

6.1 - Preparação do CWM

O caroço da azeitona foi muito difícil de triturar pelos processos normais, tendo o material sido triturado em azoto líquido várias vezes para ser atingido um tamanho de partícula suficientemente pequeno para se proceder à extracção sequencial do CWM. O processo utilizado de trituração a baixas temperaturas não produz alterações significativas no material da parede celular (Lomax *et al.*, 1983). Durante a preparação do CWM foi evitada a utilização de temperaturas elevadas, sendo o material lavado com água e etanol à temperatura ambiente.

O CWM da parte lenhificada do caroço da azeitona (CWMst) é rico em xilose e glucose e o conteúdo total em açúcares é somente 62% do peso seco do CWMst (Tabela 6.1). Uma grande porção do material que não é composto por açúcares é provavelmente lenhina, podendo a dificuldade em triturar este material estar relacionada com o elevado conteúdo em lenhina que apresenta. A quantidade de lenhina presente poderá também ser a responsável por somente uma pequena quantidade de CWMst ter sido solubilizada com DMSO a 20°C (0,3%). Tentativas de solubilização de material com 80% de 1,4-dioxano (Azuma *et al.*, 1981) ou tiocianato de guanidínio 4M à temperatura ambiente ou oxalato de amónio a 1%, pH 5,0 a 80°C (Selvendran e King, 1989) não foram bem sucedidas.

6.2 - Deslenhificação do CWMst

6.2.1 - Tratamento do CWMst com Clorito/Ácido Acético

A tentativa de deslenhificar o CWMst por tratamento com clorito/ácido acético a 70°C durante 4h tal como descrito por Jermyn e Isherwood (1956) só foi parcialmente sucedida já que uma quantidade significativa de lenhina residual (degradada) ainda se encontrava presente no resíduo. Para remover 'completamente' a lenhina, o resíduo teve que ser tratado durante mais 5h com adição de clorito / ácido acético a intervalos de 1h. A holocelulose foi lavada abundantemente com água para que todos os vestígios de clorito fossem removidos e, na solução resultante da deslenhificação, foi

borbulhado árgon com o objectivo de remover o dióxido de cloro entretanto formado. No final, a solução foi concentrada e dialisada.

Tabela 6.1 - Composição em açúcares de fracções do material da parede celular do carço da azeitona obtido por extracção sequencial.

Fracção	Rendim. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
CWMst		1	v	2	48	v	1	41	8	619
água	0,8	8	1	11	15	19	5	28	14	171
DMSO-1	0,3	2	v	7	40	2	5	31	13	328
Clorito	4,8	4	2	16	51	1	4	2	19	210
Holocelulose	70,8	1	-	2	44	v	1	38	8	718
CDTA	0,4	3	1	10	61	1	4	3	16	313
DMSO-2	1,5	1	-	3	81	1	1	6	8	506
0.5M KOH sn.	11,5	1	-	3	77	-	2	v	17	616
ppt. ^f	13,6	1	-	1	86	-	v	v	12	773
1M KOH 1°C sn.	2,4	1	-	3	81	-	2	1	14	770
ppt. ^f	2,7	1	-	1	89	-	v	1	9	868
1M KOH 20°C sn.	0,8	1	-	3	77	v	2	2	15	836
ppt. ^f (K20)	1,0	1	-	v	91	-	v	v	8	889
4M KOH	0,4	2	-	6	71	1	3	4	15	667
4M KOH + borato	0,2	3	-	12	35	2	5	9	35	340
α-celulose sn-RCst	0,4	3	-	23	1	-	9	2	63	565
resíduo ^Ψ	30,6	v	-	1	2	v	1	92	3	925

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg;

^f Material precipitado no decorrer da diálise;

^Ψ α'-celulose;

v = Quantidades vestigiais.

A presença de dióxido de cloro durante a deslenhificação inibe a reacção via radicais livres entre o cloro e os polissacarídeos, actuando como "radical scavenger" sem afectar a cloração da lenhina, a qual não é uma reacção via radicais. O dióxido de cloro, por si só, reage muito lentamente com os polissacarídeos (Sjöstrom, 1981). No entanto, é provável que o meio seja suficientemente ácido para provocar a hidrólise de resíduos glicosídicos mais lábeis. Em experiências comparativas do efeito do tratamento com clorito/ácido acético em complexos de lenhina-polissacarídeos (Ford,

1986), foi verificado um aumento da polidispersão dos polímeros presentes. Esta alteração pode ter sido consequência da ruptura da lenhina, que actuaria como ligação de "cross-linking" entre os polissacarídeos, e não necessariamente consequência da ruptura de ligações glicosídicas intramoleculares.

O material polimérico isolado do licor de clorito possuía somente 21% de açúcares totais, mostrando ser rico em lenhina degradada por oxidação.

6.2.2 - Tratamento do CWM com Dioxano:H₂O:HCl

Paralelamente ao tratamento com clorito e ácido acético, o CWMst foi tratado com etanol a quente e com uma solução ácida de 1,4-dioxano:água, a fim de que os produtos resultantes pudessem ser comparados com os obtidos por tratamento com clorito e ácido acético.

O extracto solubilizado a partir do CWMst com etanol em refluxo durante 30 min foi concentrado e adicionado a um grande volume de água em agitação, registando-se a formação de um precipitado (Lenhina EtOH) que foi recolhido por filtração e seco em estufa a 40°C; o sobrenadante foi concentrado, dialisado e liofilizado (Esquema 2.7). O precipitado formado (2,4% do CWM) continha quase exclusivamente lenhina (Figura 6.1 e Tabela 6.2).

Não tendo sido possível solubilizar material com 1,4-dioxano a 80% segundo as técnicas descritas por Azuma *et al.* (1981) e Azuma (1989), o AIR foi tratado com uma solução ácida (HCl 2M) de 1,4-dioxano/água (9:1, v/v) segundo adaptação da técnica de Pepper e Siddiqueullah (1961b). A extracção realizou-se à temperatura ambiente a fim de evitar uma possível degradação dos polímeros pelo aquecimento. Foi recolhida uma fracção rica em lenhina (Lenhina 20°C) que correspondia a 0,1% do material inicial, sendo também de 0,1% uma fracção solúvel em água (LCC 20°C). Esta fracção era rica em açúcares, principalmente ácido urónico e xilose (Tabela 6.2), e continha também lenhina. No resíduo final permaneceu 91% do material.

Como a quantidade de lenhina removida por este tratamento foi insignificante, o AIR inicial foi extraído com a mesma solução só que com refluxo de 30 min, tendo sido recolhida uma fracção de lenhina que correspondia a 18,8% do material inicial (Lenhina 87°C). O resíduo final ficou reduzido a 45% do material inicial. O material que permaneceu solúvel em água (LCC 87°C) era rico em ácido

urónico e xilose, num total de 35% de açúcares totais. Esta fracção continha menor percentagem de arabinose e galactose do que a fracção solúvel extraída com o mesmo solvente a 20°C, provavelmente devido à maior labilidade das ligações dos resíduos destes açúcares em meio ácido a quente.

Tabela 6.2 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas do CWMst com 1,4-dioxano/água/HCl e fracções obtidas após precipitação gradual com soluções de etanol (ver Esquema 2.7).

Fracção	Rend. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
<i>AIR</i>										
<i>Lenhina EtOH</i>	2,4									27 [•]
<i>Dioxano:H₂O:HCl 20°C</i>										
<i>Lenhina 20°C</i>	0,1									127 [•]
<i>LCC 20°C</i>	0,1	3	v	15	35	1	8	2	36	703
resíduo insol. [#]	7,2	2	v	8	51	v	5	8	26	479
<i>EtOH 50%</i>	39,2	4	v	8	24	v	5	1	58	819
<i>EtOH 65%</i>	16,4	5	v	11	40	v	16	2	26	800
<i>EtOH 85%</i>	10,4	2	v	11	59	1	12	3	12	733
<i>resíduo 20°C</i>	90,8	1	v	2	51	v	1	37	8	578
<i>Dioxano:H₂O:HCl 87°C</i>										
<i>Lenhina 87°C</i>	18,8									92 [•]
<i>LCC 87°C</i>	0,2	2	1	5	39	1	1	4	47	354
resíduo insol. [#]	3,1	2	v	6	39	1	2	10	40	194
<i>EtOH 75%</i>	15,8	2	v	6	17	1	2	6	66	666
<i>EtOH 90%</i>	6,3	5	v	6	30	1	2	7	49	364
<i>EtOH 95%</i>	10,0	2	v	38	25	v	1	3	31	556
<i>EtOH 95% sn.</i>	43,8	2	v	5	49	v	1	4	39	307
<i>resíduo 87°C</i>	45,2	1	v	2	32	v	v	58	7	608

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg;

Material insolúvel em água;

• Açúcares totais determinados por reacção com fenol/ácido sulfúrico;

v = Quantidades vestigiais.

6.2.3 - Espectros de Absorção de Lenhinas no Ultra-Violeta

A existência de lenhina degradada pelo tratamento com clorito/ácido acético pode ser verificada por comparação do espectro de absorção no ultra-violeta, particularmente o espectro de diferença (Figura 6.1 b), da fracção contendo a lenhina obtida a partir da fracção solúvel em clorito (EtOH 95% solúvel, ver Tabela 6.3) com a fracção "LCC 87°C" e com a fracção "Lenhina EtOH" (material extraído com álcool quente a partir do CWMst) (Figura 6.1 e Tabela 6.2).

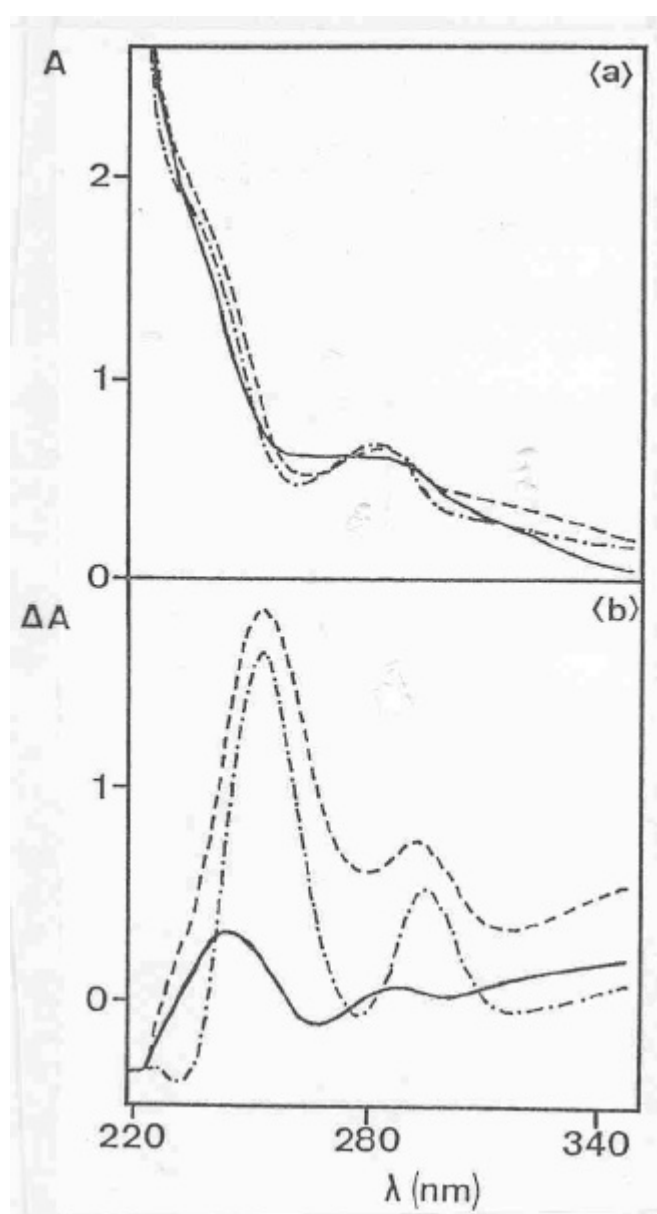


Figura 6.1 - Espectro de absorção no ultra-violeta (a) e espectro de diferença (b) de lenhinas solubilizadas dos extractos: —, clorito, solúvel em EtOH; ---, dioxano/água/HCl a 87°C; -.-, etanol quente.

Por comparação com resultados publicados (Arseneau e Pepper, 1965), pode ser inferido que o máximo de absorção próximo de ΔA_{300} , resultante do ião fenóxido, é pronunciadamente reduzida nos polímeros solubilizados com clorito; o máximo de absorção próximo de ΔA_{250} , o qual é provavelmente devido ao núcleo benzenóide, teve, no polímero solúvel em clorito, uma diminuição pronunciada ligeiramente desviada para um menor comprimento de onda.

6.3 - Extração Sequencial da Holocelulose

A holocelulose resultante do tratamento com clorito/ácido acético foi extraída com CDTA e DMSO a 20°C. Mesmo após prolongado tratamento de deslenhificação a quantidade de CWM solubilizada com estes reagentes foi muito pequena. O tratamento com DMSO pretendia solubilizar xilanas eventualmente acetiladas mas a quantidade solubilizada foi somente 1,5% da massa seca do CWMst.

O resíduo insolúvel em DMSO foi extraído sequencialmente com soluções de KOH de concentração crescente (Tabela 6.1) até à obtenção do resíduo de α -celulose, o qual é 31% do peso seco do CWMst. A suspensão do resíduo foi ajustada a pH 5 com ácido acético glacial e a mistura foi dialisada contra água destilada durante 3 dias. A suspensão resultante foi centrifugada e ambos, o sobrenadante e o resíduo (α' -celulose), foram liofilizados. O sobrenadante (sn-RCst, 0,4% do CWMst) era rico em ácido urónico, arabinose e galactose, sendo provavelmente de origem péctica.

A α' -celulose era rica em glucose proveniente da celulose e possuía uma quantidade insignificante de outros polissacarídeos associados. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para a α -celulose dos tecidos lenhificados da vagem do feijão (Selvendran e King, 1989), no entanto, contrastam com as quantidades significativas de polissacarídeos pécticos e glicoproteínas associadas ao resíduo rico em celulose dos tecidos parenquimatosos da vagem do feijão verde (Ryden e Selvendran, 1990a) e da polpa da azeitona (capítulo 3).

Os extractos solúveis nas soluções alcalinas foram neutralizados e, durante a diálise, originaram precipitados que foram removidos por centrifugação. Em geral, as fracções de hemi-celulose A (Hemi-A) tinham quantidades relativamente grandes de xilose e pequenas de ácido urónico

quando comparadas com as fracções de hemicelulose B (Hemi-B). Estas últimas tinham quantidades pequenas mais significativas de polissacarídeos pécticos associados. O material polimérico isolado do extracto de 4M KOH é mais comparável com a fracção de Hemi-B e o material solubilizado por 4M KOH + borato é rico em polissacarídeos pécticos, sendo mais comparável com o material péctico proveniente do resíduo de α -celulose.

6.4 - Fraccionamento dos Extractos

6.4.1 - Polímeros Solubilizados pelo Clorito

Como a informação disponível acerca dos polissacarídeos solubilizados juntamente com a lenhina durante a deslenhificação é escassa, os polímeros solúveis na solução de clorito foram submetidos a um fraccionamento por precipitação gradual com etanol (Tabela 6.3). Curiosamente, não houve precipitação de polímeros até que a concentração do álcool atingisse 75% (v/v), possivelmente devido à lenhina degradada associada. O material que precipitou com 85 e 90% de etanol tinha um teor muito baixo em polissacarídeos e a maioria do material que permaneceu solúvel em etanol a 95% era principalmente lenhina degradada. O espectro de absorção no ultra-violeta desta fracção é mostrado na Figura 6.1.

A maior fracção, precipitada com 75% de etanol, foi resolvida por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl M originando 4 fracções (Figura 6.2 e Tabela 6.3). Todas as fracções exibiam forte absorção no ultra-violeta devido à presença da lenhina degradada, sendo a presença da lenhina reflectida no baixo teor em açúcares de todas as fracções, particularmente a fracção eluída com tampão contendo 0,5M de NaCl (ChD), a qual era muito rica em compostos fenólicos. Pelo facto dos perfis da quantidade de açúcar e absorção a 280 nm co-eluírem, pode ser inferido que os polissacarídeos e os compostos fenólicos se encontram provavelmente ligados. Duas destas fracções, ChA, rica em xilose e relativamente pobre em ácido urónico, e ChB, com quantidades comparáveis de xilose e ácido urónico, foram sujeitas a análise por metilação.

Tabela 6.3 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas com clorito após precipitação gradual com soluções de etanol seguido de cromatografia de troca aniónica.

Fracção	Rend. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
resíduo insol. #	5,6	2	1	7	41	2	2	39	6	82
EtOH 75%	24,1	2	1	11	49	1	5	1	30	473
resíduo insol. #	2,0	8	-	18	31	3	4	7	30	151
Tampão (ChA)	25,7	2	-	3	74	1	3	2	16	693
0.125M NaCl (ChB)	14,6	5	v	18	30	1	5	2	41	546
0.25M NaCl (ChC)	13,1	5	-	21	19	1	6	3	46	359
0.5M NaCl (ChD)	13,6	5	-	24	16	2	8	6	39	174
EtOH 85%	10,6	2	1	22	54	3	4	1	11	255
EtOH 90%	18,5	2	1	28	56	2	3	1	8	133
EtOH 95%	9,8	4	1	25	47	2	3	3	16	73
EtOH 95% sn.	29,6	7	-	7	29	3	2	10	43	38

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg;

Material que se tornou insolúvel após liofilização;

v = Quantidades vestigiais.

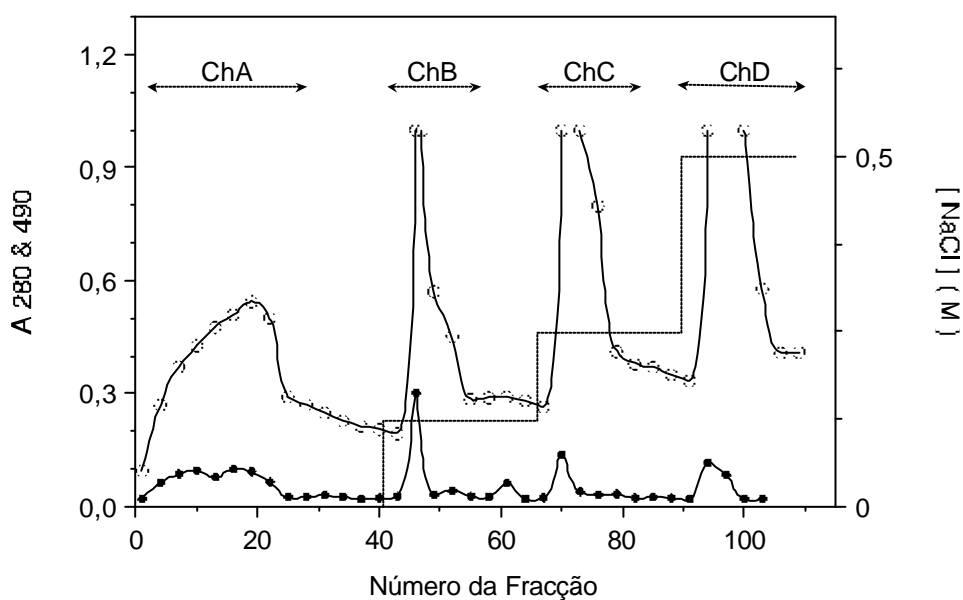


Figura 6.2 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl da fracção EtOH 75% do extracto de clorito do CWMst.

● - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl.

6.4.2 - Polímeros Solubilizados com 1,4-Dioxano

O material solúvel em água, solubilizado com a solução ácida de dioxano:água a 20°C, foi ressuspendido em água, uma pequena porção de um resíduo insolúvel foi removida por centrifugação e o restante material foi precipitado com soluções de concentração crescente de etanol. O fraccionamento com etanol originou 3 fracções (Tabela 6.2), todas apresentando forte absorção no ultra-violeta. O material precipitado com 50% de etanol, a fracção mais abundante, era muito rico em ácido urónico e também continha xilose; as restantes fracções, sendo também ricas nestes dois açúcares, apresentavam maior quantidade de xilose do que de ácido urónico.

O material solúvel em água, solubilizado com a solução ácida de dioxano:água em refluxo, foi ressuspendido em água, um resíduo insolúvel foi removido e o sobrenadante foi fraccionado com soluções de etanol originando 4 fracções (Tabela 6.2), todas com forte absorção no ultra-violeta. Tal como no fraccionamento do extracto de clorito, não houve precipitação até que a concentração de etanol atingisse os 75% e grande parte do material era solúvel em 95% de etanol. Todas as fracções eram ricas em ácido urónico e xilose, numa razão que diminuía à medida que a concentração de etanol aumentava. O material precipitado a 95% era também rico em arabinose.

A composição glicosídica destas fracções sugere a presença de complexos entre lenhina, xilanas e substâncias pécticas. Estes compostos ocorrem em muito pequena quantidade no CWM dos tecidos lenhificados do carço da azeitona.

6.4.3 - Hemicelulose B da Fracção Extraída com 0,5M KOH

O material, solúvel em água, contido nesta fracção foi precipitado com etanol (Tabela 6.4).

O material precipitado com 30% de etanol era rico em xilose e tinha uma quantidade significativa de ácido urónico, sugerindo que esta fracção pudesse conter complexos entre xilanas e substâncias pécticas. A maioria do material (75%) foi precipitado com 50 e 60% de etanol, contendo estas fracções principalmente xilanas acídicas. As fracções mais solúveis em etanol (precipitadas com 80 e 90% e a fracção solúvel a 90%) eram ricas em ácido urónico, e a composição em açúcares sugere que contivessem principalmente complexos xilanas-polissacarídeos pécticos.

Tabela 6.4 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas com 0,5M KOH (Hemicelulose B) após precipitação gradual com soluções de etanol seguido de cromatografia de troca aniónica.

Fracção	Rend. (%)	Açúcares da parede celular (mol%)								Açúcares totais* (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
resíduo insol. [#]	3,9	v	1	3	80	v	1	v	15	654
EtOH 30% (Hs30)	10,0	1	-	3	69	v	2	1	24	664
resíduo insol. [#]	3,4	1	-	1	82	v	v	1	15	713
Tampão (HsA)	42,1	2	-	2	80	v	v	1	15	755
0.125M NaCl (HsB)	8,8	2	-	6	68	1	4	3	16	556
0.25M NaCl (HsC)	22,3	3	-	12	12	1	7	2	64	572
0.5M NaCl (HsD)	14,4	4	v	23	10	1	11	13	49	414
1M NaCl (HsE)	4,6	4	-	25	26	3	13	7	23	199
EtOH 50% (Hs50)	57,2	1	-	3	84	v	2	v	10	641
EtOH 60% (Hs60)	18,1	1	v	2	82	v	1	v	13	792
EtOH 80% (Hs80)	3,7	3	v	13	58	v	7	1	18	493
EtOH 90%	2,1	3	v	14	47	1	v	9	25	314
EtOH 90% sn.	7,5	3	1	16	35	1	9	2	33	103

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg;

Material que se tornou insolúvel após liofilização;

v = Quantidades vestigiais.

O material precipitado com 30% de etanol foi posteriormente resolvido por cromatografia de troca aniónica em DEAE-Trisacryl M em 5 fracções principais (Figura 6.3). Pelo perfil de eluição destas fracções verifica-se que os polissacarídeos e o material com absorção no ultra-violeta co-eluem, podendo ser inferido conterem material fenólico (lenhina) associado. O facto das fracções 4 e 5 (HsD e HsE) apresentarem baixo teor em açúcares está de acordo com o conteúdo em compostos fenólicos. A fracção HsA, rica em xilanas acídicas, e a fracção HsC, que continha quantidade significativa de ácido urónico provavelmente de origem péctica, foram submetidas a análise por metilação.

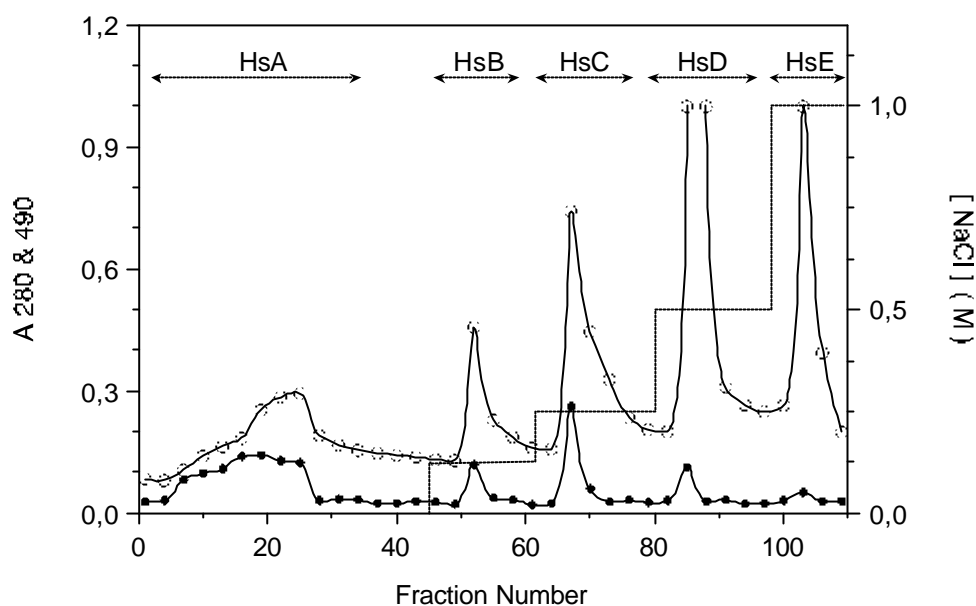


Figura 6.3 - Cromatografia em DEAE-Trisacryl da fracção EtOH 30% do extracto de 0,5M KOH.
 • - A₄₉₀; ○ - A₂₈₀; ----, gradiente de NaCl.

6.4.4 - Hemicelulose A das Fracções Extraídas com 0,5M e 1M KOH

A Hemi-A resultante do extracto de 0,5M KOH foi dissolvida em 0,5M NaOH e submetida a precipitação gradual com etanol. Os polissacarídeos precipitados a diferentes concentrações de etanol foram dispersos em água, a suspensão foi ajustada a pH 5 com ácido acético, dialisada, liofilizada e analisada quanto à composição em açúcares (Tabela 6.5). A fracção maior (70%) foi obtida por precipitação com 25% de etanol (Hp25), mostrando ser uma xilana pura com alguns compostos fenólicos associados. Esta xilana possui uma razão molar xilose/ácido urónico de 9:1. Uma xilana semelhante foi obtida com etanol a 50%. As fracções subsequentes continham polissacarídeos pécnicos associados com xilanas, por inferência devido aos baixos valores da razão Xyl/Ác.Ur.

A Hemi-A resultante do extracto de 1M KOH a 1°C foi dispersa em 1M NaOH e o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação. O pH do sobrenadante foi baixado por adição gradual de HCl, sendo obtido um precipitado a pH 12 e outro a pH 3 (K3). Pela composição em açúcares destas fracções e do material solúvel a pH 3 (Tabela 6.5) verifica-se serem todas ricas em xilose, contendo também ácido urónico, sendo muito provavelmente xilanas ácidas puras.

Tabela 6.5 - Composição em açúcares das fracções solubilizadas a partir da hemicelulose A dos extractos de 0,5M KOH e 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>0,5M KOH ppt.</i>										
Resíduo insol.NaOH NaOH sn.	2,7	1	-	1	75	v	1	2	20	661
EtOH 25% (Hp25)	69,8	1	v	1	88	v	v	v	10	745
EtOH 50%	6,2	1	v	1	85	v	1	v	12	815
EtOH 70%	2,4	2	v	9	67	v	5	1	16	641
EtOH 80%	1,3	7	2	10	40	5	3	3	32	92
EtOH 80% sn.	2,4	1	v	3	76	v	1	1	17	272
<i>1M KOH 1°C ppt.</i>										
Resíduo insol.NaOH NaOH sn.	5,7	1	-	1	86	v	v	6	5	327
pH 12 ppt.	68,6	1	-	1	88	-	v	v	11	821
pH 3 ppt. (K3)	9,2	1	-	1	85	v	v	1	12	811
pH 3 sn.	4,4	1	v	2	82	v	1	1	13	805

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg;

v = Quantidades vestigiais.

6.5 - Análise das Ligações Glicosídicas

Na discussão que se seguirá a metilação do CWM e da holocelulose será abordada em primeiro lugar, seguindo-se os complexos de xilanas-polissacarídeos pécticos provenientes das fracções de clorito e de Hemi-B, a discussão sobre as glucuronoxilanas e por último as fracções provenientes da α -celulose.

A ocorrência de glucuronoxilanas pode ser inferida pela presença de resíduos de Xylp em ligação (1→4) e (1→2,4) e, se os grupos carboxílicos da amostra tiverem sido reduzidos, pela ocorrência de GlcpA em ligação terminal. A ocorrência de polissacarídeos pécticos pode ser inferida pela presença de resíduos de Rhap principalmente em ligação (1→2) e (1→2,4) e pela presença de resíduos de arabinose e/ou galactose ligados de maneira variada. Se os grupos carboxílicos da amostra tiverem sido reduzidos, a presença de (1→4)-GalpA é também diagnóstica da ocorrência de polissacarídeos pécticos.

O grau de polimerização (d.p.) das glucuronoxilanas, incluído nas tabelas em que se analisam as ligações glicosídicas (Tabelas 6.6 a 6.9), foi inferido a partir da razão da totalidade de resíduos de xilose em relação aos resíduos de xilose em ligação terminal; a percentagem de pontos de ramificação (b.p.) das glucuronoxilanas incluída nas mesmas tabelas foram inferidas a partir da razão de (1→2,4)-Xylp para a totalidade de resíduos de xilose presentes.

6.5.1 - Metilação do CWM e da Holocelulose

A metilação do CWM dos tecidos lenhificados do caroço da azeitona (CWMst) produziu uma grande quantidade de xilitol (Tabela 6.6) e a quantidade de glucose detectada foi muito inferior à quantidade presente, determinada pela análise de açúcares. Os principais resíduos parcialmente metilados foram (1→4)-Xylp e (1→4)-Glc p, diagnósticos de xilana e celulose, respectivamente. A detecção de 2-O-Me-xilitol, que indica a presença de (1→3,4)-Xylp, é muito provável que seja resultado de um efeito de submetilação; a submetilação não foi tão significativa nos resíduos de glucose.

Os resultados de submetilação encontrados contrastam com os da metilação dos tecidos lenhificados da palha de cevada (13% de lenhina) e da madeira de faia (20% de lenhina), em que a submetilação não foi significativa (Lomax *et al.*, 1983). Com o objectivo de verificar se a lenhina presente no caroço da azeitona (27%) (Nefzaoui, 1987) era a responsável pela submetilação verificada, o resíduo resultante da deslenhificação com clorito / ácido acético (holocelulose) foi metilado.

A metilação da holocelulose não originou submetilação significativa, verificando-se, por comparação com os valores obtidos para o CWMst, uma diminuição dos resíduos de xilitol e os identificados como (1→3,4)-Xylp. A maior parte dos resíduos de xilose da holocelulose encontram-se em ligação (1→4) com cerca de 10% ramificados em O-2. Os resíduos de glucose encontram-se maioritariamente em ligação (1→4), não sendo detectados resíduos ramificados em quantidades significativas. É provável que a glucose seja só proveniente da celulose. A arabinose presente encontra-se sempre na forma de furanose, em ligação terminal, (1→5) ou (1→3,5).

Tabela 6.6 - Composição em ligações glicosídicas do CWM dos tecidos lenhificados do carço (CWMst), da holocelulose e dos polissacarídeos provenientes dos extractos de clorito (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção			
	CWMst	Clorito		Holocelulose
		ChA	ChB	
T-Rhap	-	0,2	1,4	-
2-Rhap	-	-	1,4	-
3-Rhap	-	0,3	0,2	-
2,4-Rhap	-	-	0,7	-
T-Fucp	-	0,3	0,5	-
T-Araf	0,6	1,2	6,5	1,0
2-Araf	-	-	1,2	-
3-Araf	0,3	0,3	2,7	-
5-Araf	1,1	0,9	9,9	1,0
2,5-Araf	-	-	0,5	-
3,5-Araf	2,2	0,9	6,8	1,1
Arabinitol	1,9	-	0,5	0,3
T-Xylp	0,3	2,3	1,8	0,9
4-Xylp	14,8	83,9	51,4	48,2
2,3-Xylp	-	-	0,9	-
2,4-Xylp	0,5	3,6	3,9	5,0
3,4-Xylp	9,5	-	-	0,9
Xilitol	47,5	0,2	0,2	4,8
4-Manp	-	0,2	-	0,8
Manitol	0,6	-	-	0,4
3-Galp	-	0,1	0,6	-
6-Galp	-	0,5	1,2	-
3,4-Galp	-	-	0,3	-
3,6-Galp	-	-	1,4	-
Galactitol	1,2	0,4	-	0,4
T-Glcp	0,2	-	-	-
4-Glcp	12,3	2,0	2,9	31,8
2,4-Glcp	-	-	-	0,3
3,4-Glcp	0,7	-	-	0,2
4,6-Glcp	1,0	0,8	0,7	0,9
3,4,6 Glcp	0,6	-	-	-
Glucitol	4,7	1,9	2,4	2,0
D.p. Xyl ⁺		39	32	
B.p. Xyl [#]		4	7	

⁺ Grau de polimerização da xilana;

[#] Percentagem de pontos de ramificação da xilana.

Estes resultados parecem demonstrar que o facto de o CWMst se encontrar muito lenhificado poderá ter sido a origem da submetilação registada. A lenhina terá impedido a metilação da celulose, não tendo a concentração de ácido utilizado na hidrólise (TFA 2M) sido suficiente para libertar os resíduos de glucose. A metilação de grande parte dos resíduos de xilose também não ocorreu, tendo estes sido detectados na forma de xilitol. A detecção de resíduos de xilose aparentemente em ligação (1→3,4) no CWMst, detectados em muito pequena quantidade na holocelulose, permite inferir que, o grupo hidroxilo do C-2 da xilose, ou é mais reactivo na reacção de metilação do que o C-3 ou este último estava prioritariamente bloqueado pela lenhina.

6.5.2 - Complexos Xilanas-Polissacarídeos Pécticos

A análise por metilação das fracções ChA e ChB (Tabela 6.6), obtidas a partir da cromatografia de troca aniónica do extracto de clorito precipitado com 75% de etanol, revelou conter - principalmente xilanas de cadeia curta (d.p. 30-40), facto que possivelmente contribui para a sua fácil extracção. A fracção neutra (ChA) continha principalmente xilanas enquanto que a fracção eluída com tampão contendo 0,125M de NaCl (ChB) apresentava diferentes variedades de ligações dos resíduos de arabinose e ramnose, encontrando-se também presentes as ligações características das xilanas, mostrando ser uma fracção rica em complexos xilanas-polissacarídeos pécticos.

A fracção Hs30 (Tabela 6.7), obtida a partir da Hemi-B extraída com 0,5M KOH e precipitada com 30% de etanol, mostrou conter principalmente xilanas e polissacarídeos pécticos. Quando resolvida em várias fracções por cromatografia de troca aniónica, o material neutro (HsA) e o eluído com tampão contendo 0,125M NaCl foram submetidos a análise das ligações glicosídicas. A fracção HsA mostrou conter principalmente um polissacarídeo do tipo das glucuronoxilanas enquanto a fracção HsC mostrou conter um complexo xilana-polissacarídeo péctico. A sobreposição entre a absorção no ultra-violeta e a variação da quantidade de açúcar presente mostrou também a presença de lenhina degradada associada a este complexo. Recentemente foi provado que na madeira de *Pinus densiflora*, uma planta Gimnospérmica, ocorrem ligações benzílicas éster (Watanabe e Koshijima, 1988) e éter (Watanabe *et al.*, 1989) entre a lenhina e os polissacarídeos da parede celular.

Tabela 6.7 - Composição em ligações glicosídicas de polissacarídeos provenientes do extracto de 0,5M KOH (Hemicelulose B) (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligaço	Fracção							
	Hs30*	Fraccionamento de Hs30				Hs50	Hs60*	Hs80
		HsA	HsA*	HsC	HsC*			
T-Rhap	-	-	-	0,7	1,7	-	-	-
2-Rhap	0,3	-	-	1,1	1,1	0,1	0,1	0,2
3-Rhap	0,6	-	0,3	-	0,2	0,2	0,6	0,5
2,4-Rhap	0,5	-	-	0,5	1,0	0,1	0,3	0,6
3,4-Rhap	-	-	-	-	-	0,2	-	-
T-Fucp	-	-	-	0,5	0,3	0,1	-	0,3
T-Arap	-	-	-	1,4	2,7	-	-	-
T-Araf	1,5	0,6	0,7	11,5	9,4	1,2	1,0	5,1
2-Araf	-	-	-	0,8	-	-	-	-
3-Araf	0,3	-	-	2,2	2,5	0,1	0,1	0,9
5-Araf	1,0	-	-	12,4	10,4	0,8	0,3	4,3
2,5-Araf	0,2	-	0,2	0,3	0,4	0,2	-	0,5
3,5-Araf	1,2	0,1	0,1	4,4	4,1	0,5	0,3	4,1
Arabinitol	-	0,2	-	1,1	0,1	0,1	-	-
T-Xylp	1,4	2,1	2,5	1,7	1,9	1,6	1,7	2,8
4-Xylp	71,3	89,6	87,5	37,4	35,3	86,9	78,1	66,9
2,4-Xylp	6,8	6,0	8,0	1,7	2,0	5,7	10,1	8,5
3,4-Xylp	-	-	-	-	-	-	-	1,1
Xilitol	0,4	0,2	0,1	0,4	0,7	0,1	0,1	0,3
T-Manp	-	-	-	-	0,1	-	-	-
4-Manp	-	-	-	0,4	0,8	-	-	-
3-Galp	0,2	-	-	0,3	0,5	0,1	-	-
6-Galp	0,5	-	-	4,3	4,7	0,4	-	1,8
2,6-Galp	0,3	-	-	-	-	-	-	-
3,4-Galp	-	-	-	-	0,8	-	-	-
3,6-Galp	0,2	-	-	3,9	5,5	-	-	1,3
Galactitol	-	0,2	-	0,8	0,2	-	-	-
2-GalpA	-	-	0,2	-	-	-	-	-
4-GalpA	0,8	-	-	-	7,0	-	-	-
3,4-GalpA	-	-	-	-	0,3	-	-	-
T-Glcp	-	-	-	0,3	0,3	-	-	-
2-Glcp	-	0,1	0,1	-	0,2	-	-	-
4-Glcp	1,1	-	-	1,0	1,6	1,1	0,3	-
4,6-Glcp	-	-	-	0,3	-	-	-	-
Glucitol	4,6	0,9	0,1	10,6	1,1	0,5	1,2	0,8
T-GlcpA	6,4	-	0,2	-	2,0	-	5,8	-
2-GlcpA	0,2	-	-	-	0,6	-	-	-
3-GlcpA	0,2	-	-	-	-	-	-	-
4-GlcpA	-	-	-	-	0,6	-	-	-
D.p. Xyl ⁺	56	47	39	24	21	60	53	29
B.p. Xyl [#]	8	6	8	4	5	6	11	12

* Amostras reduzidas com LiAlD₄;⁺ Grau de polimerização das xilanas;[#] Percentagem de pontos de ramificação das xilanas.

Tabela 6.8 - Composição em ligações glicosídicas de polissacarídeos de fracções provenientes dos extractos de 0,5M KOH e 1 M KOH (Hemicelulose A), da α -celulose e do resíduo de α '-celulose (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligaço	Fracção					
	0,5M KOH Hp25	1M KOH		α -celulose		
		K3	K20	sn-RCst	sn-RCst*	res. ^Ψ
T-Rhap	-	-	-	0,7	0,6	-
2-Rhap	-	-	-	2,9	3,6	-
3-Rhap	-	-	-	0,1	0,1	-
2,4-Rhap	-	-	-	1,3	2,8	-
T-Fucp	-	-	-	0,5	0,3	0,2
T-Arap	-	-	-	1,1	0,6	-
T-Araf	0,7	0,5	0,3	17,7	15,5	0,5
2-Araf	-	-	-	0,6	0,4	-
3-Araf	-	-	-	4,8	4,8	0,2
5-Araf	-	-	-	26,5	22,2	0,7
2,5-Araf	-	-	-	0,2	0,3	-
3,5-Araf	-	-	-	23,4	19,4	5,3
Arabinitol	-	0,2	-	1,2	0,4	1,0
T-Xylp	1,1	1,0	0,9	1,2	1,0	0,4
2-Xylp	-	-	-	0,2	0,2	-
4-Xylp	91,4	91,0	92,4	1,1	1,4	4,2
2,4-Xylp	6,8	5,3	5,3	1,0	1,0	-
Xilitol	-	0,2	-	0,1	0,1	0,7
4-Manp	-	-	-	-	-	0,4
T-Galp	-	0,1	-	5,8	7,8	-
3-Galp	-	-	-	1,4	0,9	-
4-Galp	-	-	-	1,0	2,2	-
6-Galp	-	0,1	-	2,6	3,0	-
3,4-Galp	-	-	-	-	3,1	-
3,6-Galp	-	-	-	1,9	-	-
4,6-Galp	-	-	-	0,5	-	-
Galactitol	-	-	-	0,3	0,2	-
4-GalpA	-	-	-	-	4,7	-
3,4-GalpA	-	-	-	-	0,1	-
T-Glcp	-	-	-	0,3	0,3	0,2
3-Glcp	-	1,2	-	-	-	-
4-Glcp	-	0,5	0,5	0,2	1,1	54,6
2,4-Glcp	-	-	-	0,2	0,3	1,3
3,4-Glcp	-	-	-	-	-	2,8
4,6-Glcp	-	-	-	0,2	0,4	5,7
2,3,4-Glcp	-	-	-	-	-	1,9
2,4,6-Glcp	-	-	-	-	-	2,6
3,4,6-Glcp	-	-	-	-	-	6,0
Glucitol	-	0,9	0,6	1,0	0,6	11,3
T-GlcpA	-	-	-	-	0,6	-
D.p. Xyl ⁺	89	98	110			
B.p. Xyl [#]	7	5	5			

* Amostras reduzidas com LiAlD₄;Ψ Resíduo insolúvel da α -celulose (α '-celulose);

+ Grau de polimerização da xilana;

Percentagem de pontos de ramificação da xilana.

As fracções solúveis em etanol, como Hs60 e Hs80, continham xilanas muito ramificadas quando comparadas com as xilanas da fracção Hs30. A análise das ligações glicosídicas das fracções de Hemi-B do extracto de 0,5M KOH gradualmente precipitadas com etanol mostraram que as xilanas que tendiam a permanecer em solução eram geralmente mais ramificadas e o grau de polimerização tendia a ser baixo (Tabela 6.7). Estas xilanas eram mais curtas e ramificadas do que as encontradas na Hemi-A dos extractos de 0,5 e 1M KOH, discutidas a seguir.

6.5.3 - Glucuronoxilanas

As fracções de Hemi-A dos extractos de 0,5M KOH (Hp25), 1M KOH 1°C (K3) e 1M KOH 20°C (K20) foram seleccionadas para a análise por metilação (Tabela 6.8). Todas elas mostraram ser glucuronoxilanas relativamente puras, confirmando os resultados obtidos pela análise de açúcares. A fracção Hp25 foi analisada por espectroscopia de RMN de ^{13}C (Figura 6.4) confirmando as características inferidas pela análise por metilação num espectro muito semelhante, apesar da menor resolução, ao obtido para a xilana da polpa da azeitona (Figura 3.11): resíduos de xilose em ligação $\beta(1\rightarrow4)$ e $\beta(1\rightarrow2,4)$ e resíduos de 4-*O*-Me- α -D-GlcpA em ligação terminal. A percentagem de ramificação, calculada pelas áreas dos sinais do C-1 dos resíduos de (1 \rightarrow 4)-Xylp e (1 \rightarrow 2,4)-Xylp do espectro de RMN, foi 7%, o mesmo valor que o encontrado para a percentagem de ramificação por análise por metilação.

Recentemente, com base no facto de não ter sido detectado ácido 4-*O*-metil-glucurónico em glucuronoxilanas de sementes de *Cajus cajan*, um legume, nem possivelmente num conjunto de sementes em que se incluíam a soja (Aspinall *et al.*, 1966) e os cereais (Montgomery e Srivastava, 1956), foi proposto (Swamy e Salimath, 1990) que os tecidos lenhificados que revestem as sementes fossem constituídos por xilanas substituídas só por ácido glucurónico. A presença de ácido 4-*O*-metil-glucurónico nos tecidos lenhificados do caroço da azeitona assim como nos tecidos lenhificados de sementes de girassol (Bazus *et al.*, 1992; Düsterhöft *et al.*, 1992), palma (Düsterhöft *et al.*, 1992) e algodão (Matsuo *et al.*, 1991) não parecem corroborar a hipótese emitida. É provável que no mesmo tecido lenhificado das sementes coexistam resíduos de ácido glucurónico substituído ou não (Matsuo

et al., 1991), tal como se verificou ocorrer nos tecidos lenhificados da vagem do feijão (Selvendran e King, 1989).

As xilanas menos extractáveis tendem a ter maior grau de polimerização e menor percentagem de pontos de ramificação, uma característica comum quer às xilanas da Hemi-A (Tabela 6.8) como da Hemi-B (Tabela 6.7).

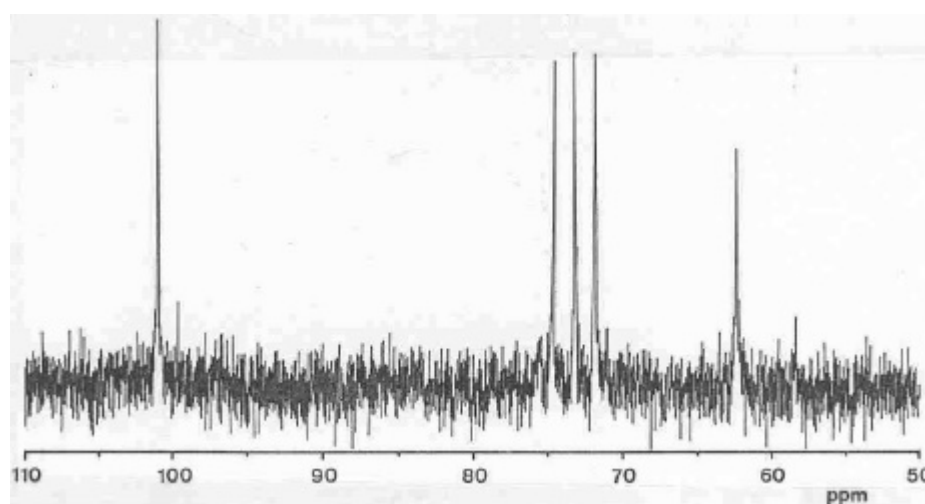


Figura 6.4 - Espectro de RMN de ^{13}C da xilana da fracção Hp25.

a) Hidrólise Ácida Parcial

Tendo sido isoladas glucuronoxilanas puras e para se poder avaliar a distribuição do ácido glucurónico, a fracção Hp25 foi submetida a um curto tratamento com TFA. Os oligómeros libertados foram separados numa coluna de Bio-Gel P4 de acordo com o grau de polimerização. As fracções contendo grau de polimerização de 7, 10, 14 e 17, inferido pela sequência de eluição, foram analisadas por metilação (Tabela 6.9).

Pode ser visto que existe muito boa correspondência entre o grau de polimerização inferido pela metilação com o obtido por cromatografia de filtração em gel. Esta observação mostra também que os valores referidos para as diferentes ligações dos resíduos glicosídicos nas fracções analisadas por metilação são realistas. A percentagem de pontos de ramificação dos oligossacarídeos examinados variou entre 5,3 e 7,3, a qual se encontra de acordo com o que seria de esperar se os

resíduos de ácido glucurónico se encontrassem dispersos como cadeias laterais da cadeia principal da xilana.

Tabela 6.9 - Composição em ligações glicosídicas de fracções seleccionadas a partir da hidrólise ácida parcial seguida por cromatografia de filtração em gel da fracção Hp25 (valores expressos em percentagens molares relativas).

Ligação	Fracção			
	7	10	14	17
T-Xylp	13,9	9,7	7,1	5,7
4-Xylp	78,9	80,7	87,0	88,1
2,4-Xylp	5,8	7,3	5,3	5,6
Xilitol	1,4	2,3	0,6	0,6
D.p. Xyl ⁺	7,2	10,3	14,1	17,5
B.p. Xyl [#]	5,8	7,3	5,3	5,6

⁺ Grau de polimerização do oligossacarídeo;

[#] Percentagem de pontos de ramificação.

Com base nestes resultados e nos da análise por metilação e RMN de ¹³C para este polissacarídeo (fracção Hp25) como maior fracção obtida, as características estruturais representadas na Figura 6.5 são propostas para a glucuronoxilana do caroço da azeitona.

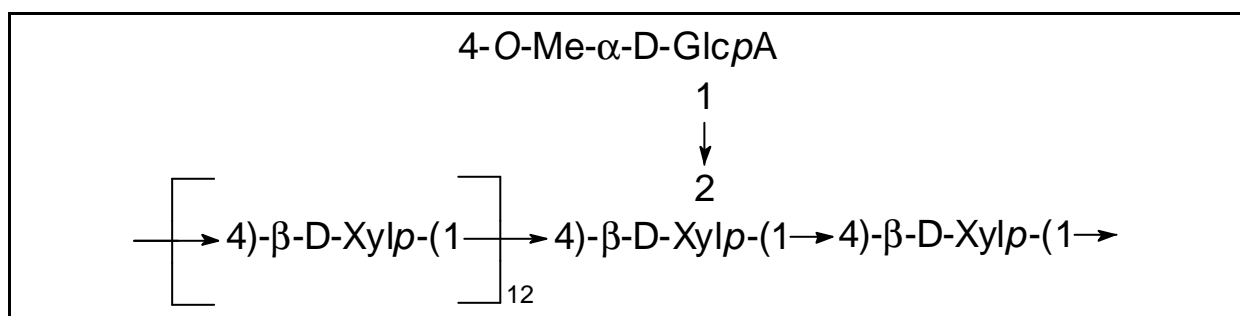


Figura 6.5 - Características estruturais da xilana ácida do caroço da azeitona.

6.5.4 - Fracções da α -celulose

A pequena quantidade de polissacarídeos pécnicos associados ao resíduo de α -celulose pode ser libertada por neutralização do resíduo de α -celulose (sn-RCst) e este material polimérico possui uma composição em ligações glicosídicas (Tabela 6.7) semelhante às dos polissacarídeos pécnicos

isolados da polpa nas fracções C1A, NC1 e NC2 (Tabela 3.11). Este polissacarídeo péctico é também semelhante ao libertado do resíduo rico em celulose da polpa da azeitona após neutralização (sn-RC - Tabela 3.14). De notar, no entanto, uma maior percentagem de galactose, principalmente em ligação terminal, do que a registada nos polissacarídeos pécticos da polpa. É provável que derive das poucas células parenquimatosas presentes no caroço da azeitona (Winton e Winton, 1932). Material péctico tem sido isolado em pequenas quantidades a partir de tecidos lenhificados como as árvores de madeira dura (Pigman *et al.* 1948) e cascas de sementes de girassol (Aspinall *et al.*, 1967). A composição glicosídica deste material parece ser semelhante à das pectinas encontradas nos tecidos parenquimatosos.

O material da α' -celulose não foi facilmente dispersa em DMSO, permanecendo uma pequena porção insolúvel a qual provavelmente foi a responsável pelo elevado valor do glucitol e de resíduos de glucose com vários tipos de ligação. No entanto, pode ser inferido ser praticamente só glucose, contendo uma pequena quantidade detectável de Araf e Xylp.

6.6 - Discussão Geral

O estudo das paredes celulares dos tecidos lenhificados do caroço da azeitona só é possível após um tratamento de deslenhificação. A deslenhificação com clorito e ácido acético provoca alterações significativas nos resíduos de lenhina, no entanto estas alterações não são extensíveis de modo significativo aos polissacarídeos presentes.

Os maiores polissacarídeos não celulósicos são glucuronoxilanas. Dois tipos de xilanas foram identificadas: glucuronoxilanas pouco ramificadas, com grau de polimerização entre 90 e 110; e glucuronoxilanas muito ramificadas, com grau de polimerização entre 30 e 60.

A xilana mais abundante possuía um grau de polimerização de 89 resíduos de xilose e 7% de pontos de ramificação. O ácido glucurónico presente encontrava-se em ligação terminal na forma de 4-O-Me- α -D-GlcpA, na proporção de 1:14 resíduos de xilose, numa estrutura regular.

A existência de dois tipos de glucuronoxilanas nos tecidos lenhificados do caroço da azeitona está de acordo com os resultados encontrados nas sementes de girassol (Bazus *et al.*, 1992). A

escassez de informação impede que estas características possam ser generalizadas para todos os tecidos lenhificados das plantas dicotiledóneas.

As xilanas do carço da azeitona são geralmente mais curtas que as das fibras lenhificadas da vagem do feijão onde são encontrados polímeros com grau de polimerização de 190 (Selvendran e King, 1989). Este facto pode estar relacionado com as diferentes funções de ambos os tecidos: o primeiro é um tecido de protecção da semente; o segundo um tecido fibroso muito alongado.

Complexos xilanas-polissacarídeos pécnicos associados a material fenólico (lenhina) e pequenas mas significativas quantidades de polissacarídeos pécnicos virtualmente livres de glucuronoxilanas encontram-se também presentes neste tecido.

Por deslenhificação e tratamento com soluções de KOH foi possível a extracção da quase totalidade dos polímeros não celulósicos, sendo o resíduo final (α' -celulose) constituído praticamente só por celulose. Este resultado contrasta com as quantidades relativamente elevadas de material pécnico que permanece no resíduo final (RF) dos tecidos parenquimatosos da polpa da azeitona (ponto 3.5.5).