolúvel proveniente do extracto de 1M KOH 1°C da azeitona verde foi

dissolvido em 1M NaOH e precipitado com uma solução saturada de acetato de cobre. O precipitado azul formado foi desfeito com uma solução alcoólica de ácido clorídrico originando um precipitado branco muito rico em xilose e ácido urónico (KCuv) em que a razão Xyl/Ác.Ur. era 9:1 (Tabela 5.7). O precipitado foi novamente suspenso em 1M NaOH e o material não dissolvido foi removido por centrifugação; ao sobrenadante foi adicionado HCl para diminuição gradual do pH, tendo sido obtido um precipitado a pH 12 (K12v), o mais abundante, e outro a pH 5 (K5v). Ambos os precipitados e o sobrenadante foram dialisados e liofilizados. A composição em açúcares das fracções K12v e K5v é muito semelhante (Tabela 5.7), sendo ambas muito ricas em xilose e contendo também ácido urónico, numa composição característica das glucuronoxilanas.

Tabela 5.7 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas com 1M KOH 1°C que precipitaram após a diálise (Hemicelulose A).

Fracção	Rend. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>Verde</i>										
Cu(OAc) <sub>2</sub> ppt. (KCuv)	60,0	1	-	v	88	1	-	v	10	773
resíduo insolúvel	1,3									
pH 12 ppt. (K12v)	70,7	1	v	1	85	1	1	2	9	873
pH 5 ppt. (K5v)	25,3	v	v	1	88	1	v	2	8	671
pH 5 sn.	4,0	1	1	5	59	7	3	13	11	855
<i>Preta</i>										
Cu(OAc) <sub>2</sub> ppt. (KCup)	53,8	1	-	4	83	-	1	-	11	790
resíduo insol. (KI <sub>p</sub> )	7,0	4	v	41	15	1	7	7	25	668
pH 10 ppt. (K10 <sub>p</sub> )	74,0	1	-	1	86	v	v	v	12	834
pH 10 sn. (K6 <sub>p</sub> )	26,0	1	-	6	76	v	1	2	14	790
Cu(OAc) <sub>2</sub> sn.	18,6	10	1	47	3	2	4	17	16	42

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

O material insolúvel proveniente do extracto de 1M KOH 1°C da azeitona preta foi dissolvido em 1M NaOH, tratado com acetato de cobre e reprecipitado com uma solução alcoólica

de HCl. O precipitado foi recolhido por centrifugação e dialisado originando a fracção KCup, rica em xilose e ácido urónico na proporção de 8:1 (Tabela 5.7).

O material da fracção KCup foi dissolvido em 1M NaOH e, por adição gradual de HCl, foi recolhido um precipitado a pH 10 ((K10p). Como a adição de HCl até pH 6 não precipitou mais material, o sobrenadante foi concentrado e dialisado originando a fracção K6p. A fracção K10p tinha uma composição em açúcares característica das glucuronoxilanas com uma razão Xyl/Ác.Ur. de 7:1; esta razão Xyl/Ác.Ur. foi de 5,4:1 na fracção K6p, que também continha arabinose.

O material não precipitado com acetato de cobre foi neutralizado, dialisado e liofilizado. Esta fracção, apesar de abundante, era pobre em açúcares, sendo a arabinose o açúcar maioritário.

As fracções mais significativas, ricas em glucuronoxilanas, foram analisadas por metilação (ponto 5.4.2).

### **6.3.3 - Fraccionamento dos Extractos Ricos em Xiloglucanas**

#### **a) Azeitonas Processadas em Verde**

O material solúvel dos extractos de 1M KOH 20°C e 4M KOH da azeitona verde foi fraccionado por precipitação com soluções de etanol (Tabela 5.8).

Do extracto de 1M KOH 20°C foi obtida uma fracção insolúvel em água e 3 fracções por adição de etanol. A fracção maior (EtOH 50%) era rica em xilose e glucose, numa razão de cerca de 2:1. O fraccionamento por cromatografia de troca aniónica não alterou significativamente a composição da fracção, tendo a fracção neutra resultante uma composição em açúcares característica da presença de uma xiloglucana, revelada pela presença de glucose e galactose, para além da xilose; a elevada percentagem de xilose, no entanto, indica que uma xilana também se encontra presente.

Do extracto de 4M KOH foi obtida uma fracção insolúvel em água e mais 2 fracções por adição de etanol. A fracção precipitada com 50% de etanol era rica em glucose manose, xilose e galactose. O fraccionamento por cromatografia de troca aniónica não alterou significativamente a composição da fracção.

Tabela 5.8 - Composição em açúcares das fracções obtidas a partir do CWM da polpa da azeitona verde solubilizadas com KOH (hemicelulose B) após precipitação com etanol seguida de cromatografia de troca aniónica.

Fracção	Rendimento (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>1M KOH 20°C</i>										
resíduo insolúvel	14,8	1	1	12	32	6	5	40	3	405
EtOH 50%	47,1	1	1	8	43	8	7	26	6	670
Tampão	47,5	v	1	11	44	6	7	27	4	750
EtOH 80%	29,4	1	v	11	51	4	6	21	6	787
EtOH 80% sn.	6,9	5	4	27	20	10	5	29	-	48
<i>4M KOH</i>										
resíduo insolúvel	16,2	1	v	10	32	15	8	31	3	505
EtOH 50%	41,3	v	v	6	18	25	13	36	2	937
Tampão	65,3	v	v	7	17	27	13	35	1	825
EtOH 50% sn.	9,3	3	v	38	16	10	10	14	9	251

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

## b) Azeitonas Processadas em Preto

O material solúvel dos extractos de 1M KOH 1°C e 20°C da azeitona preta foi fraccionado por precipitação com soluções de etanol (Tabela 5.9).

Uma grande fracção foi obtida a partir do extracto de 1M KOH 1°C com 30% de etanol. Esta fracção era rica em glucose e xilose e continha também arabinose e galactose, numa composição em açúcares característica das xiloglucanas. O fraccionamento por cromatografia de troca aniónica resultou numa fracção neutra rica em xilose e glucose. O facto desta fracção não apresentar quantidades significativas de resíduos de ácido urónico permite supor que se trate de uma xiloglucana, possivelmente produto de degradação da parede celular provocado pelo processamento.

A fracção extraída com 1M KOH a 20°C originou uma fracção abundante muito rica em açúcares com 35% de etanol. O fraccionamento por cromatografia de troca aniónica resultou numa grande fracção neutra rica em glucose, xilose e manose, resíduos de açúcares provavelmente

constituintes de xiloglucanas e mananas.

Tabela 5.9 - Composição em açúcares das fracções obtidas a partir do CWM da polpa da azeitona preta solubilizadas com 1M KOH (hemicelulose B) após precipitação com etanol seguida de cromatografia de troca aniónica.

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>										
resíduo insolúvel	12,7	1	v	19	58	1	4	5	12	733
EtOH 30%	50,0	v	1	11	31	1	10	43	3	988
Tampão	89,2	v	1	16	42	1	7	32	1	804
EtOH 50%	23,5	v	v	7	27	12	10	39	3	978
EtOH 70%	5,0	v	v	7	28	15	10	34	6	908
EtOH 80%	2,7	1	v	11	26	15	10	32	5	646
<i>1M KOH 20°C</i>										
resíduo insolúvel	12,3	1	1	10	22	18	11	36	2	773
EtOH 35%	60,8	v	v	6	19	21	13	39	1	976
Tampão	93,8	v	1	11	27	18	10	32	1	706
EtOH 50%	1,5	2	v	14	25	18	11	24	6	564
EtOH 80%	8,8	2	v	23	15	14	15	26	5	764
EtOH 80% sn.	7,3	1	2	57	6	7	6	10	11	165

\* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

## 5.4 - Análise das Ligações Glicosídicas

### 5.4.1 - Substâncias Pécicas

As fracções C30v, proveniente da fracção de CDTA-1 da azeitona verde, C30p, proveniente da fracção de CDTA-1 da azeitona preta e HW, material insolúvel proveniente da extracção do CWM da polpa da azeitona fresca com água quente, foram metiladas e os grupos carboxílicos reduzidos com LiAlD<sub>4</sub> e os resultados encontram-se na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Composição em ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes dos extractos de CDTA do CWM das azeitonas processadas e H<sub>2</sub>O a 80°C do CWM da azeitona em fresco (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção					
	CDTA - Verde		CDTA - Preta		ág.80°C -Fresca	
	C30v	C30v*	C30p	C30p*	HW	HW*
2-Rhap	2,1	2,1	2,3	1,7	2,1	1,9
3-Rhap	-	0,2	-	0,2	-	0,1
2,3-Rhap	-	0,4	-	0,4	-	0,5
2,4-Rhap	1,7	2,1	1,6	2,3	2,0	2,2
T-Araf	13,6	11,9	16,6	12,7	18,6	13,2
2-Araf	0,6	0,6	0,6	0,5	0,8	0,5
3-Araf	8,2	7,1	7,7	4,9	9,7	7,3
5-Araf	23,6	17,9	29,2	15,1	23,8	17,2
3,5-Araf	29,2	21,2	31,1	17,5	30,6	21,2
Arabinitol	3,6	1,4	3,2	1,2	2,2	1,3
T-Xylp	-	-	-	-	0,2	-
2-Xylp	-	-	0,7	-	-	-
4-Xylp	3,6	0,5	0,7	0,5	1,5	1,0
2,4-Xylp	1,6	1,5	1,4	1,4	2,0	0,8
Xilitol	2,1	-	-	-	-	-
Manitol	1,3	-	-	-	-	-
T-Galp	0,7	0,8	1,9	1,1	1,2	0,9
3-Galp	-	-	-	-	-	0,8
4-Galp	1,5	1,2	1,3	1,2	0,9	0,8
3,4-Galp	-	-	-	0,5	-	0,4
Galactitol	2,2	1,1	-	1,8	-	-
T-GalpA	-	0,7	-	0,9	-	0,4
4-GalpA	-	22,0	-	26,6	-	16,5
2,4-GalpA	-	3,2	-	4,1	-	2,4
3,4-GalpA	-	3,0	-	4,0	-	2,4
Galactitol(A)	-	-	-	-	-	0,9
4-Glcp	0,3	0,3	-	0,4	2,0	1,6
2,4-Glcp	-	0,4	-	0,4	-	-
3,4-Glcp	-	-	-	-	-	0,4
4,6-Glcp	-	-	-	-	0,7	-
Glucitol	4,1	0,4	1,7	0,6	1,7	0,5
T-GlcpA	-	-	-	-	-	4,8

\* Amostras reduzidas com LiAlD<sub>4</sub>.

A eficiência da redução dos grupos carboxílicos situou-se entre os 61% (HW) e os 91% (C30p) (Tabela 5.10). As amostras reduzidas revelam a mesma composição em ligações glicosídicas das amostras não reduzidas excepto nas percentagens de alditóis que diminuíram significativamente

nas amostras reduzidas; regista-se também um aumento dos resíduos de ramnose fruto do aumento da labilidade da ligação entre a ramnose e o produto de redução do ácido urónico. A análise por metilação é quantitativa para os açúcares neutros presentes; no entanto, na fracção C30p a análise de açúcares revela a presença de manose e glucose em quantidades não detectadas por metilação.

A maioria dos resíduos de ácido galacturónico encontrava-se em ligação (1→4), tendo sido também detectados resíduos ramificados em C-2 e C-3 e também resíduos em ligação terminal.

A composição em ligações glicosídicas dos resíduos de arabinose é relativamente semelhante nas amostras analisadas. As proporções relativas dos resíduos T-Araf : 3-Araf : 5-Araf : 3,5- Araf mantêm-se relativamente constantes e são semelhantes às encontradas para a azeitona fresca (ponto 3.5.2).

As substâncias pécnicas da azeitona fresca apresentavam resíduos de glucose em ligação (1→4). Estes resíduos encontram-se em quantidades vestigiais nas fracções C30v e C30p; na fracção HW estes resíduos atingem 2mol%. As quantidades envolvidas não são, no entanto, significativas para que possa ser tirada qualquer conclusão acerca da presença destes resíduos nas substâncias pécnicas.

#### 5.4.2 - Glucuronoxilanas

A metilação da fracção KCuv mostrou que a xilose existente na fracção se encontrava maioritariamente em ligação (1→4), encontrando-se 14% dos resíduos ramificados pelo carbono 2, possivelmente com ácido glucurónico terminal (Tabela 5.11, coluna 1). As fracções K12v e K5v, obtidas por diminuição de pH, não diferem significativamente, apresentando um grau de polimerização estimado em 230 resíduos e uma percentagem de ramificação de 10%.

A metilação da fracção KCup mostrou uma composição glicosídica semelhante à da fracção KCuv, detectando-se também a presença de vestígios de material pécnico. Este material pécnico - permaneceu na sua maior parte insolúvel em 1M NaOH, originando a fracção KIp, rica em arabinose e em ácido galacturónico em ligação (1→4).

Tabela 5.11 - Composição em ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes da hemicelulose A dos extractos de 1M KOH (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção											
	Verde					Preta						
	KCuv*	KCuv				KCup*	KCup					
	K12v	K12v*	K5v	K5v*		K1p	K1p*	K10p	K10p*	K6p	K6p*	
2-Rhap	-	-	-	-	-	-	1,6	1,5	-	-	-	0,2
3-Rhap	0,4	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	0,4	0,5	-	0,3
2,4-Rhap	-	-	-	-	-	0,2	0,9	2,9	-	-	1,0	0,3
T-Araf	0,2	-	0,6	0,3	0,2	1,3	16,2	14,5	0,4	0,7	2,2	2,4
2-Araf	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
3-Araf	-	-	-	-	-	0,4	-	4,4	-	-	0,6	0,6
5-Araf	-	-	-	-	-	1,0	20,8	13,0	-	-	2,2	2,0
3,5-Araf	-	-	-	-	-	1,1	17,8	16,7	0,3	0,3	2,4	2,2
Arabinitol	-	-	-	-	-	-	0,8	0,7	-	-	-	-
T-Xylp	0,4	0,3	0,6	0,3	0,4	0,5	0,6	0,6	0,4	0,5	0,8	0,7
3-Xylp	-	-	-	-	-	-	3,7	-	-	-	-	-
4-Xylp	79,4	83,9	83,3	80,9	83,1	79,7	27,2	21,3	86,5	81,6	82,7	72,0
2,4-Xylp	12,6	9,5	9,3	10,0	9,7	10,0	-	1,2	10,2	10,3	6,9	12,3
Xilitol	1,9	0,9	0,4	0,4	0,6	0,7	0,3	0,3	0,6	0,4	0,3	0,7
4-Galp	-	-	-	-	-	-	4,1	6,0	-	-	-	-
3,4-Galp	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
2-GalpA	0,4	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-
4-GalpA	-	-	-	-	-	0,7	-	7,7	-	-	-	0,6
3,4-GalpA	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-
T-Glcp	0,6	0,5	0,7	0,7	0,7	0,1	-	-	0,3	0,4	-	-
4-Glcp	-	-	-	-	-	-	3,0	3,1	-	-	0,7	-
4,6-Glcp	-	-	-	-	-	-	2,1	1,7	-	-	-	0,6
Glucitol	0,2	4,6	1,0	6,9	0,2	0,3	0,9	0,6	0,9	0,4	0,2	0,3
T-GlcpA	3,6	-	3,6	-	4,6	3,1	-	1,3	-	4,5	-	4,8
2-GlcpA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-
3-GlcpA	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.p. Xyl <sup>+</sup>	231	312	155	228	233	180	46	39	243	185	113	121
B.p. Xyl <sup>#</sup>	14	10	10	11	10	11	-	5	11	11	8	14

\* Amostras reduzidas com LiAlD<sub>4</sub>;

+ Grau de polimerização da xilana;

# Percentagem de pontos de ramificação da xilana.

A fracção K10p consistia numa glucuronoxilana com grau de polimerização estimado em 220 resíduos e percentagem de ramificação de 11%. O material solúvel a pH 6 (K6p) consistia numa -

glucuronoxilana com menor grau de polimerização (120 resíduos). Nada pode ser concluído quanto à percentagem de ramificação devido à não concordância dos valores obtidos para a percentagem de resíduos de (1→2,4)-Xylp na amostra. No entanto, este valor é da ordem de grandeza do encontrado para os restantes polímeros analisados.

Em todas as fracções ricas em xilanas analisadas se verifica a presença de quantidades vestigiais de resíduos de raminose em ligação (1→3). Estes resíduos têm sido detectados como constituintes do terminal redutor das xilanas de árvores de madeira dura, ligados a resíduos de ácido galacturónico em ligação (1→2) (ver ponto 1.2.7). Estes resíduos foram detectados nas fracções KCuv e KCup mas não nas restantes.

## 5.5 - Discussão Geral

Este estudo é a primeira tentativa sistemática de observação das variações ocorridas nas paredes celulares durante o processamento da azeitona. O estudo do efeito do processamento ao nível dos polímeros da parede celular da polpa da azeitona, não pretendendo ser exaustivo, permitiu o estabelecimento de algumas características relativas ao processo de degradação das paredes celulares por agentes externos.

A principal alteração estrutural da matriz celular com o processamento é devida à degradação dos polissacarídeos pécnicos. Esta alteração reflecte-se quer ao nível dos polímeros associados por pontes de Ca<sup>2+</sup> quer ao nível dos polissacarídeos pécnicos solubilizados com as soluções alcalinas e repercute-se nas características de textura das azeitonas processadas. Nestas azeitonas verificou-se também a ocorrência de uma quantidade significativa de co-precipitação de proteínas intra-celulares e compostos fenólicos, dando origem a material polimérico condensado o qual não é significativamente solúvel em soluções aquosas.

Parte do material pécnico é solubilizado durante a preparação do CWM (15 a 20% dos respectivos CWM); o material pécnico normalmente hidrolisado do CWM com soluções de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> encontra-se, nas azeitonas processadas, somente associado por pontes de Ca<sup>2+</sup>, sendo a maior parte solubilizada pelas soluções de CDTA. As alterações verificadas em termos de extractabilidade com

soluções de CDTA não se reflectiram em alterações significativas da estrutura das substâncias pécnicas, mantendo-se constantes as características das "ramnogalacturonanas" e "arabinanas" estudadas.

A degradação provocada pelo processamento possui algumas semelhanças com a extracção com água quente, provocando a despolimerização das pectinas por  $\beta$ -eliminação e originando uma pequena quantidade de oligossacarídeos ricos em arabinose.

As glucuronoxilanas presentes na polpa da azeitona não aparentam sofrer qualquer alteração com o processamento e a população mais abundante aparenta ter um grau de polimerização de 220-230 resíduos e uma percentagem de ramificação de 10-11%. Estas xilanas possuem ramnose em ligação (1 $\rightarrow$ 3) e ácido galacturónico em ligação (1 $\rightarrow$ 2).

As fracções ricas em xiloglucanas foram solubilizadas com soluções alcalinas de concentração menor do que as xiloglucanas da azeitona fresca. As xiloglucanas presentes não parecem ter sido alteradas pelo processamento, não tendo sido isoladas pelos métodos de fraccionamento utilizados. É provável que pequenas quantidades de xiloglucanas existam livremente na polpa das azeitonas processadas, tal como detectado por Gil Serrano *et al.* (1988) que isolaram e caracterizaram uma xiloglucana obtida a partir da polpa de azeitona verde processada segundo o estilo espanhol.