



V Simpósio
Nacional de
Olivicultura

Santarém 2009

2011



Associação
Portuguesa de
Horticultura

Escola Superior
Agrária
[IPSantarém]



Valorização das águas ruças – Identificação de compostos antioxidantes

S.I. Falcão¹, A.M. Peres^{1,2}, M.R.M. Domingues³ & S.M. Cardoso¹

¹CIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

²LSRE - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

³Centro de Espectrometria de Massa, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Resumo

Neste trabalho pretendeu-se determinar a composição em compostos fenólicos de amostras de efluentes líquidos provenientes de diferentes lagares de azeite do Norte de Portugal (Amarante, Mirandela, Castelo Rodrigo e Frieira). Para tal, as águas ruças foram extraídas com acetato de etilo, o extracto foi fraccionado por HPLC e as fracções foram analisadas por espectrometria de massa (ESI-MS e ESI-MSⁿ). Este procedimento permitiu verificar que o composto maioritário era o hidroxitirosol, embora em concentração variável. As amostras continham ainda outros compostos fenólicos comuns, tais como o ácido clorogénico, o ácido cafeico, o ácido p-cumárico, o tirosol; secoiridoídes como o ácido elenólico, o oleosídeo, o verbascosídeo, a oleuropeína, o ligostrosídeo e alguns flavonóides como a luteolina, a quercetina e o glucosídeo da luteolina.

Palavras-chave: águas ruças, compostos fenólicos, hidroxitirosol, espectrometria de massa.

Abstract

Olive mill wastewaters valuing – Identification of phenolic compounds

This study intended to determine the composition of phenolic compounds in different olive wastewaters collected in the North of Portugal (Amarante, Mirandela, Castelo Rodrigo and Frieira). The samples were extracted with ethyl acetate, the extract was fractionated by HPLC and the fractions were analyzed by mass spectrometry (ESI-MS and ESI-MSⁿ). Hydroxytyrosol was the main phenolic compound, although with variable concentrations. The samples also contained other common phenolic compounds such as chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, tyrosol; secoiridoids like elenolic acid, oleoside, verbascoside, oleuropein, ligostroside and some flavonoids like luteolin, quercetin and luteolin glycoside.

Keywords: olive mill wastewater, phenolic compounds, hydroxytyrosol, mass spectrometry.

Introdução

As águas ruças produzidas em sistemas de extracção de azeite de três fases possuem uma elevada carga poluente devido à sua acentuada acidez e à sua composição, nomeadamente grande quantidade de sais de potássio, magnésio, fósforo e de moléculas orgânicas, especialmente polifenóis, açúcares, taninos, polialcoóis, pectinas, lípidos e compostos aromáticos tóxicos (Saviozzi et al., 1993). Por outro lado, alguns destes compostos, nomeadamente os compostos fenólicos, possuem actividades biológicas importantes e são por isso do interesse da indústria farmacêutica e alimentar (De Marco et al., 2007).

A quantidade de compostos fenólicos presente nas águas ruças depende da cultivar e da maturação das azeitonas, da zona de cultivo, do tempo de armazenamento e dos procedimentos de extracção (Bazoti et al., 2006). O hidroxitirosol é um dos mais abundantes e o que levanta mais interesse devido às suas propriedades farmacológicas e antioxidantes, podendo ser encontrado nos efluentes na forma livre, mas também na forma ligada como oleuropeína, verbascosídeo ou de glicosídeo (Rodríguez et al., 2009). Neste contexto, o presente estudo pretendeu contribuir para a valorização deste resíduo industrial através da identificação e quantificação dos seus principais compostos fenólicos.

Material e Métodos

As amostras de águas ruças foram recolhidas de lagares de azeite, com laboração em sistemas de três fases, situados no Norte de Portugal (Amarante (A), Mirandela (M), Castelo Rodrigo (CR) e Frieira (F)). A colheita das amostras foi efectuada em Dezembro de 2008 e conservadas a -20°C até serem analisadas.

Extracção dos compostos fenólicos

A extracção foi efectuada segundo o método descrito por De Marco et al. (2007). As amostras (10 mL) foram previamente acidificadas a pH 2 com HCl, deslipidificadas com n-hexano, e a mistura foi agitada e de seguida centrifugada a 3000 rpm durante 5 min. As fases foram separadas e o processo foi repetido duas vezes. A extracção dos compostos fenólicos foi efectuada com acetato de etilo, o solvente foi evaporado sob vácuo a 40°C e o resíduo resultante foi redissolvido em 3 mL de metanol.

Análise por HPLC

As análises foram realizadas num sistema cromatográfico Knauer Smartline equipado com um auto-injector mantido a 4°C provido de um loop de 10 µL. A detecção foi feita com um detector UV/Vis a um comprimento de onda de 280 nm. A separação cromatográfica foi conseguida utilizando uma coluna RP-C18 (tamanho de partículas 5 µm, 250×4 mm d.i.) e uma pré-coluna com o mesmo enchimento. A coluna foi mantida a uma temperatura de 30°C. A eluição das amostras foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/min. Como fase móvel utilizaram-se dois eluentes, 0,1% de ácido fórmico em água (v/v) (solvente A) e

0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo (v/v) (solvente B), previamente desgaseificados e filtrados. A melhor resolução cromatográfica dos compostos fenólicos foi obtida nas seguintes condições: 3% de B no início, 3% a 9% de B em 4 min, 9% a 15% de B em 11 min, 15% a 16% de B em 10 min, 40% de B em 45 min, 40% a 85% de B em 10 min, 85% a 3% de B em 10 min.

Os diferentes compostos fenólicos foram quantificados utilizando curvas de calibração previamente estabelecidas pelo método do padrão externo. As curvas de calibração foram obtidas, por regressão linear, tendo em conta a área dos respectivos picos e a concentração de cada composto fenólico nas soluções padrão injectadas.

Análise por ESI-MS e ESI-MSⁿ

As fracções foram dissolvidas em metanol e injectadas directamente na fonte de ESI por meio de uma bomba de seringa, com um fluxo de 8 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os estudos foram realizados em modo negativo com um aparelho LXQ Linear Ion (ThermoFinnigan, San Jose, CA, E.U.A.). As condições de ESI foram as seguintes: azoto 30 psi, tensão do spray 4,7 kV, temperatura do capilar 350°C, voltagem do capilar -7,0 V e tensão do tubo capilar -71,8 V. A energia de colisão usada nas experiências de MSⁿ foi de 12-20 (arbitrária).

Resultados e Discussão

A análise cromatográfica dos extractos fenólicos das quatro amostras permitiu verificar que, no geral, as respectivas fracções eluídas possuíam tempos de retenção semelhantes, embora com áreas distintas (resultados não mostrados). Estes resultados sugeriram que as diversas amostras de águas ruças possuíam os mesmos compostos fenólicos, embora em diferentes concentrações. Como exemplo, na figura 1 encontra-se representado um dos perfis cromatográficos obtidos por HPLC a 280 nm, no qual estão indicadas as várias fracções recolhidas.

A presença de compostos idênticos nas diferentes amostras foi confirmada por espectrometria de massa. Desta forma, a identificação dos compostos fenólicos em cada fracção foi efectuada considerando o(s) principal(ais) ião(ões) molecular(es) aí presente(s) e a interpretação das suas vias de fragmentação quando estes eram sujeitos a análise por ESI-MSⁿ. Esta análise foi efectuada mesmo quando o tempo de retenção da fracção era coincidente com a de um composto de referência. O quadro 1 resume os resultados da análise de espectrometria de massa dos compostos identificados nas fracções analisadas.

A quantidade dos compostos fenólicos identificados nas amostras e que não eram co-eluídos encontra-se representada no quadro 2. Em relação a estes compostos, deve referir-se que, no conjunto, a amostra de Frieira continha uma menor quantidade, enquanto a amostra de Mirandela possuía uma menor variabilidade.

O hidroxitirosol foi encontrado como composto maioritário nas quatro amostras, embora em concentrações variáveis (0,249-1,91 g L⁻¹). Este facto

deve-se com certeza a diferentes factores, incluindo a cultivar e a maturação das azeitonas usadas no processo de produção de azeite. Deve também referir-se que, à excepção da amostra de Frieira, a quantidade de hidroxitirosol obtida a partir das restantes águas ruças foi superior à obtida por De Marco et al. (2007) (aproximadamente 1 g L⁻¹). Ainda, de acordo com os resultados de outros autores (Cardoso et al., 2005), a luteolina-7-glucosídeo foi também encontrada em concentrações consideráveis em bagaço e polpa de azeitona.

A análise dos extractos fenólicos de águas ruças recolhidas em lagares portugueses permitiu verificar que, no geral, os compostos encontrados nestas amostras correspondem aos descritos na literatura para este tipo de amostras, apesar da quantidade de compostos fenólicos nas amostras ser bastante variável. Em particular, o presente trabalho permite alertar para o facto de que a recuperação de hidroxitirosol de amostras de águas ruças poder ser bastante variável, um factor de enorme importância na exploração destas águas residuais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação para Ciência e Tecnologia (projecto de investigação PTDC/AMB/69379/2006) pelo apoio financeiro.

Referências

- Bazoti, F.N., Gikas, E., Skaltsounis, A.L. & Tzarbopoulos, A. 2006. Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Anal. Chim. Acta*, 573:258-266.
- Cardoso, S.M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C.M.G.C. & Coimbra, M. 2005. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J Sci Food Agric*, 85:21-32.
- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A. & Sacchi, R. 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem.*, 104:858-867.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K. & Stockmann, R. 2005. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J. Agric.Food Chem*, 53:823-837.
- Rodríguez, G., Lama, A., Trujillo, M., Espartero, J.L. & Fernández-Bolaños, J. 2009. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste:3,4- Dihydroxyphenylglycol. *LWT*, 42:483–490.
- Saviozzi, A., Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Scagnozzi, A. & Vanni, G. 1993. *Biores Technol*, 44:223-228.

Quadro 1 - Identificação das fracções eluídas no HPLC do extracto de compostos fenólicos das águas ruças e a correspondência com os resultados da espectrometria de massa

| Número da Fracção | Tempo retenção (min) | [M-H] ⁻ | ESI-MS ^{n,*} | Composto |
|-------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | 13,6 | 153 | 123 | Hidroxitirosol |
| 2 | 18,5 | 137 | 95, 109 | Tirosol |
| 3 | 26,3 | 353 | 191, 179 | Ác. clorogénico |
| 4 | 28,2 | 179 | 135 | Ác. cafeico |
| 5 | 35,3 | 163 | 119 | Ác. <i>p</i> -cumárico |
| 5 | 35,3 | 241 | 139, 209, 223 | Ác. elenólico |
| 6 | 46,0 | 623 | 461 | Verbascosídeo |
| 7 | 49,1 | 447 | 285 | Luteolina-7-glucosídeo |
| 8 | 53,8 | 539 | 377, 307, 469, 507 | Oleuropeína |
| 9 | 52,4 | 447 | 285 | Luteolina glucosídeo |
| 10 | 64,3 | 301 | 179, 151 | Quercetina |
| 11 | 65,1 | 285 | 241, 175, 151 | Luteolina |

* Ordenados por ordem decrescente

Quadro 2 - Quantificação dos principais compostos identificados nos extractos fenólicos das diferentes amostras.

| Composto | Amostras de águas ruças | | | |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | A (g L ⁻¹) | M (g L ⁻¹) | CR (g L ⁻¹) | F (g L ⁻¹) |
| Hidroxitirosol | 1,57 | 0,704 | 1,91 | 0,249 |
| Tirosol | 0,111 | v | 0,349 | 0,078 |
| Ác. clorogénico | 0,087 | - | 0,078 | 0,080 |
| Ác. cafeico | 0,043 | - | 0,023 | v |
| Verbascosídeo | 1,37 | v | 0,088 | 0,034 |
| Luteolina-7-glucosídeo | 0,751 | 0,078 | 1,09 | 0,332 |
| Oleuropeína | 0,019 | 0,810 | 0,106 | 0,233 |
| Quercetina | 0,142 | - | 0,248 | - |
| Luteolina | 0,114 | 0,099 | 0,057 | - |

v, quantidades vestigiais

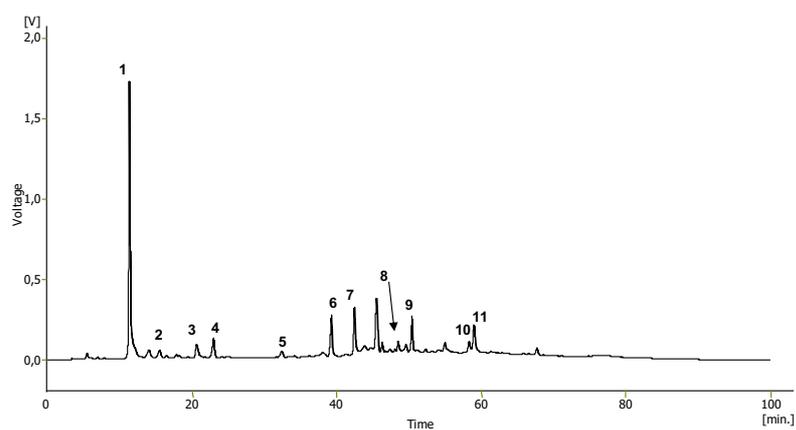


Figura 1 - Exemplo de perfil cromatográfico de um extracto fenólico de águas ruças, evidenciando as fracções recolhidas e que foram posteriormente analisadas por ESI-MS.