

INFORMACIÓN

Compuestos fenólicos del olivo (*Olea europaea*)

Por R. Maestro-Durán, R. León Cabello y V. Ruíz Gutiérrez
Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC). Apartado 1048. 41012 Sevilla

RESUMEN

Compuestos fenólicos del olivo (*Olea europaea*)

Ciertas propiedades de las plantas, como el color, valor nutricional, autoprotección contra microorganismos, propiedades farmacológicas o caracteres organolépticos, son debidas a los compuestos fenólicos. Su estudio, en el caso del olivo, es de gran interés por diversas razones:

- Por su carácter antibiótico, los fenoles de la aceituna inhiben los microorganismos Gram+, como *Lactobacillus*, necesarios para la fermentación de aceitunas de mesa.
- Inhiben la acción de las celulasas y otras enzimas.
- Son los responsables de la alta estabilidad de los aceites vírgenes de oliva, así como de alguno de sus caracteres organolépticos.
- Inhiben la acción de los microorganismos responsables de la depuración anaerobia de los alpechines y son las sustancias contaminantes de estas aguas residuales cuya degradación para eliminar la DQO presenta más dificultades.
- Tienen propiedades farmacológicas (hipotensoras).
- Son una fuente potencial de antioxidantes naturales.

En este trabajo se hace una revisión de los estudios realizados sobre la composición de los componentes fenólicos del fruto (pulpa y semilla), del aceite y sus subproductos (alpechín y orujo) y de las hojas de olivo.

PALABRAS-CLAVE: Compuestos fenólicos—Información (artículo)—Olivo.

SUMMARY

Phenolic compounds from olive (*Olea europaea*)

Certain plant properties, such as the colour, the nutritional value, the resistance to microorganisms, the pharmacologic effects and the organoleptic character, are due to the phenolic compounds. It is interesting the study of phenolic compounds from olive because they:

- Inhibit Gram+ microorganisms, such as *Lactobacillus*, which are involved in the fermentation of the olive fruit.
- Inhibit the activity of cellulases and other enzymes.
- Contribute to the stability and organoleptic character of virgin olive oil.
- Inhibit the effect of microorganisms involved in the anaerobic depuration of vegetation water. Thus, the phenolic compounds are the major bothersome contaminants of these wastewater.
- Have pharmacologic properties (to reduce blood pressure levels).
- Are natural antioxidants.

In the present review we describe the composition of the phenolic compounds from the olive fruit (pulp and seed), the olive oil and its by-products (vegetation water and rape) and the olive leaves.

KEY-WORDS: Information (paper) — Olive — Phenolic compounds.

1. INTRODUCCIÓN

Ciertas propiedades de las plantas, como el valor nutricional (Griffiths, 1981), protección contra microorganismos (Lund, 1983), propiedades curativas (González y col., 1992) o caracteres organolépticos (Nergiz y Ünal, 1991a) pueden atribuirse a la presencia de polifenoles, cuyo estudio es de gran interés, concretamente en lo que se refiere a la elaboración de los diversos tipos de aceitunas de mesa. Está perfectamente comprobado que en el alpechín existe una sustancia antibiótica especialmente activa frente a los microorganismos Gram positivos, responsables de la fermentación de las aceitunas verdes en salmuera, en el aderezo estilo sevillano (Ruíz-Barba y Jiménez-Díaz, R., 1987). También, inhiben el crecimiento de otros bacilos, como el *Bacillus cereus* T. (Tassou y col., 1991).

Pero aparte de esta actividad bactericida, los polifenoles de la aceituna están directamente relacionados con el color y el sabor de las diversas variedades de aceitunas aderezadas. Como es sabido, el sabor amargo de las aceitunas se debe a la presencia de oleuropeína, y se elimina mediante una serie de tratamientos con lejías diluidas y de lavados con agua. Pero probablemente el principal efecto de los polifenoles es su contribución al color de las aceitunas de mesa. Las antocianinas naturales son las responsables del color negro que aparece durante la maduración (Maestro y Vázquez, 1976) y, por tanto, del color de las aceitunas negras al natural (estilo griego) (Fernández Díez y col., 1972).

Los polifenoles de la pulpa de aceitunas se oxidan con facilidad, sobre todo en medio alcalino y son los responsables del oscurecimiento de las aceitunas ennegrecidas artificialmente por oxidación (tipo californiano) (Garrido Fernández y Fernández Díez, 1972; Brenes y col., 1992).

También se ha observado una estrecha relación entre la concentración de polifenoles de diversos productos naturales, como bayas, habas, hojas de diferentes tipos de plantas y la inhibición de celulasas y otros tipos de enzimas, como pectinasas, amilasas y tripsina (Bell y col., 1965; Griffiths, 1981; Ozawa, 1987). En el caso de la aceituna ha sido señalada la inhibición de celulasa producida por *Basidiomycetos* y de enzimas celololíticos de la propia aceituna (Heredia *et al.*, 1990).

Durante la obtención del aceite de oliva, el alpechín, separado del mosto oleoso, arrastra la mayor parte de los polifenoles del fruto, mucho más solubles en agua que en aceite. Estos polifenoles son, en parte, diferentes de los contenidos en la pulpa inalterada, debido a causas físicas,

(reparto de los componentes entre las fases acuosa y oleosa, incorporación a la pasta de componentes que proceden de las semillas) y, sobre todo, a las acciones químicas y enzimáticas que tienen lugar durante la molienda de los frutos y el batido de la pasta resultante. En estas operaciones, el pH ácido de la pasta actúa hidrolizando parcialmente los glucósidos, a lo que también colaboran, probablemente, las enzimas hidrolíticas liberadas durante la molienda y puestas en contacto íntimo con sus sustratos; junto con la acción de la polifenoloxidasas, muy abundante en la pulpa (Ragazzi y Veronese, 1967), la cual oxida y da lugar a la polimerización de parte de los polifenoles presentes, especialmente los orto-difenoles. Algunas de estas alteraciones se traducen en cambios apreciables a simple vista, como la desaparición casi completa de las antocianinas y la formación simultánea de un pigmento marrón, que es un polímero de elevado peso molecular del tipo de la catecolmelanina.

Ya hemos dicho que en la obtención del aceite hay un reparto de los polifenoles y de sus productos de descomposición entre el aceite y el alpechín. Los que quedan en el aceite, o algunos de ellos, actúan como antioxidantes (Vázquez y col., 1973; Forcadell y col., 1987; Mesa y col., 1990). Parece demostrado que el hidroxitirosol y el ácido caféico son los responsables de esta acción antioxidante, y que otros compuestos fenólicos, como el tirosol y los ácidos p-hidroxibenzoico, o-cumárico y p-cumárico tienen poca o ninguna contribución a la estabilidad de los aceites vírgenes (Papadopoulos, 1991 y 1993).

En lo referente a los compuestos fenólicos más polares y los glucósidos, pasan al alpechín (Vázquez y col., 1974b; Balice y Cera, 1984), donde son las principales sustancias contaminantes (Capaso y col., 1992) y que, por su carácter antibiótico, ya citado, resultan tóxicos para los microorganismos encargados de la depuración anaerobia. Por esta razón se ha intentado eliminarlos en su mayor parte mediante una digestión aerobia previa con diversos tipos de hongos, como *Geotrichum candidum* (Maestro y col., 1991; Borja y col., 1992) o *Aspergillus terreus* (Martínez y col., 1992).

En cuanto a los compuestos fenólicos de las hojas de olivo, también han suscitado el interés de los investigadores. Es una práctica habitual en muchas almazaras mezclar hojas de olivo a las aceitunas al proceder a la extracción del aceite para aumentar la estabilidad de éste por incorporación de productos fenólicos antioxidantes procedentes de aquéllas (Chimi y col., 1988; Sheabar y Neeman, 1988; Le Tutour y Guedon, 1992). Algunos compuestos fenólicos de las hojas de olivo (oleuropeína y glucósidos de flavonoides) han mostrado actividad farmacológica (Ficarra y col., 1991).

El orujo, producto residual de la extracción del aceite de oliva, también ha sido objeto de estudio por su contenido en antioxidantes de naturaleza fenólica (Sheabar y Neeman, 1988).

2. POLIFENOLES DEL FRUTO

2.1. Polifenoles de la pulpa

La cantidad total de polifenoles, medida con el reactivo de Folin, aunque depende de las variedades y de las campañas, desciende de Julio a Enero en una variedad de molino (zorzaleña) y se mantiene prácticamente cons-

tante en una variedad de aderezo (gordal) (Vázquez y col., 1971b). En todo caso hay que señalar que el contenido en polifenoles es siempre muy elevado en comparación con la mayoría de los frutos, llegando a alcanzar hasta más de 70 mg/g seco, expresada en ácido caféico. En cuanto a los orto-difenoles, medidos por reacción con molibdato sódico, permanecen prácticamente constantes en la variedad zorzaleña, y en las gordal y verdial presentan un máximo en la época del "envero", entre Septiembre y Octubre. Los valores son siempre del mismo orden que los fenoles totales, lo que indica que la mayoría de los polifenoles de la aceituna contienen grupos orto-difenólicos. Las catequinas, medidas como vanillina, están siempre en cantidades muy pequeñas y sensiblemente constantes en distintas campañas y variedades, y las leucoantocianinas, investigadas por conversión en antocianinas en medio ácido, dieron resultado negativo (aunque sí existen en muestras de hojas). Estos resultados indican que las catequinas y taninos condensados no suponen ninguna contribución importante a los polifenoles de la aceituna, cuyo sabor amargo debe atribuirse exclusivamente a la oleuropeína.

Cualitativamente han sido descritos en la pulpa de aceitunas los siguientes grupos de compuestos:

-Ácidos fenólicos y derivados:

Ácido clorogénico y p-cumárico (isómeros *cis* y *trans*), y 1-cafeil-glucosa (Vázquez y col., 1974a).

-Derivados del β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol ó 3-hidroxitirosol:

Oleuropeína, éster del alcohol β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol con un glucósido del ácido elenólico (Panizzi y col., 1965), demetiloleuropeína (Ragazzi y col., 1973), un posible polímero del 3-hidroxitirosol, 4-monoglucósido del β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol y 4-diglucósido del mismo (Vázquez y col., 1974a). Posteriormente se aisló un heterósido del ácido caféico y el β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol (Andary y col., 1982), verbascósido (ácido caféico-glucosa-ramnosa- β -(3,4-dihidroxitirosol)) (Fleuriet y col., 1984). La demetiloleuropeína y un glucósido del ácido elenólico se forman por degradación de la oleuropeína y van aumentando a lo largo de la maduración, al tiempo que decrece la cantidad de oleuropeína (Amiot y col., 1986a). Esta degradación tiene lugar por la acción de una esterasa (Amiot y col., 1989).

La oleuropeína es un agente muy eficaz en la protección de las plantas contra los microorganismos (Maestro-Durán y Borja, 1993; Tranter y col., 1993).

-Antocianinas:

Sólo se encuentran en las aceitunas maduras. Se han encontrado los glucósidos siguientes: cianidin-monoglucósido y cianidin-diglucósido (Cantarelli, 1961). Posteriormente se ha citado la presencia de los glucósidos cianidin-3-monoglucósido, 3-ramnoglucósido, 3-glucosilrutinosido lineal, 3-glucosilrutinosido ramificado y 3-glucosilrutinosido ramificado acilado con ácido caféico (Vázquez y Maestro, 1970a; Maestro y Vázquez, 1976). Los dos citados en primer lugar son los más abundantes. En la variedad manzanilla se ha citado también la presencia de glucósidos de peonidina y cianidina acilados con los ácidos caféico o p-cumárico (Luh y Mahecha, 1971).

En cuanto a la evolución de las antocianinas a lo largo de la maduración, aumentan rápidamente a partir del "envero", alcanzando un máximo y disminuyendo en los frutos sobremaduros. La relación de los colorantes diglucósidos a los monoglucósidos disminuye hasta alcanzar el valor 1 a principios de Noviembre, permaneciendo después aproximadamente constante. La luz tiene gran influencia en la formación del colorante, y los frutos desarrollados normalmente tienen diez veces más antocianinas que los madurados en la oscuridad (Vázquez y col., 1970b).

-Flavonoides:

Se han detectado los siguientes: rutina (quercetin-3-ramnoglucósido), luteolin-5-glucósido, luteolin-7-glucósido, apigenin-7-glucósido y quercetrina (quercetin-3-glucósido) ó luteolin-7-glucósido (Vázquez y col., 1974). La evolución de estos compuestos durante la maduración ha sido estudiada por Amiot y col., (1986b) y Vlahov(1992).

2.2. Polifenoles en la semilla

En la semilla se han encontrado una serie de glucósidos secoiridoides (León, 1990), de estructura muy parecida entre sí, formados exclusivamente por glucosa, ácido elenólico y tirosol. De ellos se ha establecido la estructura de uno, que coincide con la de la nüzhenida, otro que coincide con el salidrósido y otro cuya estructura es glucosa-ác. elenólico-glucosa-tirosol-ác. elenólico-glucosa.

3. POLIFENOLES DEL ACEITE

Se ha estudiado la influencia del método de extracción del aceite en el contenido en polifenoles totales y en orto-difenoles. No hay diferencias apreciables entre el sistema clásico de prensa y el de centrifugación, pero otros sistemas de extracción basados en las diferentes tensiones superficiales del aceite y el agua dan aceites menos estables debido a su menor contenido en o-difenoles (Nergiz y Ünal, 1991a).

Los polifenoles, responsables de la alta estabilidad de muchos aceites vírgenes de oliva, pasan generalmente desapercibidos en los análisis ordinarios porque, al ser solubles en agua y en lejías diluídas, no se encuentran ni en el insaponificable ni en la fracción de ácidos grasos. Por esta razón es necesario extraerlos previamente del aceite con disolventes polares antes de proceder a su estudio y a la determinación cuantitativa.

-Ácidos fenólicos:

Por extracción con metanol-agua 60-80% de los aceites diluídos con hexano y fraccionamiento del extracto por cromatografía en columna de Sephadex o poliamida, seguida de cromatografía en capa fina sobre sílice o celulosa, se identificó una serie de ácidos cinámicos (p-cúmarico, sinápico y cafeico), de ácidos fenólicos simples (homovanílico, gentísico, p-hidroxibenzoico y siríngico), que se suponía que debían estar en los aceites en forma de ésteres o éteres (Montedoro y Cantarelli, 1969). Posteriormente se identificaron estos ácidos en forma libre (Vázquez y col., 1976).

-Derivados del β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol y del tirosol:

El tirosol y el hidroxitirosol, los compuestos fenólicos más abundantes (representan un 50% de los polifenoles totales), ya detectados en los aceites por Ragazzi y Veronese (1973), fueron cuantificados por cromatografía gaseosa (Schultz y Herrmann, 1980; Forcadell y col., 1987) y por cromatografía líquida de alta eficacia (Solinas y Cichelli, 1982; Nergiz y Ünal, 1991b; Tsimidou y col., 1992; Montedoro y col., 1992; Akasby y col., 1993). También se han citado otros derivados de estos compuestos, un isómero de la aglucona de la oleuropeína y la forma dialdehídica del ácido elenólico ligada al tirosol y al β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol (Montedoro y col., 1993).

-Flavonoides:

La posible presencia de flavonas en el aceite de oliva había sido indicada por Cantarelli (1961). En el Instituto de la Grasa de Sevilla se identificaron en el extracto metanólico-acuoso de aceites vírgenes luteolina y apigenina y otra posible flavona, no identificada (Vázquez y col., 1976).

4. POLIFENOLES DEL ALPECHÍN

Durante los últimos años se ha incrementado muchísimo el interés por los componentes fenólicos del alpechín, por ser los principales responsables del poder contaminante de estas aguas residuales (DQO entre 39.900 y 210.000 ppm y DBO entre 9.600 y 150.000 ppm) y los más difíciles de eliminar por métodos bioquímicos (Moreno y col., 1987). El contenido en fenoles del alpechín, dependiente del proceso de extracción y de otros muchos factores, oscila entre 6.000 mg/L (Fiestas y col., 1990) y 17.500 mg/L (Pompei y Codovilli, 1974). la mayor parte en forma de o-difenoles.

Se han detectado los siguientes tipos de compuestos:

-Ácidos fenólicos y sus derivados:

En un extracto de alpechín en éter, Ragazzi y Veronese (1967), por tratamiento con bicarbonato sódico obtuvieron una fracción ácida en la que identificaron los ácidos cafeico y protocatéuico. Vázquez y col., (1974) por extracción con acetato de etilo, aislaron, además, los ácidos vanílico y p-cumárico y 1-cafeil-glucosa. Otros autores han señalado la presencia de los ácidos 3,4-dihidroxifenil-acético y siríngico (Carola y col., 1975), ferúlico, p-hidroxibenzoico y 3,4-dihidroxi-mandélico (León, 1990), 2,6-dihidroxibenzoico (López y col., 1977), p-hidroxifenil-acético (Balice y Cera, 1984) y p-hidroxifenil-propiónico y vanílico (Sáez Mertre, 1989).

-Aldehidos y alcoholes fenólicos:

Entre este tipo de compuestos se han citado en el alpechín el p-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído (Sáez Mertre, 1989). También se ha encontrado esculetina (León, 1990). Por HPLC en fase inversa se han encontrado catecol y 4-metil-catecol (Capasso y col., 1992).

-Derivados del tirosol y el β -(3,4-hidroxi)-fenil etanol:

Pertencientes a este grupo de compuestos, Vázquez y col. (1974) encontraron en el alpechín, además de tiro-

sol y β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol, un 4-glucósido y un 4-diglicósido de este último y oleuropeína. Éste es el o-difenol más abundante en el agua de vegetación de aceitunas maduras. En las inmaduras predomina la demetileuropeína (Scalzo y Oriente, 1993).

-Flavonoides:

En alpechines recientes pueden encontrarse hasta 700 ppm de antocianinas. Se han encontrado luteolin-7-glucósido, apigenina, luteolina, quercetina y otro producto con estructura de flavona o flavonol (Vázquez y col., 1974)

5. POLIFENOLES DE LAS HOJAS

Los polifenoles de las hojas de olivo, han suscitado el interés de los investigadores por varias razones. Algunos de ellos parecen estimular la oviposición del *Dacus oleae*, mientras que otros lo inhiben (Gariboldi y col., 1986). Algunos se comportan como antioxidantes de aceites (Chimi y col., 1988; Sheabar y Neeman, 1988; Servili y Montedoro, 1989; Le Tutour y Guedon, 1992). Tienen empleo en Farmacia como hipoglucémicos (González y col., 1993).

En los extractos de hojas se han encontrado:

-Derivados del tirosol y del β -(3,4-dihidroxifenil)-etanol:

Oleuropeína y demetileuropeína (Inouye y col., 1974), verbascósido (Fleuriet y col., 1884), oleósido y ligustrósido (Gariboldi y col., 1986), oleurósido (Hiroshi y col., 1987).

-Flavonoides:

Se ha citado la presencia de rutina, luteolin-7-glucósido, luteolin-7-rutinósido, luteolin-4'-glucósido, apigenin-4'-glucósido, apigenin-7-rutinósido (Harbone y Green, 1980). También se han encontrado quercitrina, rutina, luteolina y ácido clorogénico, así como tres compuestos con estructura de biflavonoides (Heimler y col., 1992). Ha sido puesto a punto el análisis cuantitativo de la oleuropeína y algunos flavonoides por HPLC (Ficarra y col., 1991).

Finalmente hay que reseñar una patente registrada para la obtención de oleuropeína a partir de hojas de olivo (Movsumov y col., 1993).

BIBLIOGRAFIA

- Akasby, M.; Shoeman, D.W. Y Csallany, A.S. (1993).- "High performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oil".- J. Am. Oil Chemists' Soc. **70**, 367-370.
- Amiot, M.J.; Fleuriet, A. y Macheix, J.J. (1986a).- "Characterization of oleuropein degradation products".- Bull. Liaison-Groupe Polyphenols **13**, 364-369.
- Amiot, M.J.; Fleuriet, A. y Macheix, J.J. (1986b).- "Importance and evolution of phenolic compounds in olive oil during growth and maturation".- J. Agric. Food Chem. **34**, 823-826.
- Amiot, M.J.; Fleuriet, A. y Macheix, J.J. (1989).- "Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation".- Phytochemistry **28**, 67-69.
- Andary, C.; Wylde, R.; Laffite, C.; Privat, G. y Winternitz, F. (1982).- "Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobancha rapumgenistae*".- Phytochemistry **21**, 1123-1127.
- Balice, V. y Cera, O. (1984).- "Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas chromatographic method".- Grasas y Aceites **35**, 178-180.
- Bell, T.A.; Etchell, J.L.; Singleton, J.A. y Smart, W. (1963).- "Inhibition of pectinolytic and cellulolytic enzymes in cucumber fermentations by sericea".- J. Food Sci. **30**, 233-239.
- Borja, R.; Martín, A.; Maestro, R.; Alba, J. y Fiestas, J.A. (1992).- "Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors".- Process Biochem. **27**, 231-237.
- Brenes-Balbuena, M.; García García, P. y Garrido Fernández A. (1992).- "Phenolic compounds related to the black colour formed during the processing of ripe olives".- J. Agric. Food Chem. **40**, 1192-1196.
- Cantarelli, C. (1961).- "Sui polifenoli presenti nella drupa e nell'olio d'oliva".- Riv. Ital. Sostanze Grasse **38**, 69-71.
- Capasso, R.; Evidente, A. y Scognamiglio, F. (1992).- "A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters".- Phytochem. Anal. **3**, 270-275.
- Carola, C.; Arpino, A. y Lanzani. (1975).- "Lo smaltimento della acque di vegetazione provenienti dagli impianti di estrazione dell'olio dalle olive e estudio della loro possibile utilizzazione".- Riv. Ital. Sostanze Grasse **52**, 335-340.
- Chimi, H.; Sadik, A.; Le Tutour, B. y Rahmani, M. (1988).- "Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropein et du B.H.T.". - Rev. Fr. Corps Gras **35**, 339-344.
- Fernández Díez y cols. (1972).- "Elaboración de aceitunas negras".- 224 pág.- Instituto de la Grasa, Sevilla.
- Ficarra, P.; Ficarra, R.; De Pasquale, A.; Monforte, M.T. y Calabro, M.L. (1991).- "HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L.". - Farmaco, **46**, 803-815.
- Fiestas, J.A.; Martín, A. y Borja, R. (1990).- "Influence of immobilization supports on the kinetic constants of anaerobic of oil purification of olive mill waste water".- Biological Wastes **33**, 131-142.
- Fleming H.P.; Walter, W.M. y Etchells, J.L. (1969).- Isolation of a bacterial inhibitor from green olives".- Appl. Microbiol. **18**, 856-860.
- Fleuriet, A.; Macheix, J.J.; Andary C. y Villemur, P. (1984).- "Identification and determination of verbascoside by high performance liquid chromatography".- C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. III. **299**, 253-256.
- Forcadell, M.L.; Comas, M.; Miquel, X. y de la Torre, M.C. (1987).- "Determination du tyrosol et de l'hydroxy-tyrosol dans des huiles vierges d'olive".- Revue Fr. Corps Gras **34**, 547-549.
- Gariboldi, P.; Jommi, G. y Verotta, L. (1986).- "Secoiridoids from *Olea europaea*".- Phytochemistry **25**, 865-869.
- Garrido Fernández, A. y Fernández Díez, M.J. (1972).- "Aceitunas negras de mesa. Evolución de las principales características durante el desarrollo y maduración".- Grasas y Aceites **23**, 309-318.
- González, M.; Zazueta, A.; Gámez, M.J.; Utrilla, M.P. y Osuna, L. (1992).- "Hypoglycemic activity of olive leaf".- Planta Med. **58**, 513-515.
- Griffiths, D.W. (1981).- "The polyphenolic content and enzyme inhibition of tests from bean (*Vicia faba*) and (*Pisum ssp*) varieties.- J. Sci. Food Agr. **32**, 797-804.
- Harborne, J.B. y Green, P.S. (1980).- "A chemotaxonomic survey of flavonoids in leaves of *Oleaceae*".- Bot. J. Linn. **81**, 155.
- Heimler, D.; Pieroni, A.; Tattini, M. y Cimato, A. (1992).- "Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in *Olea europaea* L. leaves".- Chromatographia **33**, 369-373.
- Heredia Moreno, A.; Fernández Bolaños, J. y Guillén, R. (1990).- "Cellulose inhibition by polyphenols in olive fruits".- Food Chem. **38**, 69-73.
- Hiroshi, K.; Takeshi, U.; Takishi, K.; Inoue, K. y Inouye, H. (1987).- "A secoiridoid glucoside from *Olea europaea*".- Phytochemistry **27**, 1757-1759.
- Inouye, H.; Yoshida, T.; Tobita, S.; Tanaka, K. y Nishioka, T. (1974).- "Monoterpene glucosides in related natural products. XXII. Absolute configuration of oleuropein, kingiside and morronoside".- Tetrahedron **30**, 201.
- Le Tutour, B y Guedon, D. (1992).- "Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds".- Phytochemistry **31**, 1173-1178.
- León Cabello, M^a R. (1990).- "Estudio de la acción antibiótica de los componentes fenólicos del olivo *Olea europaea* L.". - Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Sevilla.
- López Aparicio, F.J.; García Granados, A. y Rodríguez Alonso, M. (1977).- "Estudio del contenido en ácidos carboxílicos del alpechín de la aceituna y evolución de los mismos".- Grasas y Aceites **28**, 393-401.
- Luh, B.S. y Mahecha, G. (1971).- "Anthocyanins in *Olea europaea* (manzanillo olives)".- J. of Chinese Agric. Chem. Soc. Special issue, 1-24.
- Lund, B.H. (1983).- "Bacterial spoilage. En post harvest pathology of fruits and vegetables". Ed. Dennis. Acc. Press, Londres, pag. 23.

- Maestro Durán, R.; Borja Padilla, R.; Martín Martín A.; Fiestas Ros de Ursinos, J.A. y Alba Mendoza, J. (1991).- "Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín".- *Grasas y Aceites* **42**, 271-276.
- Maestro Durán, R.; León Cabello, M^a.R. y Ruíz Gutiérrez, V. (1993).- "Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales".- *Grasas y Aceites* **44**, 365-369.
- Maestro Durán, R. y Vázquez Roncero, A. (1976).- "Colorantes antociánicos de las aceitunas manzanillas maduras".- *Grasas y Aceites* **27**, 237-243.
- Martínez Nieto, L.; Ramos Cormenzana, A.; García Pareja, M^a. P., y Garrido Hoyos, S.E. (1992).- "Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*".- *Grasas y Aceites* **43**, 75-81.
- Mesa, J.A.G.; Linares, P.; Luque, M.D. y Valcárcel, M. (1990).- "Direct automatic determination of polyphenols in olive oils in the aqueous phase of a flow-injection liquid-liquid extraction system without phase separation".- *Anal. Chim. Acta* **235**, 441-444.
- Montedoro, G. y Cantarelli, C. (1969).- "Indagine sulle sostanze fenoliche presenti negli oli d'oliva".- *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **46**, 115-124.
- Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M. y Miniati, E. (1992).- "Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. I. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC".- *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1571-1576.
- Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvagini, R.; Miniati, E. y Macchioni, A. (1993).- "Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives".- *J. Agric. Food Chem* **41**, 2228-2234.
- Moreno, E.; Pérez, J.; Ramos Cormenzana, A. y Martínez, J. (1987).- "Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacterial after incubation with diluted waste".- *Microbiol.* **51**, 169-174.
- Movsumov, I.S.; Aliiev, A.M. y Iskencarov, V.G. (1992).- "Purification of oleuropein from leaves of European olive".- *Izobreteniya* **20**, 21.- C.A. **119**, 5128h.
- Nergiz, C. y Ünal, K. (1991a).- "Effect of method of extraction on the total polyphenol, 1,2-diphenol content and stability of virgin olive oil".- *J. Sci. Food Agric.* **56**, 79-84.
- Nergiz, C. y Ünal, K. (1991b).- "Determination of phenolic acids in virgin olive oil".- *Food Chem.* **39**, 237-240.
- Ozawa, J.; Luilley, T. y Halsman, E. (1987).- "Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit".- *Phytochemistry* **26**, 2937-2942.
- Panizzi, L.; Scarpati, M.L. y Trogolo, C. (1965).- "Oleuropeina III".- *Gazz. Chim. Ital.* **95**, 1279-1292.
- Papadopoulos, G. y Boskou, D. (1991).- "Antioxidant effect of natural phenols on olive oil".- *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **68**, 669-671.
- Papadopoulos, G.; Tsimidou, M. y Boskou, D. (1993).- "Stability of virgin olive oil, assessment of natural antioxidants and other related factors".- *Dev. Food Sci.* **32**, 321-326.
- Pompei, C. y Codovilli, F. (1974).- "Risultati preliminari sul trattamento di depurazione della acque di vegetazione delle olive per osmosi inversa".- *Sci. Tecnol. Alimenti.* **4**, 363-364.
- Ragazzi, E. y Veronese, G. (1967).- "Ricerche sulle fenolossidase e sul contenuto in o-difenoli delle olive".- *Ann. Chim.* **57**, 1476-1492.
- Ragazzi, E. y Veronese, G. (1973).- "Indagine sui componenti fenolici degli oli di oliva".- *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **50**, 443-452.
- Ragazzi, E.; Veronese, G. y Guiotto, A. (1973).- "Presence of dimethyloleuropeine in olive oil of various cultivars".- *Ann Chim.* **63**, 13-20.
- Ruiz Barba, J.L. y Jiménez Díaz, R. (1990).- "Influencia de los polifenoles de salmueras de aceitunas verdes sobre *Lactobacillus plantarum*".- *7th Nat. Conf. Chem.*, Sevilla, 1987.
- Scalzo, R. y Oriente, M.L. (1993).- "A new secoiridoid from olive wastewater".- *J. Nat. Prod.* **56**, 621-623.
- Sáez Membre, L.E. (1989).- "Contenido fenólico del alpechín y actividad antibacteriana".- Licenciatura, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Granada.
- Schulz J.M. y Herrmann, K. (1980).- "Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material".- *J. Chromatogr.* **195**, 95-104.
- Servili, M. y Montedoro, G. (1989).- "Recupero di polifenolici dalle acque di vegetazione delle oliva e valutazione del loro potere antiossidante".- *Industrie Alimentari.* **28**, 14-18 y 26.
- Sheabar, F.Z. y Neeman, I. (1988).- "Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives".- *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **65**, 990-993.
- Solinas, M. y Cichelli, A. (1982).- "Il dosaggio per GLC-HPLC delle sostanze fenoliche dell'olio di oliva: ruolo ipotetico del tirosolo nell'accertamento della quantità di olio vergine nelle miscele con i rettificati".- *Riv. Ital. Sci. Alimentazione* **11**, 22-30.
- Tassou, C.; Nychas, G.J.E. y Board, R.G. (1991).- "Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus terreus* T. spores".- *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 231-237.
- Tranter, H.S.; Tassou, S.C. y Nychas, G.T. (1993).- "The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*".- *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 253-259.
- Tsimidou, M.; Papadopoulos, G. y Boskou, D. (1992).- "Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed phase with emphasis on UV detection".- *Food Chem.* **46**, 53-60.
- Vázquez Roncero, A. (1978).- "Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile".- *Rev. Fr. Corps Gras* **25**, 21-26.
- Vázquez Roncero, A.; Graciani Constante, E. y Maestro Durán, R. (1974a).- "Componentes fenólicos de la aceituna. I. Polifenoles de la pulpa".- *Grasas y Aceites* **25**, 269-279.
- Vázquez Roncero, A.; Janer del Valle, C. y Janer del Valle, M^a.L. (1973).- "Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva".- *Grasas y Aceites* **24**, 350-357.
- Vázquez Roncero, A.; Janer del Valle, C. y Janer del Valle, M^a.L. (1976).- "Componentes fenólicos de la aceituna. III. Polifenoles del aceite".- *Grasas y Aceites* **27**, 185-191.
- Vázquez Roncero, A. y Maestro Durán, R. (1970a).- "Los colorantes antociánicos de la aceituna madura. I. Estudio cualitativo".- *Grasas y Aceites* **21**, 208-214.
- Vázquez Roncero, A.; Maestro Durán, R. y Graciani Constante, E. (1971a).- "Determinación de los polifenoles totales en las aceitunas".- *Grasas y Aceites* **22**, 371-376.
- Vázquez Roncero, A.; Maestro Durán, R. y Graciani Constante, E. (1971b).- "Cambios en los polifenoles de la aceituna durante la maduración".- *Grasas y Aceites* **22**, 366-370.
- Vázquez Roncero, A.; Maestro Durán, R. y Graciani Constante, E. (1974b).- "Componentes fenólicos de la aceituna. II. Polifenoles del alpechín".- *Grasas y Aceites* **25**, 341-345.
- Vázquez Roncero, A.; Maestro Durán, R. y Janer del Valle, M^a.L. (1970b).- "Colorantes antociánicos de la aceituna. II. Variaciones durante la maduración".- *Grasas y Aceites* **21**, 337-341.
- Vlahov, G. (1992).- "Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation".- *J. Sci. Food Agric.* **58**, 157-159.

(Recibido: Marzo 1994)