

Identificação de oligómeros de oleuropeína em polpa e bagaço de azeitona

CARDOSO Susana M.^{1,2}, GUYOT Sylvain³, MARNET Nathalie³, LOPES-DA-SILVA José A.¹, SILVA Artur M.S.¹, RENARD Catherine M.G.C.³, COIMBRA Manuel A.^{1,*}

¹ Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro

² Escola Superior Agrária de Bragança, 5301-855 Bragança

³ Unité de Recherches Cidricoles – Biotransformations des Fruits et Légumes, I.N.R.A., B.P. 35327, 35653 Le Rheu Cédex, França

E-mail: mac@dq.ua.pt

Resumo

A análise por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MSⁿ) de uma fracção de compostos fenólicos purificada, que foi previamente obtida a partir da polpa e do bagaço de azeitona com acetona/água, revelou a presença de oligómeros de oleuropeína. A espécie iónica predominante no espectro de ESI-MS (m/z 1613) correspondia a um trímero de oleuropeína com três ligações entre os anéis de hidroxitirosol. Esta análise detectou ainda espécies iónicas correspondentes a dímeros de oleuropeína (m/z 1075), trímeros com duas ligações entre os anéis de hidroxitirosol (m/z 1615), tetrâmeros (m/z 2153) e pentâmeros (m/z 2691). A presença de oligómeros de oleuropeína nesta fracção foi também confirmada por análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Os ensaios de ¹³C, ¹³C-DEPT 90, ¹³C-DEPT 135, *g*HSQC and *g*HMBC revelaram que todas as ressonâncias de carbono e protão correspondiam às descritas na literatura para a oleuropeína, à excepção dos sinais de ressonância dos átomos dos anéis aromáticos, que apareciam como sinais mal definidos e de pouca intensidade devido à sua fraca mobilidade e à assimetria da molécula.

O facto destes oligómeros terem sido encontrados quer na polpa, quer no bagaço, indica que não são artefacto do processamento da azeitona, mas que ocorrem naturalmente na polpa deste fruto.

Palavras-chave

Azeitona, compostos fenólicos, espectrometria de massa por *electrospray*, RMN

1. Introdução

A produção de azeite a partir da azeitona envolve várias operações, incluindo a moenda, a termobatedura das pastas e a extracção da fase oleosa. Esta última operação é normalmente efectuada por centrifugação de duas ou, alternativamente, de três fases¹. A utilização do sistema de extracção de azeite de duas fases é muito vantajosa para o ambiente, uma vez que esta tecnologia não produz águas ruças, um subproduto muito poluente². No entanto, o resíduo resultante deste processo, o bagaço de azeitona, é muito húmido (54- 62% de humidade) e não possui valor comercial apreciável². De forma a encontrar novas aplicações e valorizar este subproduto, temos vindo a investigar os seus compostos fenólicos e a identificar as alterações que possam ocorrer durante o processamento.

Num trabalho prévio³, a polpa e o bagaço de azeitona foram sequencialmente extraídos com (1) metanol e (2) mistura de acetona/água. Verificou-se que a soma da quantidade de compostos fenólicos obtida nos dois extractos foi de 154 e 146 mg, respectivamente, (expressas como equivalentes de oleuropeína) por grama de polpa e bagaço seco, desengordurado e isento de caroço. A análise do extracto de metanol purificado (MeOH 50) permitiu a identificação de compostos fenólicos que são

normalmente encontrados em extractos fenólicos de azeitona, nomeadamente, o verbascosídeo, a rutina, o ácido cafeoilquínico, a 7-glucopiranosil-luteolina e o oleosídeo de 11-metilo, juntamente com o 1'- β -glucopiranosil-hidroxitirosol, a rutinopiranosil-luteonina e o oleosídeo, que são compostos mais raramente detectados em extractos fenólicos de azeitona. Os compostos 6'-(1- β -glucopiranosil)-oleosídeo, 6'-(1- β -ramnopiranosil)-oleosídeo e 10-hidroxi-oleuropeína foram também identificados na polpa de azeitona.

No presente trabalho investigou-se a composição dos extractos purificados de acetona, que continham 13 e 15% da totalidade de compostos fenólicos extractáveis da polpa e do bagaço de azeitona, respectivamente.

2. Material e métodos

As amostras foram recolhidas no Prolagar, em Mirandela, e os compostos fenólicos foram sequencialmente extraídos com metanol e acetona/água (6:4 v/v), de acordo com os procedimentos previamente descritos por Cardoso *et al.*³.

A solução de extracção de acetona/água foi filtrada através de um filtro de placa sinterizada G3 e concentrada sob pressão reduzida a 37°C, congelada a -20°C e liofilizada. O resíduo obtido foi purificado em cartuchos "Sep Pack C18" (5 g, Waters, Milford, MA), que foram previamente acondicionados por tratamento sequencial com 20 mL de metanol absoluto, 20 mL de água e 20 mL de ácido acético diluído (2% v/v, aq). A solução de amostra não purificada correspondente a 120 mg de compostos fenólicos (de acordo com a quantificação por ensaio de Folin-Ciocalteu), foi distribuída por 3 cartuchos (50 mL por cartucho) e os compostos muito polares, principalmente açúcares e ácidos orgânicos, foram eluídos com 90 mL de ácido acético diluído (2% v/v, aq). A recuperação dos compostos fenólicos foi efectuada por eluição sucessiva dos cartuchos com os solventes: (1) 30 mL de uma solução de metanol:água:ácido acético (50:48:2 v/v/v) e (2) 30 mL de uma solução de metanol:ácido acético (98:2 v/v). As fracções obtidas de cada cartucho foram respectivamente combinadas, congeladas e liofilizadas. Desta forma, para cada amostra obtiveram-se duas fracções (Acetona 50 e Acetona 100), que correspondem às eluições com 50% ou 100% de metanol, respectivamente. A concentração total de compostos fenólicos dos extractos purificados foi determinada por um procedimento experimental adaptado do método de Folin-Ciocalteu³.

As análises por espectrometria de massa das fracções de acetona purificada foram efectuadas num espectrómetro LCQ DECA *ion trap mass* equipado com uma fonte de ionização de *electrospray* (ThermoFinnigan, USA). As amostras (0,5 mg) dissolvidas em 1 mL de MeOH:H₂O (50:50 v/v) foram directamente introduzidas na fonte do espectrómetro de massa através de um sistema de bombagem que termina em seringa, com um fluxo de 10 μ L/min. As análises de infusão foram efectuadas no modo negativo aplicando uma voltagem próxima de 4500 kV, e a voltagem do cone de -60 V, com a temperatura no capilar de 225°C, com um fluxo de nebulização por azoto de 50 (unidades arbitrárias) e um intervalo de massa nominal até m/z 3000.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C da fracção Acetona 100 foram obtidos após dissolução da amostra em acetona-D:D₂O (6:4 v/v) num espectrómetro Bruker DRX 500, operando a 500,13 e 125,77 MHz, respectivamente. Os desvios químicos são expressos em valores de δ (ppm) relativamente ao 2,2,3,3-d₄-(3-trimetilsilil)-propionato de sódio, como referência externa.

3. Resultados e discussão

As fracções Acetona 50 da polpa e do bagaço de azeitona representaram 80% dos extractos de acetona não purificados. Para as duas amostras, o espectro de ESI-MS daquela fracção (resultados não apresentados) revelou uma mistura complexa de compostos, a maioria dos quais correspondiam aos previamente descritos no extracto de

metanol MeOH 50, e os restantes correspondiam a compostos detectados na fracção Acetona 100. A fracção Acetona 100 representou 1% (m/m) do material de partida, com um conteúdo de compostos fenólicos de 46 e 48% (m/m), expressos como equivalentes de oleuropeína, para a polpa e para o bagaço de azeitona, respectivamente. O perfil cromatográfico da fracção Acetona 100 obtido por HPLC (resultados não mostrados) era muito menos complexo do que o obtido para os extractos de MeOH 50³. A fracção Acetona 100 apresentou apenas um pico significativo eluído com um tempo de retenção médio de 87 min, que foi analisado por ESI-MS.

ESI-MS da fracção Acetona 100

O espectro de massa da fracção Acetona 100 proveniente da polpa e do bagaço de azeitona (Figura 1) revelou a espécie iónica principal a m/z 1613 e um sinal intenso a m/z 1615. Estes valores de m/z sugerem a ocorrência de trímeros de oleuropeína ligados entre si por três e duas ligações covalentes, respectivamente. Esta hipótese é ainda apoiada pela detecção de outras espécies iónicas, nomeadamente a oleuropeína (Esquema 1) a m/z 539, o ião a m/z 1075, que sugere a presença de dímeros de oleuropeína, e ainda, as duas espécies iónicas a m/z 2150 e 2690 (resultados não apresentados), cujas massas moleculares são compatíveis com a ocorrência de tetrâmeros e pentâmeros de oleuropeína, respectivamente. De forma a se verificar se estas espécies iónicas eram oligómeros de oleuropeína, o sinal intenso a m/z 1613 foi analisado por espectrometria de massa por dissociação induzida por colisão.

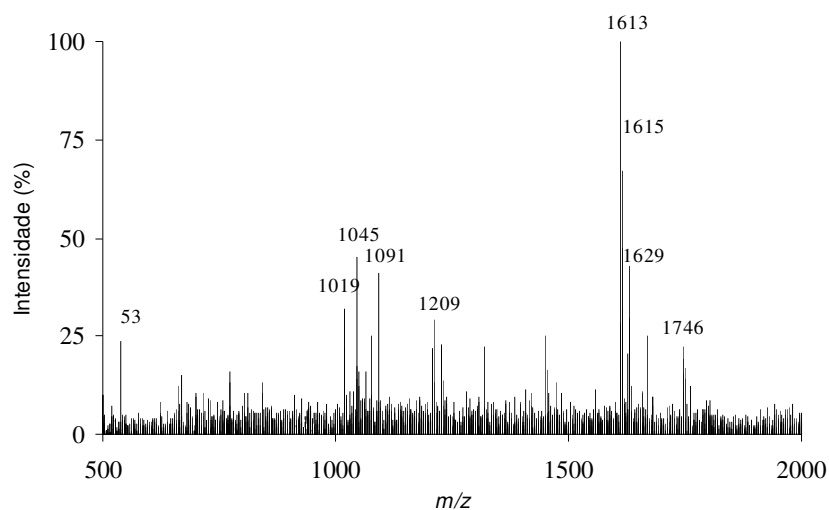
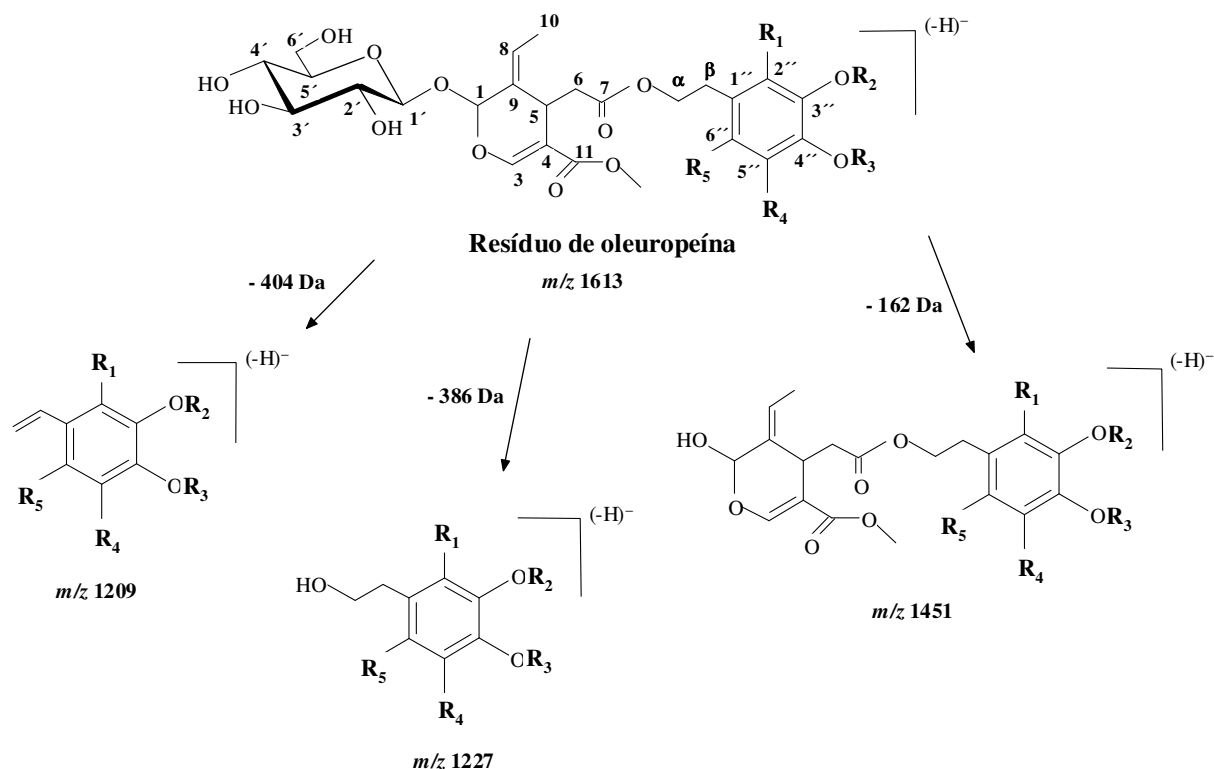


Figura 1 - Espectro de ESI-MS da fracção Acetona 100,

O espectro de ESI-MS² do ião molecular a m/z 1613 encontra-se representado na Figura 2a. O fragmento principal foi o ião a m/z 1209, originado pela perda de 404 Da, a massa equivalente a uma molécula de oleosídeo de 11-metilo. Outros fragmentos de menor intensidade, a m/z 1581, 1451, 1419 e 1227 originaram-se, respectivamente, pela perda de 32, 162, 194 e 386 Da, que podem ser atribuídas à remoção de metanol, hexose, metanol e hexose simultaneamente, e hexose em conjunto com a parte secoiridóide da molécula de oleuropeína (Esquema 1). A remoção de uma molécula de oleuropeína, detectada pelos fragmentos a m/z 1073 e a m/z 539 (ião molecular da oleuropeína), também foi observada. No entanto, a baixa intensidade destes sinais demonstrou que a sua perda não era uma via preferencial.



Esquema 1 - Estruturas derivadas da oleuropeína e esquema da sua fragmentação. Quando R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e $R_5 = H$, a estrutura representa o ião molecular da oleuropeína. Quando R_1 ou R_2 ou R_3 ou R_4 ou $R_5 =$ resíduo de oleuropeína, a estrutura representa o ião molecular de um dímero de oleuropeína. Quando R_1 ou R_2 ou R_3 ou R_4 ou $R_5 =$ dois resíduos de oleuropeína, a estrutura representa o ião molecular de um trímero de oleuropeína contendo duas ou três ligações através dos anéis de hidroxitiroso.

A sequência $[1314 \rightarrow 1209] MS^3$ (Figura 2b) mostrou algumas semelhanças com o perfil de fragmentação do ião a m/z 1613 (Figura 2a), nomeadamente, o sinal principal foi obtido pela perda de 404 Da (ião a m/z 805), e as espécies iónicas correspondentes às perdas de 32, 162, 194 e 386 (iões a m/z 1177, 1047, 1015 e 823, respectivamente) também foram detectadas. Ainda, a perda de uma molécula de oleuropeína (540 Da) do ião a m/z 1209 permitiu a detecção dos sinais de baixa intensidade a m/z 670 e a m/z 539. Uma vez mais, estes resultados são coerentes com a estrutura de um trímero de oleuropeína.

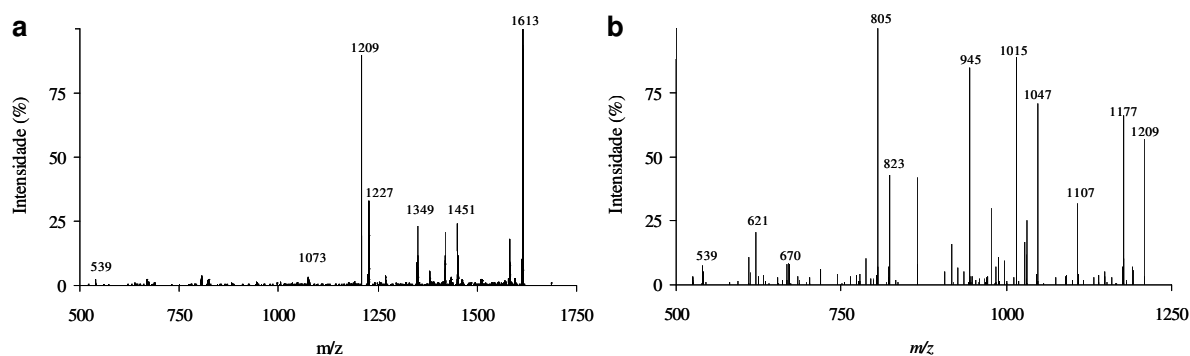


Figura 2 - (a) Espectro de ESI- MS^2 do ião molecular a m/z 1613 e (b) espectro de ESI- MS^3 de $[1613 \rightarrow 1209]$.

Os resultados do espectro de ESI-MS² do ião molecular a m/z 1613 e a sequência [1314→1209] MS³ confirmam que o principal composto fenólico nas fracções Acetona 100 (de massa molecular 1614 Da) era composto por três resíduos de oleuropeína. Ainda, a detecção dos principais iões-fragmento a m/z 1209 e 805 (Figuras 1 e 2), que correspondiam à perda de uma e de duas unidades da molécula de secoiridóide, apoiam fortemente a hipótese de que as ligações moleculares no trímero de oleuropeína são efectuadas através dos anéis de hidroxitirosol, e não pela parte secoiridóide ou através das unidades de açúcar da molécula. Embora não tenha sido possível determinar exactamente a posição e o número das ligações entre os monómeros de oleuropeína (Esquema 1), a massa molecular do composto predominante (1614 Da) sugere a presença de um trímero de oleuropeína com três ligações.

Estudos de RMN da fracção Acetona 100

A presença de oligómeros de oleuropeína nas fracções Acetona 100 foi confirmada pelas análises de ¹³C e ¹H-RMN da amostra de bagaço de azeitona. A análise dos espectros de ¹³C, ¹³C-DEPT 90, ¹³C-DEPT 135, e a comparação dos desvios químicos aí detectados com resultados de desvios químicos típicos de ¹³C de compostos fenólicos característicos das Oleáceas⁴⁻⁸, permitiu a atribuição de todos os sinais de ¹³C da fracção Acetona 100 (Tabela 1). Verificou-se que todas as ressonâncias dos átomos de carbono foram coincidentes com as descritas para a molécula de oleuropeína^{6,7}. No entanto, em relação às ressonâncias de ¹³C descritas para a oleuropeína^{6,8} ou para a desmetiloleuropeína⁴, os sinais de C-2'' e C-5'', C-3'' e C-4'' (ver estrutura no Esquema 1) eram pouco intensos e mal definidos, sugerindo falta de mobilidade e de simetria em comparação com a da molécula de oleuropeína.

Tabela 1 – Atribuição dos desvios químicos de RMN de ¹³C e de ¹H obtidos para a fracção Acetona 100 de bagaço dissolvida em acetona:D₂O (6:4).

| Nº Átomo | ¹³ C (ppm) | ¹ H (ppm) | Nº Átomo | ¹³ C (ppm) | ¹ H (ppm) |
|--------------|-----------------------|----------------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 94,4 | 5,95 | <i>Glucose</i> | | |
| 3 | 154,6 | 7,55 | 1' | 99,8 | 4,93 |
| 4 | 108,2 | – | 2' | 73,4 | 3,46 |
| 5 | 30,5 | 3,91 | 3' | 76,3 | 3,58 |
| 6 | 40,6 | 2,78 / 2,45 | 4' | 70,2 | 3,42 |
| 7 | 172,2 | – | 5' | 77,0 | 3,49 |
| 8 | 124,5 | 6,06 | 6' | 61,5 | 3,7/3,9 |
| 9 | 129,0 | – | | | |
| 10 | 13,3 | 1,63 | | | |
| 11 | 168,0 | – | | | |
| COOMe | 51,9 | 3,71 | | | |
| α | 65,7 | 4,21 | | | |
| β | 34,1 | 2,78 | | | |
| 1'' | 129,0 | – | | | |
| 2'' | ≈116 | 6,6-7,2 | | | |
| 3'' | ≈144 | – | | | |
| 4'' | ≈144 | – | | | |
| 5'' | ≈116 | 6,6-7,2 | | | |
| 6'' | 120,0 | 6,51 | | | |

A numeração dos diferentes átomos de carbono refere-se ao resíduo de oleuropeína no Esquema 1.

Os valores dos desvios químicos de ^1H , obtidos pela análise do espectro de RMN de HSQC estão também resumidos na Tabela 1. No geral, e tal como para os valores de ^{13}C , as ressonâncias dos prótons da fracção Acetona 100 foram coincidentes com as descritas na literatura para a molécula de oleuropeína⁵. Apenas não foi possível discernir no espectro de RMN de HSQC o sinal de cruzamento H-2''-C-2'' do de H-5''-C-5'', devido à falta de definição das ressonâncias de ^{13}C para aqueles dois carbonos. Por essa razão, $\delta_{\text{H}2''}$ e $\delta_{\text{H}5''}$ foram ambos atribuídos à zona de 6,6-7,2 ppm. A atribuição dos sinais de ressonância de ^{13}C e de ^1H foram ainda confirmados por sinais de cruzamento ^{13}C e de ^1H do espectro de RMN de HMBC (resultados não apresentados).

Estes resultados de RMN estão de acordo com as interpretações da análise da fracção de Acetona 100 por espectrometria de massa, indicando a presença de resíduos de oleuropeína em estruturas moleculares unidas através das unidades de hidroxitirosol.

4. Conclusões

O presente trabalho identifica, pela primeira vez, oligómeros de oleuropeína. Uma vez que estes compostos foram identificados na polpa e, simultaneamente, no bagaço de azeitona, pode-se concluir que não são exclusivamente formados durante o processo de extracção de azeite. Estudos de compostos fenólicos indicaram uma diminuição da quantidade de oleuropeína durante o amadurecimento do fruto^{9,10}. Alguns destes resultados foram justificados pelo aumento de compostos de degradação da oleuropeína, tais como o ácido elenóico e o hidroxitirosol. Tendo em consideração que os resultados descritos no trabalho presente foram obtidos principalmente com azeitonas num estado de amadurecimento em que os níveis de oleuropeína começam a baixar, é possível que o desaparecimento de oleuropeína durante a maturação possa estar de alguma forma relacionado com a formação destes oligómeros.

5. Referências

- 1 CIVANTOS, L. 1999. Comparación entre sistemas de extracción. In: L. Civantos (Ed.), *Obtención del aceite de oliva virgen*, Editorial Agrícola Española, Madrid, pp. 189-201.
- 2 SAVIOZZI, A.; RIFFALDI, R.; LEVI-MINZI, R.; SCAGNOZZI, A.; VANNI, G. 1993. Decomposition of vegetation-water sludge in soil. *Bioresource Technology* 44:223-228.
- 3 CARDOSO, S.M.; GUYOT, S.; MARNET, N.; LOPES-DA-SILVA, J.; RENARD, C.M.G.C.; COIMBRA, M.A. 2005. Characterization of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by Electrospray Mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 21-32.
- 4 SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; SELVAGGINI, R.; MINIATI, E.; MACCIONI, A.; MONTEDORO, G. 1999. High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and ^1D - and ^2D -nuclear magnetic resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemical Society* 76: 873-882.
- 5 DAMTOF, S.; FRANZYK, H.; JENSEN, S.R. 1992. Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus Excelsior*. *Phytochemistry* 31: 4197-4201.
- 6 MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; SELVAGGINI, R.; MINIATI, E.; MACCIONI, A. 1993. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoids derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41: 2228-2234.
- 7 PAIVA-MARTINS, F.; GORDON, M.H. 2001. Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 4214-4219.
- 8 INOUE, K.; NISHIOKA, T.; TANAHASHI, T.; INOUE, H. 1982. Three secoiridoid from *Ligustrum japonicum*. *Phytochemistry* 21: 2305-2312.
- 9 AMIOT, M.-J.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J.-J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agriculture and Food* 34: 823-826.
- 10 AMIOT, M.-J.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J.-J. 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* 28: 67-69.