

## Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*).

Por R. Maestro-Durán\*, R. León-Cabello, V. Ruíz-Gutiérrez, P. Fiestas y A. Vázquez-Roncero  
Instituto de la Grasa (C.S.I.C.). Apartado 1078. 41012 Sevilla.

### RESUMEN

**Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*).**

Se han aislado de semillas de aceituna (*Olea europaea*) tres glucósidos secoiridoides ya conocidos: salidrósido (tirosol-glucosa), nuzhenida (glucosa-ácido elenólico-glucosa-tirosol) y nuzhenida-oleósido, así como otros dos glucósidos secoiridoides que también tienen en su molécula tirosol, ácido elenólico y glucosa cuyas secuencias no se han podido establecer.

**PALABRAS-CLAVE:** Glucósido secoiridoide—Hueso de aceituna—Polifenol.

### SUMMARY

**Bitter phenolic glucosides from seeds of olive (*Olea europaea*).**

From the seeds of *Olea europaea*, three known glucosides, salidroside (tyrosol-glucose), nuzhenide (glucose-elenolic acid-glucose-tyrosol) and nuzhenide-oleoside have been isolated as well as two new secoiridoid glucosides with tyrosol, elenolic acid and glucose moieties in unknown sequence.

**KEY-WORDS:** Olive stone—Polyphenol—Secoiridoid glucoside.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los extractos en etanol o agua de las semillas de olivo (*Olea europaea*) son muy amargos, por lo que se ha considerado de interés aislar e identificar los productos responsables de este sabor, ya que podrían contribuir, como tales o después de hidrolizados, al amargor de los aceites de oliva vírgenes.

Lógicamente, se pensó en un principio que podría tratarse de la oleuropeína, el conocido glucósido fenólico de intenso sabor amargo, de estructura secoiridoide, muy abundante en las aceitunas y hojas de olivo. Sin embargo, aunque las semillas contienen de un 0,5 a 1,0% de productos fenólicos, no se ha detectado la presencia de oleuropeína, que sólo existe, por lo tanto, en la pulpa del fruto.

No se ha encontrado en la bibliografía ninguna mención a compuestos de tipo secoiridoide en la semilla de la *Olea europaea*, aunque sí en diversos órganos de otras Oleáceas, como *Syringa* (Damtoft y col., 1993), *Fraxinus* (Kuwajima y col., 1992; Calis y col., 1993), *Ligustrum* (Willems, 1988), *Jasminum* (Tanahasi y col., 1992), y *Osmanthus* (Sugiyama y col., 1993).

En este trabajo se describe la extracción y purificación de estos glucósidos, así como la identificación de tres de ellos.

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### a) Extracción y purificación de los glucósidos.

Las semillas, separadas manualmente de la parte leñosa del hueso, se extraen con hexano en Soxhlet hasta eliminar la mayor parte del aceite. La harina desgrasada se extrae con metanol, batiéndola tres veces en un Omnimixer o similar. Se filtra y evapora el metanol en rotavapor a baja temperatura ( $\leq 40^\circ\text{C}$ ). Se obtiene así un sólido en forma de escamas que se puede reducir fácilmente a un polvo amarillo muy claro, algo higroscópico. El rendimiento es de un 25% del peso de semillas inicial.

Para purificar los glucósidos brutos obtenidos, se disuelven en diez veces su peso de agua, se extraen tres veces con cloroformo y se elimina el agua en rotavapor a baja temperatura. El residuo se agita muy bien con diez veces su peso de alcohol absoluto y se deja reposar durante la noche, con lo que se separan la mayor parte de los azúcares en forma de polvo blanco, que se filtra. El etanol se evapora, dejando un residuo de escamas amarillo claro de glucósidos purificados.

#### b) Cromatografía en capa fina.

Se usaron placas de sílicagel Merck GF 254. El desarrollo básico se hace con n-butanol saturado de agua, en el que se separan muy bien los glucósidos. También se emplearon diversas mezclas de cloroformo y metanol y otros disolventes más específicos para determinados casos. La detección se hizo con luz UV de 254nm, con vapores de yodo y con pulverización con ácido sulfúrico, seguida de calefacción a  $110^\circ\text{C}$  durante 3-4 minutos, observándose entonces la placa a la luz UV de 366nm. En estas condiciones, los productos que contienen ácido elenólico y tirosol, dan una intensa fluorescencia blanco-amarillenta que los distinguen de los demás.

#### c) Separación de los glucósidos por cromatografía en columna.

Se empleó un sistema que comprendía una bomba Duramat, un colector de fracciones LKB Ultrarac, un detector Uvicord II y registradores. Se usaron columnas Pharmacia con relleno de sílicagel 60, eluyendo con mezclas de cloroformo-metanol desde (95:5) hasta (1:1), o bien con butanol saturado de agua. Este sistema es el

mejor, pero mucho más lento. El sistema más rápido es el que utiliza una columna de fase inversa Loar RP-18 de Merck, y como eluyente metanol-agua (1:1). Con esta columna de tamaño B se separan, además, los azúcares que impurifican a los glucósidos más polares.

#### d) Técnicas químicas.

La hidrólisis ácida de los productos se realiza con HCl 2N, calentando 1-2 horas a 100°C. La hidrólisis alcalina se lleva a cabo con NaOH 0,5N, hirviendo una hora. En ambos casos se neutraliza la solución con una resina cambiadora básica o ácida y se lleva a sequedad. Los productos resultantes se separan por cromatografía en columna de sílice, con mezclas de cloroformo-metanol o acetato de etilo-metanol.

La esterificación de los grupos carboxilos libres se consigue con diazometano en solución etérea. La metanolisis de los glucósidos se hace por calefacción con metanol absoluto, neutro, en tubo cerrado, a 80-90°C. La acetilación total de los grupos OH de los azúcares, por el método habitual, con anhídrido acético y piridina seca.

#### e) Hidrólisis enzimática.

Se opera a 37°C con un tampón acetato (pH 5,0) y con concentraciones de glucósido y de  $\beta$ -glucosidasa (Worthington Bioch. Co.) del orden de mg/ml. El tiempo necesario para que tenga lugar la hidrólisis oscila de 1 a 3 horas. La solución se extrae con un disolvente orgánico adecuado (éter, acetato de etilo) y se investigan por separado los azúcares y las agluconas.

#### f) Espectros de absorción.

Los espectros de absorción UV se registraron en un Hewlett Packard 8450A Spectrophotometer. Como blanco se usó etanol procedente de eluir una zona de placa en la que no se había depositado ningún fenol.

Los espectros infrarrojos se determinaron en películas o en pastillas de BrK, en un Perkin-Elmer 782 acoplado a una estación de datos 3600.

#### g) Estimación del peso molecular.

Se calcularon a partir de los tiempos de retención con agua destilada en una columna Pharmacia rellena con Sephadex 25-superfino. El sistema va provisto de la bomba, detector y registrador ya indicados en c). La recta de calibrado se trazó con el glucósido G1-6 (nüzhenida, PM 686) ya conocido y la vitamina B<sub>12</sub> (PM 1355) que suministra la firma Pharmacia como patrón. Entre estos límites deben hallarse los pesos de los restantes glucósidos, teniendo en cuenta su polaridad y el orden en que se desplazan en cromatografía en capa fina.

#### h) Productos de referencia.

La oleuropeína se ha obtenido por un método simplificado, basado en los ya conocidos (Walter y col., 1973; Inouye y col., 1974), el metil-oleósido y su derivado tetraacetilado según Inouye (1974) y Lalonde (1976), por hidrólisis alcalina de la oleuropeína, metilación con diazometano y acetilación final. El tirosol se obtuvo por reduc-

ción de sodio y alcohol del ácido 4-hidroxifenilacético y, posteriormente, se adquirió de la firma Aldrich. El salidrósido y la nüzhenida, a partir de los frutos del aligustre (Inouye, 1972). Todos estos productos se han identificado por sus datos cromatográficos y espectros, de acuerdo con los descritos por los autores citados.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por cromatografía en capa fina de los glucósidos purificados (placa de silicagel GH<sub>254</sub> desarrollo con butanol saturado de agua) muestra siete bandas importantes, según se aprecia en la figura 1. De estas bandas, sólo las 3, 4, 5, 6 y 7 dan positivo con el reactivo de Lieberman o simplemente con ácido sulfúrico, calentando 3-4 minutos a 110°C y observando la placa a la luz de 366 nm. Las bandas 1 y 2 dan positiva la reacción de Partridge y la de la ninhidrina, indicando que contienen azúcares y aminoácidos libres, parte de los cuales impurifican las bandas 3 y 4. La eliminación de estas impurezas se consigue por cromatografía en columna de fase inversa RP-18, eluyendo con agua-metanol (1:1) que las arrastra con el frente.

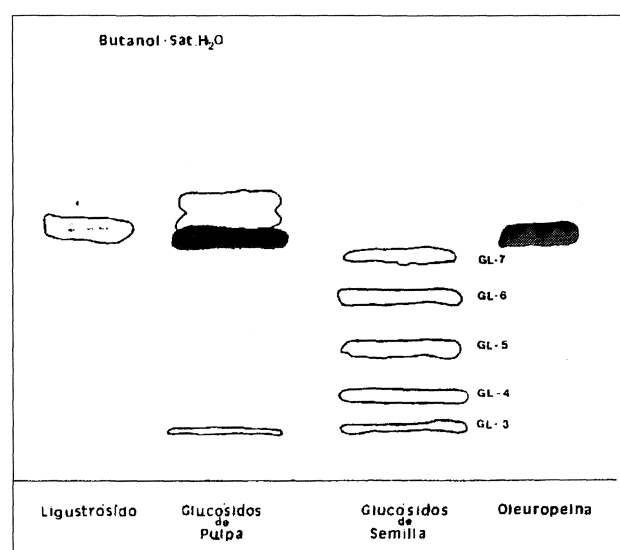


Figura 1  
Cromatografía en capa fina de celulosa de extractos de pulpa y de semillas de aceituna.

Por ello se ha dedicado la atención a las cinco bandas, de 3 a 7, que pueden contener un esqueleto carbonado insaturado. La pulverización de la placa con peryodato sódico y después con bencidina pone en evidencia la presencia de azúcares en todos los compuestos (bandas blancas sobre fondo azul, especialmente intensas desde la banda 3 hasta el origen). La pulverización con cloruro férrico y con el reactivo de Folin, indica la presencia de grupos fenólicos libres en las bandas 5, 6, y 7 solamente.

Por otra parte, la acción de la  $\beta$ -glucosidasa por separado sobre cada una de las bandas obtenidas en columna preparativa, indica que en todos los casos se separa glucosa y se forman agluconas menos polares, por lo que se debe considerar que todas ellas son glucósidos de la  $\beta$ -

glucopiranososa, que al menos tienen una glucosa en un extremo de la molécula. La glucosa se ha identificado por cromatografía en capa fina de celulosa con butanol-ácido acético-agua (4:1:5), y acetato de etilo-piridina-agua (2:1:2) y acetato de etilo-piridina-agua (6:1:1,5); este último sistema permite diferenciar la glucosa de la galactosa.

Finalmente, la hidrólisis ácida de la mezcla de glucósidos con HCl 2N (2 horas a 100°C) origina exclusivamente glucosa, tirosol [Rf en cloroformo-metanol (4:1) = 0,86; en benceno-dioxano-acético (90:25:4) = 0,17; en hexano-éter (3:7) = 0,40] y un tercer producto que ha sido identificado como ácido elenólico por comparación con una hidrólisis ácida de la oleuropeína, realizada en las mismas condiciones.

Por lo tanto, se tiene una serie de glucósidos muy parecidos, con las mismas unidades estructurales, aunque, posiblemente, en distintas proporciones y/o secuencias. Esto se ha confirmado por los espectros infrarrojos de las distintas bandas, que coinciden prácticamente, entre sí, y también con el de la oleuropeína. Los máximos de absorción característicos de estos espectros (en  $\text{cm}^{-1}$ ) están a: 3422 (-OH), 1740 (grupo éster), 1708 (éster conjugado), 1635 (doble enlace), 1511 (benceno sustituido) y 1077, 818 y 855 (benceno 1,4-disustituido).

#### Glucósido 7.

La única excepción a este esquema general la presenta el glucósido 7, cuyo espectro IR no contiene las bandas correspondientes al grupo éster y, además, es el único de los cinco glucósidos cuyo orden de desplazamiento se altera al trabajar en columna de fase inversa RP-18, eluyéndose entre los glucósidos 4 y 5. Este producto se extrae casi selectivamente con acetato de etilo de la solución acuosa de los glucósidos totales, aunque está impurificado con el glucósido 6. La purificación posterior se hace en columna de sílice, eluyendo con acetato de etilo-metanol (95:5) y, finalmente, en CCF preparativa, con butanol saturado de agua. El glucósido cristaliza difícilmente de etanol (p.f. 150-154 °C) y presenta unos máximos de absorción en UV a 224 y 277 nm.

La hidrólisis ácida de este producto origina exclusivamente glucosa y tirosol, sin ningún producto intermediario. La hidrólisis con  $\beta$ -glucosidasa origina glucosa, como ya se ha dicho. Por lo tanto, la estructura más probable de este compuesto es la de un glucósido del tirosol, el  $\beta$ -(4-hidroxifenil)-etil- $\beta$ -D-glucopiranosido o salidrósido (ver fór-

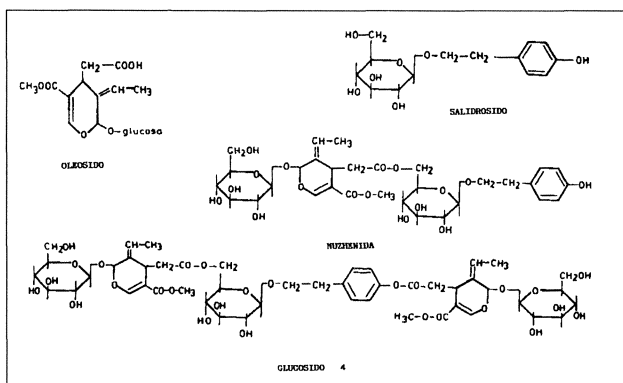


Figura 2

Estructuras de algunos glucósidos de las semillas de aceituna.

mula en la figura 2), ya descrito por otros autores (Birkofer, 1968; Inouye, 1972) en los Géneros *Syringa* y *Ligustrum* de la familia de las *Oleaceae*. Esta estructura está confirmada por comparación con el salidrósido extraído de los frutos de *Ligustrum* según Inouye (1972), especialmente por los valores de Rf en CCF [Butanol-agua = 0,39; cloroformo-metanol (9:1) = 0,25; cloroformo-metanol (4-1) = 0,39; cloroformo-metanol (7:3) = 0,76], por el color con p-nitroanilina diazotada (magenta), así como por los espectros de absorción.

#### Glucósido 6.

Es el más abundante de todos y el único que se puede cristalizar bien de etanol (p.f. 111-114 °C). La purificación final se hace por CCF preparativa (butanol saturado de agua). El espectro UV en etanol muestra máximos a 205, 226, 240 y 278 nm. Esta sustancia debe tener una glucosa en un extremo (se ataca por la  $\beta$ -glucosidasa) y un grupo fenólico libre (da positivo con Folin o con p-nitroanilina). La hidrólisis ácida total origina glucosa, tirosol y ácido elenólico, este último difícil de identificar como tal ácido libre, ya que se altera fácilmente al perder su enlace con la glucosa.

Por todos estos datos y por su comportamiento cromatográfico en butanol-agua y cloroformo-metanol (4:1), podría tratarse de la nüzhenida (ver fórmula en la figura 2), glucósido secoiridoide aislado de los frutos del *Ligustrum lucidum* (Inouye, 1972) y, posteriormente, de otras *Oleaceae*. Para confirmarlo se ha hidrolizado el glucósido con NaOH 0,5 N a reflujo durante una hora, neutralizando la solución con resina Dowex 50 y evaporando el disolvente. El sirupo resultante no se resuelve por cromatografía en capa fina, por lo que se metila con una solución etérea de diazometano. El producto resultante se fracciona por CCF preparativa (cloroformo-metanol 4:1), obteniéndose dos bandas a Rf 0,35 y 0,60. La primera de ellas, rascada y eludida, corresponde al salidrósido o glucósido 7, ya descrito anteriormente. La banda a Rf 0,60, una vez eluida, tiene unos máximos en UV a 237 y 279 nm y un Rf en butanol-agua de 0,55. Estos datos se corresponden con los del éster metílico del oleósido (Lalonde, 1976). Para confirmarlo se ha acetilado todo el producto disponible, obteniéndose una pequeña cantidad de agujas cristalinas (de etanol), que funden a 113-114 °C y que corresponden al metil-oleósido tetraacetilado (Inouye, 1974), obtenido de la hidrólisis de la oleuropeína. En consecuencia, la estructura mostrada por el glucósido 6 (o nüzhenida) se corresponde con la secuencia glucosa-ácido elenólico-glucosa-tirosol, esto es, a una molécula de oleósido que esterifica al OH en C-6 del salidrósido.

La identidad del glucósido C-6 con la nüzhenida se ha comprobado finalmente por comparación con una muestra de este producto obtenido de los frutos del *Ligustrum lucidum* (aligustre o durillo).

#### Glucósido 4.

Es también bastante abundante, pero menos estable que el anterior. La purificación final se ha hecho también por cromatografía en capa fina preparativa. Cristaliza difícilmente de butanol (p.f. 128-135 °C) y tiene dos máximos de absorción en UV a 207 y 234 nm. No da color con los reactivos de fenoles, pero sí libera glucosa con la  $\beta$ -glucosidasa.

Este glucósido, en medio ácido débil, se hidroliza parcialmente dejando libre el glucósido 6, y lo mismo ocurre en la cromatografía en capa fina con disolventes ácidos. En la hidrólisis ácida total seguida de metilación con diazometano, se obtienen salidrósido y metil-oleósido, mientras que en la metanolisis, con metanol absoluto, a 90°C en tubo cerrado, se obtienen el glucósido 6, el metil-oleósido y salidrósido.

Por otra parte, la estimación del peso molecular da un valor de  $1170 \pm 10\%$ , que excede en 484 del peso molecular del glucósido 6 (nüzhenida), que es 686. Teniendo en cuenta que una molécula de oleósido pesa 404 y los resultados obtenidos en las hidrólisis, proponemos como estructura (véase figura 2) para el glucósido 4 la de una molécula de nüzhenida cuyo OH fenólico está esterificado por una molécula de oleósido. El PM resultante de esta molécula es de 1071, lo que supone un error de 8% para el valor estimado. La diferencia de peso con el glucósido 6 corresponde ahora exactamente a la adición de un oleósido con pérdida de agua.

### Glucósidos 3 y 5.

Las hidrólisis de los glucósidos 3 y 5 no nos ha llevado a conclusiones definitivas sobre el orden en que deben estar los diversos componentes que se obtienen: tirosol, glucosa, oleósido o salidrósido. La estimación de pesos moleculares nos da un valor de 973 para el glucósido 5 y de 1260 para el glucósido 3. Teniendo en cuenta los pesos de las tres unidades estructurales presentes, el tirosol (138), la glucosa (180) y el ácido elenólico (242), podemos aventurar la hipótesis de que el glucósido 5 tiene una molécula más de ácido elenólico que la nüzhenida y que el glucósido 3 tiene una molécula más de glucosa que el glucósido 4.

La mayor parte de los derivados fenólicos de las semillas están en forma de glucósidos, formando un grupo de componentes muy afines que contienen las mismas unidades estructurales, aunque en distinta secuencia y cantidades relativas. Efectivamente, en la hidrólisis ácida o alcalina de estos productos siempre se obtiene glucosa, tirosol ( $\beta$ -(4-hidroxifenil)-etanol) y ácido elenólico, que es un secoiridoide derivado del dihidropirano.

Estas unidades estructurales existen en todos los glucósidos aislados de las semillas, salvo en el menos polar de todos, que no contiene ácido elenólico y consiste simplemente en glucosa y tirosol.

Es de notar la semejanza entre los glucósidos aislados de las semillas y el principal glucósido de la pulpa, la oleuropeína, que se compone de glucosa, ácido elenólico e hidroxitirosol ( $\beta$ -(4-hidroxifenil)-etanol), en el lugar del tirosol de las semillas. Ello explica que estos glucósidos tengan también un sabor amargo, pero que sean mucho más estables al aire que la oleuropeína, que por tener hidroxitirosol, con un grupo orto-difenol, se oxida mucho más fácilmente. Igualmente, esta semejanza estructural de los glucósidos de las semillas con la oleuropeína, especialmente la presencia de ácido elenólico, permite considerarlos como potenciales inhibidores del crecimiento microbiano (Federici y Bougi, 1983).

La gran cantidad de tirosol combinado que existe en las semillas (como éster de ácido elenólico o éter de la

glucosa) justifica que este alcohol fenólico sea uno de los principales componentes polares del aceite de oliva virgen (Vázquez y col., 1976), ya que en la hidrólisis que tiene lugar durante la molienda de la aceituna, el tirosol liberado, que es muy estable, se disuelve parcialmente en el aceite.

Los glucósidos que se han aislado de las semillas de olivo son análogos a los descritos en otras Oleáceas de los géneros *Syringa* (Damtoft y col., 1993), *Fraxinus* (Kuwajima y col., 1992; Calis y col., 1993), *Ligustrum* (Willems, 1988), *Jasminum* (Tanahasi y col., 1992), y *Osmanthus* (Sugiyama y col., 1993), que se supone que intervienen en la germinación de las semillas.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sra. M<sup>ra</sup>.J. Lazo Marvá y al Sr. M. Caro Sánchez por su eficaz ayuda en el trabajo experimental.

### BIBLIOGRAFÍA

- Birkofer, L.; Kaiser, C. y Thomas, U. (1968).- "Acteosid und neoacteosid, Zugarester aus *Syringa vulgaris* L. ".- *Z. Naturforschung* **23**, 1051-1058.
- Calis, I.; Hosny, M.; Khalifa, T. y Nishibe, S. (1993).- "Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*".- *Phytochemistry* **33**, 1453-1456.
- Damtoft, S.; Franzyk, H.; Rosendal-Jensen, S. (1993).- "Biosynthesis of secoiridoids glucosides in *Oleaceae*".- *Phytochemistry* **34**, 1291-1299.
- Federici, F. y Bonghi, G. (1983).- "Improved method for isolation of bacterial inhibitors from oleuropein hydrolysis".- *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 509-510.
- Inouye, H. y Nishioka, T. (1972).- "Monoterpene glucosides and related products. XIX. Structure of nüzhenide, a bitter tasting D-glucoside from *Ligustrum lucidum* and *Ligustrum japonicum*".- *Tetrahedron* **28**, 201-209.
- Inouye, H.; Yoshida, T.; Tobita, S.; Tanaka, K. y Nishioka, T. (1974).- "Monoterpene glucosides and related natural products. XXII. Absolute configuration of oleuropein, kingside and morronide".- *Tetrahedron* **30**, 201-209.
- Kuwajima, H.; Morita, M.; Takaishi, K.; Inoue, K.; Fujita, T.; He, Z.D. Yang, C.R. (1992).- "Secoiridoid, coumarin and secoiridoid-coumaric glucosides from *Fraxinus chinensis*".- *Phytochemistry* **31**, 1277-1280.
- Lalonde, R.T.; Wong, C. y Tsai, A.I. (1976).- "Polyglucosidic metabolites of *Oleaceae*. The chain sequence of oleoside aglucon, tyrosol and glucose units in three metabolites from *Fraxinus americana*".- *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3007-3013.
- Sugiyama, M.; Machida, K.; Matsuda, N. y Kikuchi, M. (1993).- "Studies on the constituents of *Osmanthus* species. Part 15. A secoiridoid glycoside from *Osmanthus* species. Part 15. A secoiridoid glycoside from *Osmanthus asiaticus*".- *Phytochemistry* **34**, 1169-1170.
- Tanahasi, T.; Shimada, A.; Nagakura, N. y Nayeshiro, H. (1992).- "Jasamplexosides A, B and C: novel dimeric and trimeric secoiridoid glucosides from *Jasminum amplexicaule*".- *Planta Med.* **58**, 552-555.
- Vázquez Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, M<sup>ra</sup>. L. (1976).- "Componentes fenólicos de la aceituna. III. Polifenoles del aceite".- *Grasas y Aceites* **27**, 185-191.
- Walter, W.M.; Fleming, H.P. y Etchells, J.L. (1973).- "Preparation of antimicrobial components from green olives".- *Applied Microbiology* **26**, 773-776.
- Willems, M. (1988).- "Quantitative determination of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum vulgare* by HPLC".- *Planta Med.* **54**, 66-68.

(Recibido: Marzo 1994)