

# INVESTIGACIÓN

## Procedimiento de obtención y determinación de ácidos terpénicos de la hoja del olivo (*olea europaea*)

Por T. Albi\*, Á. Guinda y A. Lanzón

Instituto de la Grasa (CSIC). Avda. Padre García Tejero, 4. 41012-SEVILLA  
e-mail: talbi@cica.es

### RESUMEN

#### Procedimiento de obtención y determinación de ácidos terpénicos de la hoja del olivo (*olea europaea*).

Los ácidos terpénicos y en particular el ácido oleanólico son de utilidad en la industria farmacéutica, entre otras, por su actividad antitumoral, antiinflamatoria y bactericida. Se describe un procedimiento para la obtención de ácido oleanólico, de las hojas de olivo, mediante extracción sólido/líquido con etanol, posterior tratamiento del extracto y concentración en condiciones definidas, siendo posible obtener en una sola etapa de extracción un rendimiento del 90% del contenido de la hoja (2-3%, referido al peso de hoja), y con un grado de pureza superior al 95%. La materia prima es un subproducto, procedente de la poda anual del olivar y de la limpieza de las aceitunas. Se describe un método para la cuantificación de los ácidos terpénicos del extracto alcohólico de la hoja de olivo mediante el fraccionamiento en cromatografía preparativa en capa fina y cuantificación por cromatografía gaseosa con patrón de ácido betulínico.

**PALABRAS-CLAVE:** Ácido oleanólico - Ácidos terpénicos - Hoja de olivo.

### SUMMARY

#### Obtaining procedure and determination of terpenic acids of olive leaf (*olea europaea*).

The terpenic acids, mainly the oleanolic acid, are used for the pharmaceutical industry, among other, for its antitumoral, anti-inflammatory and germicide activities. A process of obtaining of oleanolic acid from olive leaves is described. Solid/liquid extraction with ethanol, treatment of the extract and concentration under defined conditions, being possible to obtain in a single extraction stage a yield of 90% of the leaf content (2-3%, referred to the leaf weight) and with richness in excess of 95%. The raw material is a by-product, coming from that of pruning yearly of the olive grove and of the cleaning of the olives. A method is described for the quantification of the terpenic acids from olive leaf of the alcoholic extract, by preparative thin layer chromatography fractionation and gas liquid chromatography quantification with betulinic acid standard.

**KEY-WORDS:** Oleanolic acid - Olive leaf - Terpenic acids.

## 1. INTRODUCCIÓN

Son numerosas las publicaciones sobre la actividad biológica de los ácidos terpénicos y de sus glu-

cósidos, en particular del ácido oleanólico, se ha estudiado su actividad como inhibidor de la proliferación de células leucémicas (Es-Saady 1994), como hipoglucemiante (Yoshikawa, 1994), hepatoprotector (Liu, 1994), antiinflamatorio (Martínez-Vázquez, 1997), acción antibacteriana (Sasazuka, 1995), inhibidor de producción de óxido nítrico (Honda, 1997), actividad anti-HIV (Kashiwada, 1998), actividad antitumoral y antiparasitaria (Eugster, 1998). También se ha publicado una revisión específica de la actividad farmacológica del ácido oleanólico (Liu, 1995).

El ácido oleanólico (3-hidroxi-olean-12-en-28-oico), está extensamente repartido en el reino vegetal. Así, la base de datos fitoquímica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (<http://probe.nalusda.gov:8300/cgi/bin/browse/phytochemdb>), recoge su presencia en casi un centenar de plantas, entre las que se encuentra la *olea europaea*.

Vázquez-Roncero y Janer (1969) obtuvieron ácidos triterpénicos de la hoja y de la cutícula de la aceituna, más recientemente diversos autores lo obtienen de otras plantas: Yabuchi, (1987) lo extrae de la hoja y raíz de la remolacha, Milkova, (1989) del bagazo de manzana, Yoshida, (1986) del clavo, García-Granados (1998) parte como materia prima de los subproductos resultantes de la molturación y procesado de la aceituna. En todos estos casos los rendimientos son inferiores al 1% y la pureza no alcanza el 70%.

La considerable cantidad de hojas de que se dispone anualmente en España, sumando las procedentes de la poda a las que quedan en las almazaras después de la separación de las aceitunas que llegan para su molturación y las de la limpieza de las aceitunas de verdeo (= 106 Tm), justifica la obtención de este ácido de la hoja de olivo.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Muestras

Hojas de olivo de tres variedades: picual, hojiblanca y arbequina, de árboles con más de diez

años de antigüedad, procedentes del Jardín de variedades de "Hacienda Guzmán", Sevilla.

## 2.2. Método de extracción y determinación de los ácidos terpénicos

Como se muestra en el esquema de la figura 1, se lavan las hojas con agua y se secan al aire hasta pérdida de la humedad ( $\approx 45\%$ ). Las hojas secas se trituran en un omni-mixer y a continuación se extraen con etanol del 96% (o metanol) (Özcan, 1999), con agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente ( $\approx 20^\circ\text{C}$ ); la proporción peso (g) hoja/volumen (mL) disolvente es de 1/20 (hoja íntegra o triturada). De esta forma se extraen los ácidos y alcoholes triterpénicos, junto a otros componentes polares de la hoja. Se realiza una segunda extracción en las mismas condiciones de la primera; los extractos se filtran a través de papel (filtro Albet n° 240) añadiendo a la disolución etanol ó metanol para llevarla a un volumen (mL) igual al que se empleó para las extracciones.

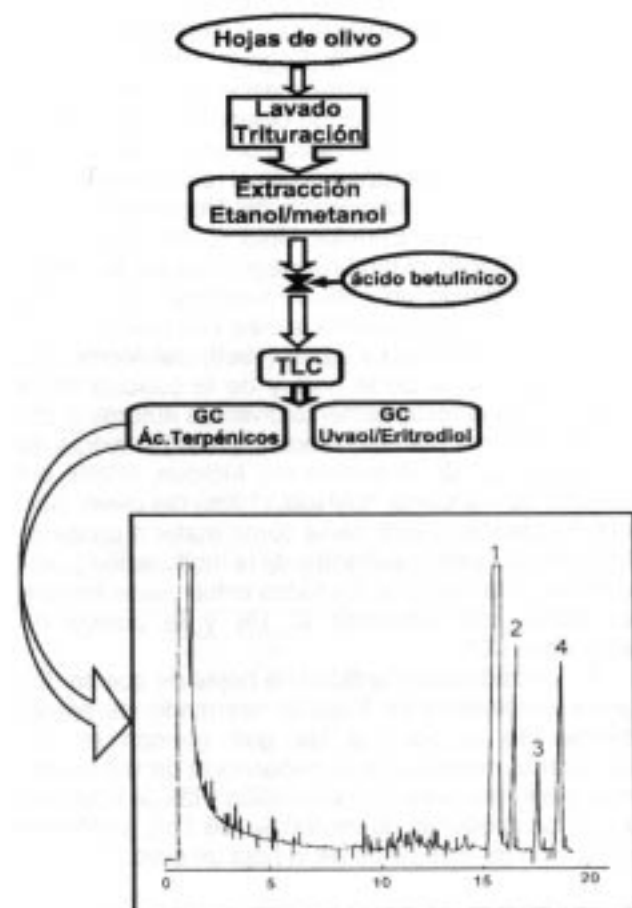


Figura 1

Esquema de la determinación de los ácidos terpénicos de la hoja de olivo y cromatograma de los mismos. 1. ácido oleanólico ( $t_r=16,0$  min). 2. ácido betulínico (patrón,  $t_r=16,8$  min). 3. ácido ursólico ( $t_r=18,0$  min). 4. ácido maslínico ( $t_r=18,9$  min).

Para aislar los ácidos terpénicos del resto de los compuestos que hay en la disolución (eritrodilol, uvaol, colorantes, etc.), que contaminarían la columna del cromatógrafo, se procede como sigue: A una parte alícuota de esta disolución (200  $\mu\text{L}$ ), se le añaden 100  $\mu\text{L}$  de ácido betulínico de 1 mg/mL como patrón y se fracciona mediante cromatografía en capa fina empleándose como líquido de desarrollo hexano/acetato de etilo (2:1, V/V) con el 0,5% de ácido acético, rascándose las bandas con RF 0,15 (maslínico) y 0,45 (oleanólico y ursólico). Se eluye la sílice rascada con 10 mL de éter isopropílico y se evapora a sequedad, añadiéndole a continuación 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de silanización (piridina/hexametilsilazano/trimetilclorosilano 9:3:1), transcurrido 10 min se inyecta 1  $\mu\text{L}$  en un cromatógrafo gaseoso. Se ha utilizado un Hewlett-Packard 5890 serie II, empleándose una columna capilar SGL-5 (5% de difenilmetilsilicona) ligada químicamente, de 25 m de longitud, 0,25 mm  $\varnothing$  interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película. Condiciones cromatográficas: Isoterma a  $260^\circ\text{C}$ , inyector  $300^\circ\text{C}$  y detector  $320^\circ\text{C}$ , inyección en modo split, presión en cabeza de columna 120 Kpa y relación de split 30:1. En las condiciones cromatográficas descritas, los tiempos de retención de los ácidos terpénicos fueron: oleanólico 16,0 min., ursólico 18,0 min., maslínico 18,9 min. y betulínico (patrón) 16,8 min.

## 2.3. Método de obtención del ácido oleanólico

Para la obtención del ácido oleanólico puro, libre de otros compuestos, se procede según el esquema de la figura 2 (solicitud de patente n° P200001020):

Se lavan y extraen las hojas con etanol, como se describe en el apartado anterior, posteriormente se decolora la disolución etanólica con carbón activo (DARCO S-51), agitando durante 10 min. La disolución se filtra y concentra dejándose precipitar, si el precipitado resulta algo amarillento, como consecuencia de no haberse retenido todos los colorantes procedentes de la hoja, se lava con etanol frío ( $5-8^\circ\text{C}$ ). En esta etapa se obtiene  $\approx 80\%$  del ácido oleanólico contenido en las hojas con una riqueza del 87%. Repitiendo las etapas de concentración y precipitación, se obtiene hasta el 90% del ácido oleanólico. Para el estudio de la pureza se comparó por CG el ácido oleanólico obtenido con ácido oleanólico Sigma, empleando la misma columna utilizada en el apartado anterior. Se determinó su punto de fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) utilizando un calorímetro de Perkin-Elmer modelo DSC-4. Para la obtención del termograma de fusión la muestra se introduce en cápsulas de aluminio selladas frente a una cápsula vacía de referencia y se calienta desde  $60^\circ\text{C}$  hasta  $320^\circ\text{C}$  a  $40^\circ\text{C}/\text{min}$ . Se emplea Indio como patrón para la calibración de la temperatura. En el termograma de fusión aparecen



Figura 2  
Esquema del método de obtención del ácido oleonólico de las hojas del olivo.

dos picos endotérmicos uno a 309°C correspondiente al ácido oleonólico y otro a 152°C correspondiente a un compuesto no identificado que desaparece al someter el precipitado a un calentamiento en estufa, durante 5 min., a 160°C alcanzándose, de esta forma una pureza del 97%.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se muestran las cantidades extraídas, en dos operaciones consecutivas, de los ácidos terpénicos de tres variedades de olivo hojiblanca, picual y arbequina empleando dos métodos de preparación de las hojas (íntegra y triturada) y dos disolventes (etanol y metanol). Como se puede comprobar el contenido de estos ácidos depende de la variedad del olivo, siendo el ácido oleonólico en las variedades hojiblanca y picual más del doble del de la arbequina, no observándose, en cambio, diferencias según el disolvente empleado. Para obtener en su totalidad los ácidos terpénicos de la hojas íntegras es necesario realizar dos extracciones consecutivas frente a una sola extracción para las hojas trituradas con excepción de la extracción del ácido maslínico con etanol, que también necesita dos extracciones.

Para la optimización de la obtención del ácido oleonólico se siguió el procedimiento descrito en la parte experimental, ensayándose diferentes proporciones de carbón activo, concentraciones previas a la precipitación y tiempos para la obtención del precipitado. Se determinó, en todos los casos, la cantidad de ácido oleonólico obtenido (datos no mostrados), resultando: La mejor proporción en peso carbón/hoja de 1/10, ya que está no produjo pérdida significativa del contenido de ácido oleonólico y decoloró la disolución impidiendo que los compuestos coloreados afectaran al precipitado. La relación peso de hoja / volumen de disolución (g/mL) más favorable es 1/5, ya que permite la precipitación

Tabla I  
Contenido<sup>a</sup> en ácidos terpénicos (ppm x 10<sup>-2</sup>), referido a materia prima seca, de las hojas de olivo de tres variedades, extraídas en dos operaciones consecutivas, dos métodos de preparación de la hoja y dos disolventes.

		VARIETADES									
EXTRAC.	DISOLV.	Nº de E.*	Hojiblanca			Picual			Arbequina		
			oleonólico	ursólico	maslínico	oleonólico	ursólico	maslínico	oleonólico	ursólico	maslínico
Hoja íntegra	Etanol	1 <sup>a</sup>	299±13	29±2	77±4	235±12	43±2	105±6	112±6	18±1	76±4
		2 <sup>a</sup>	26±2	11±1	33±2	50±3	14±1	36±2	37±2	9±1	36±2
	Metanol	1 <sup>a</sup>	293±13	33±2	89±5	240±13	46±3	116±6	107±6	23±2	96±5
		2 <sup>a</sup>	32±2	8±1	28±2	55±3	9±1	24±2	34±2	5±1	16±1
Hoja triturada	Etanol	1 <sup>a</sup>	332±15	39±2	102±5	256±13	54±3	115±6	134±6	27±2	96±5
		2 <sup>a</sup>	nd	nd	17±2	nd	nd	31±2	nd	nd	12±1
	Metanol	1 <sup>a</sup>	333±15	41±2	116±6	264±14	56±3	135±8	136±8	30±2	107±6
		2 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>a</sup> media SD, n=4, nd= no detectado, E\*=extracción.

de una elevada proporción del ácido oleanólico mientras que permanecen en disolución los ácidos ursólico y maslínico. Por último, el tiempo óptimo para la precipitación de hasta un 90% del ácido oleanólico contenido en las hojas resultó de 24 horas.

#### 4. CONCLUSIONES

Las cantidades de ácidos terpénicos que tienen las hojas de olivo, dependen de la variedad del olivo.

Para la obtención total de ácido oleanólico se puede emplear indistintamente etanol o metanol. El etanol tiene la ventaja de ser un disolvente con posibilidades de uso alimentario.

Con una sola extracción con etanol de la hoja sin triturar, se alcanza entre el 70-90% de rendimiento y una pureza del 87%.

Para la obtención del ácido oleanólico con una pureza del 97%, es necesario someter el precipitado a un calentamiento de 160°C en estufa durante 5 min.

Por las características del mismo procedimiento de obtención, su implantación industrial podría realizarse utilizando las instalaciones ya disponibles, siendo una ventaja adicional, el paro forzoso a que son sometidas las mismas al finalizar las campañas de orujo y semillas, y que podría ser utilizado en la extracción de las hojas del olivo, dando mayor rentabilidad a las instalaciones.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su colaboración en la parte experimental a la ayudante de investigación Dña. Pilar García Rodríguez de Quesada y a la auxiliar de laboratorio Dña. Guadalupe Fernández Arévalo.

#### BIBLIOGRAFÍA

Es-Saady, D., Najid, A., Simo, A., Denizot, Y., Chulia, A.J. and Delage, C. (1994). Effects of ursolic acid and its analogs on soybean 15-lipoxygenase activity and the proliferation rate of a human gastric tumor cell line. *Mediators Inflammation*, **3** (3), 181-184.

Eugster, C. and Eugster, C.H. Ultramicroemulsions of spontaneously dispersible concentrates containing antitumorally, antivirally, and antiparasitically active esters of pentacyclic triterpenes. Patente Int. Appl. N° 9832443 A<sub>1</sub> (30.07.98).

García-Granados, A. Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos oleanólico y maslínico contenidos en los subproducto de la molturación de la aceituna. Patente ES N° 2111498 A<sub>1</sub> (1.3.1998).

Honda, T., Finlay, H.J., Gribble, G.W., Suh, N. and Sporn, M.B. (1997). New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, (13), 1623-28.

Kashiwada, Y., Wang, H.K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda I., Fujioka, T., Yamagishi, Y., Cosentino, L.M., Kozuka, M. and Hokabe, H. (1998). Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.*, **61** (9), 1090-95.

Liu, J., Liu, Y. and Klaassen, C.D. (1994). The effect of Chinese hepatoprotective medicines on experimental liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.*, **42** (3), 183-191.

Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.*, **49**, 57-68.

Özcan, M. (1999). Actividad antioxidante de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en aceites de sésamo y de oliva. *Grasas Aceites*, **50** (5), 355-58.

Martínez-Vázquez, M., Lastra, A.L., Ramírez Apan, T.O., Calderón, J.S. and Bye, R. (1997). Constituents and anti-inflammatory activity of *Sambucus mexicana*. *Rev. Latinoam. Quím.*, **25** (3), 126-27.

Milkova, T.S., Chorbanov, B., Popov, S. and Stamenov, S. (1989). Manufacture of oleanolic acid from grape pomaces. *Khranit. Prom-st.*, **38** (5), 18-19.

Sasazuka, T., Kameda, Y., Endo, M., Suzuki, H. and Hiwatashi, K. (1995). Water-soluble oleanolic acid. Production, inhibition of insoluble glucan synthesis and antibacterial action. *Seito Gijutsu Kenkyukai Shi*, **43**, 63-67.

Vázquez-Roncero, A. y Janer M.L. (1969). Ácidos triterpénicos del olivo. *Grasas Aceites*, **20**, 133-37.

Yabuchi, T., Tanaka, T., Sasazuka, T., Yamahara, J. and Fujimura, H. Oleanolic acid extraction from sugar beets. Patente JP N° 62126150 A2 (8.7.1987)

Yoshida, A., Koike, T., Miyazaki, T., Hirayama, M. and Hayashi, S. Oleanolic acid from clove. Patente JP N° 61268648 A2 (28.11.1986).

Yoshikawa, M., Matsuda, H., Harada, E., Mukarami, T., Wariishi, N., Murakami, N. and Yamahara, J. (1994). Elatiside E, a new hypoglycemic principle from the root cortex of *Aralia elata* Seem.: structure related hypoglycemic activity of oleanolic acid glycosides. *Chem Pharm Bull*, **42** (6), 1354-56.

Recibido: Enero 2001

Aceptado: Mayo 2001