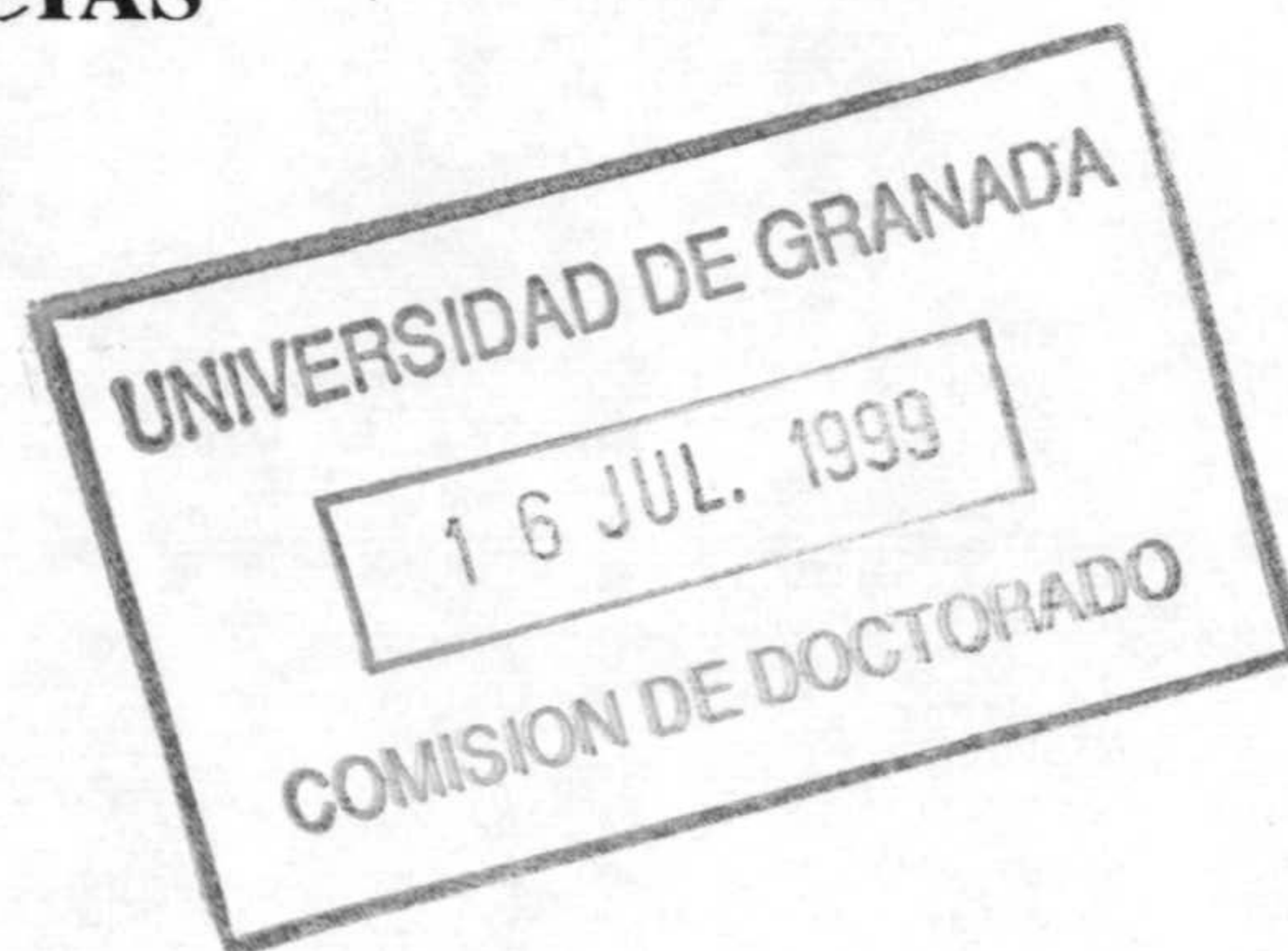
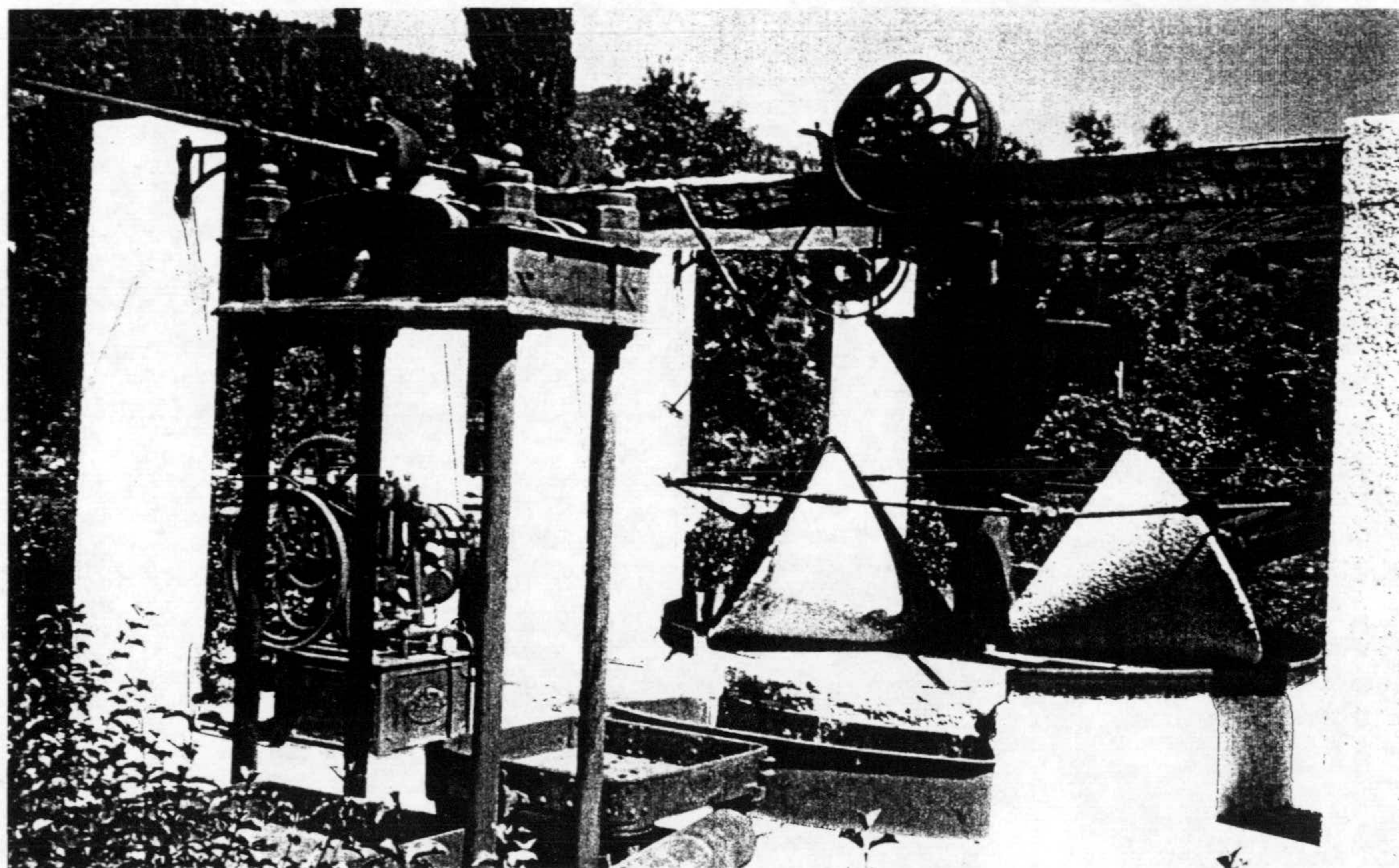


UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

~~No. Prod. 83/36~~
3/75



**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALPECHÍN COMO
BASE PARA DESARROLLAR UNA ESTRATEGIA
BIOLÓGICA PARA SU ELIMINACIÓN**



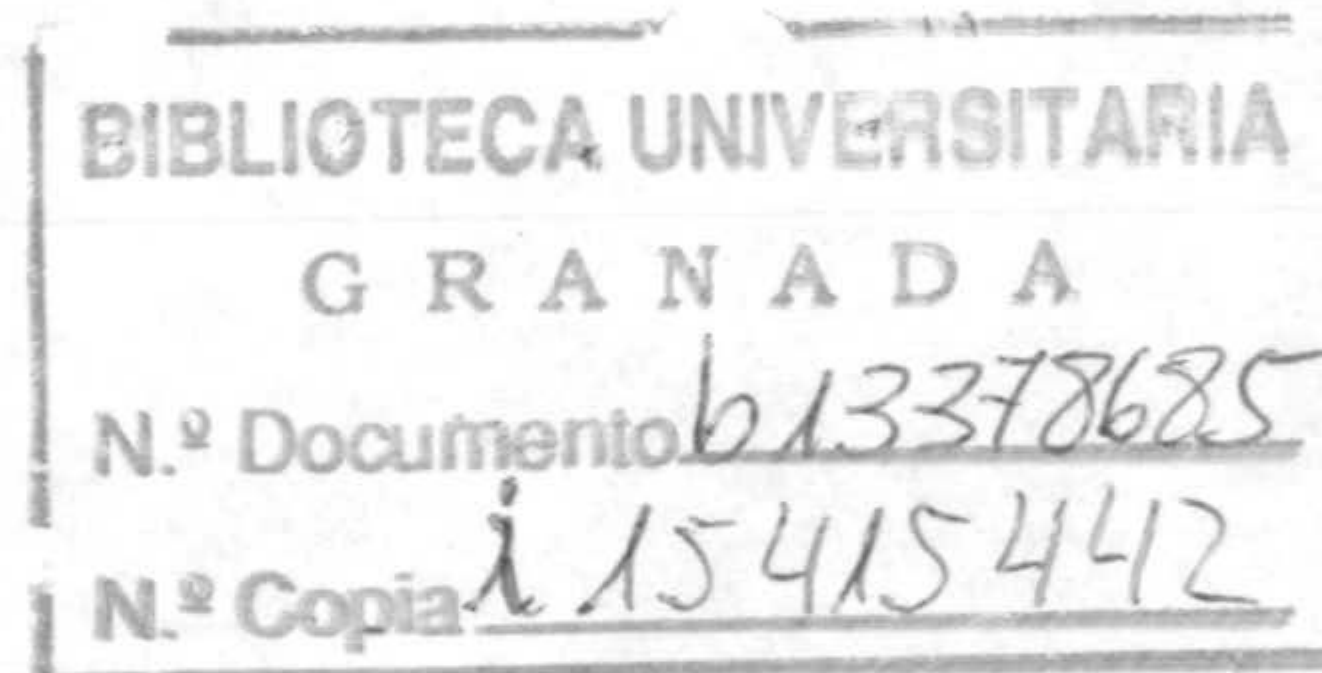
Tesis Doctoral

Matilde Gil García

Granada, 1999

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALPECHÍN COMO
BASE PARA DESARROLLAR UNA ESTRATEGIA
BIOLÓGICA PARA SU ELIMINACIÓN



Tesis Doctoral

Matilde Gil García

Granada, 1999

Esta Tesis doctoral ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC), Granada.

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALPECHÍN COMO BASE
PARA DESARROLLAR UNA ESTRATEGIA BIOLÓGICA PARA SU
ELIMINACIÓN**

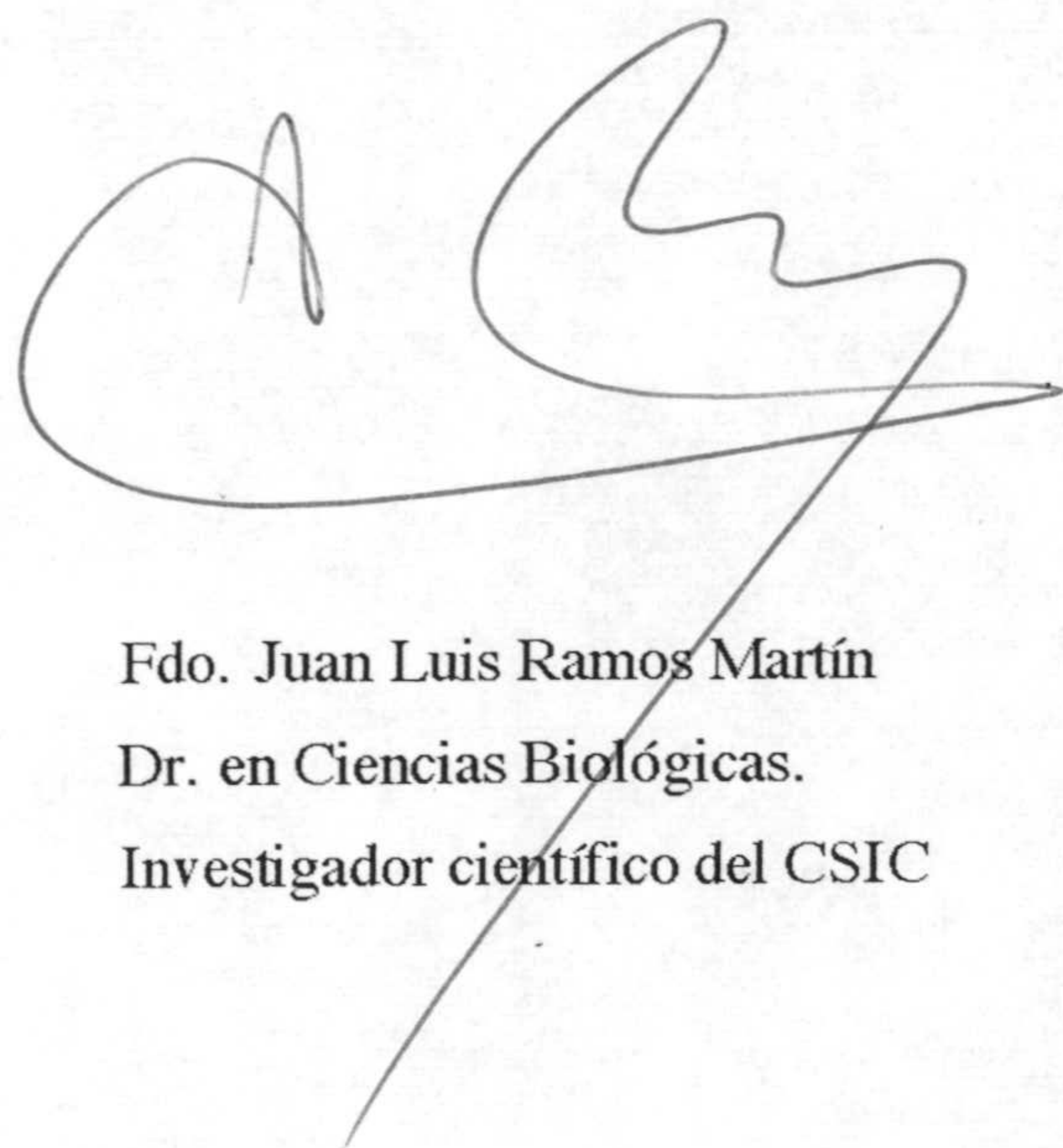
Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Químicas Matilde Gil García para aspirar al título de Doctor en Ciencias Químicas.

Granada, 16 de Julio de 1999

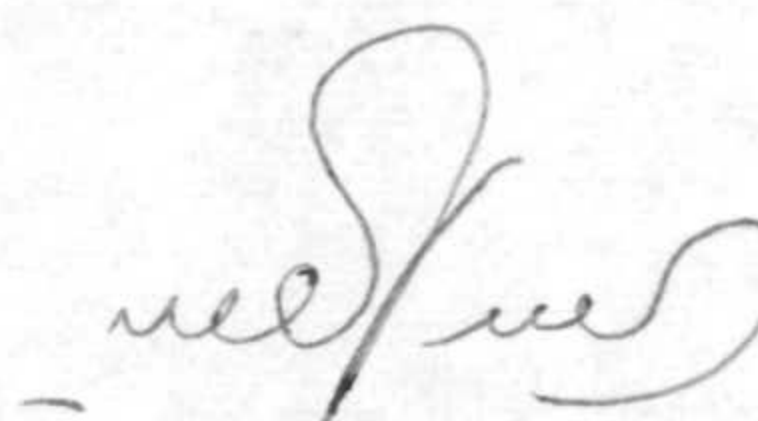


Fdo. Matilde Gil García

Vº Bº de los directores de la Tesis:



Fdo. Juan Luis Ramos Martín
Dr. en Ciencias Biológicas.
Investigador científico del CSIC

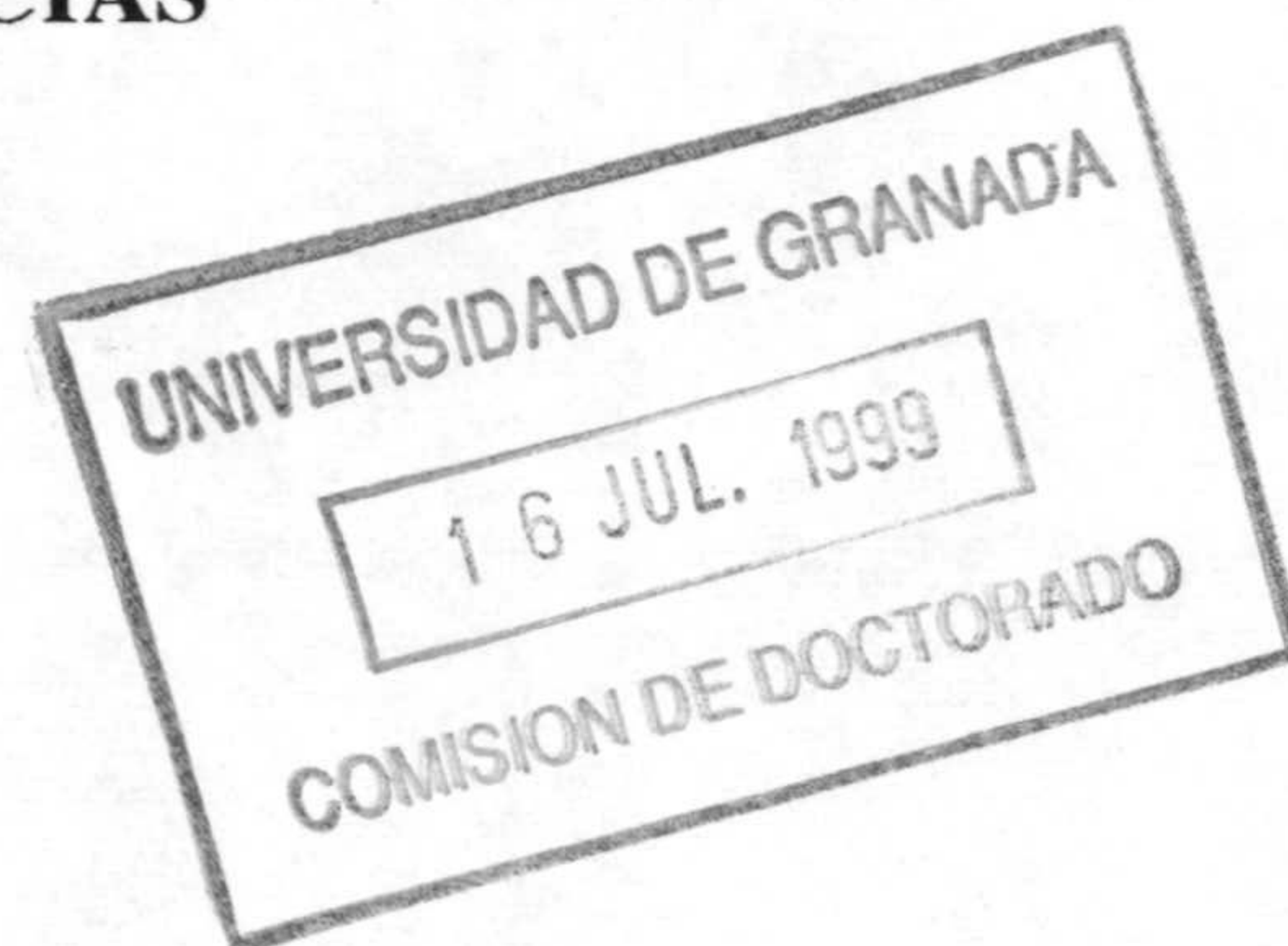


Fdo. Ali Haidour
Dr. en Ciencias Químicas

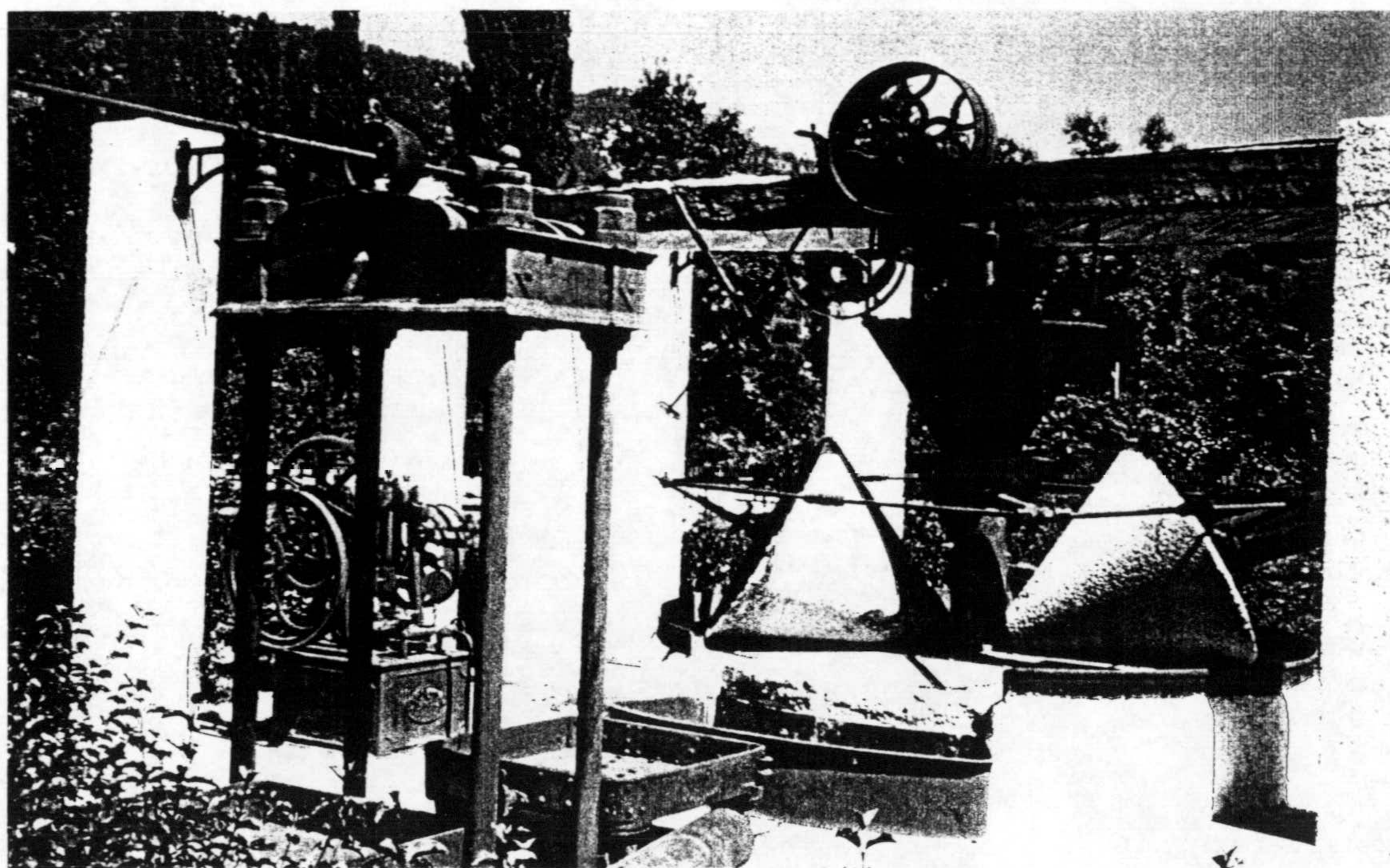
Universidad de Granada. 1999

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

~~T.º Prod. 83/36~~
3/75



**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALPECHÍN COMO
BASE PARA DESARROLLAR UNA ESTRATEGIA
BIOLÓGICA PARA SU ELIMINACIÓN**



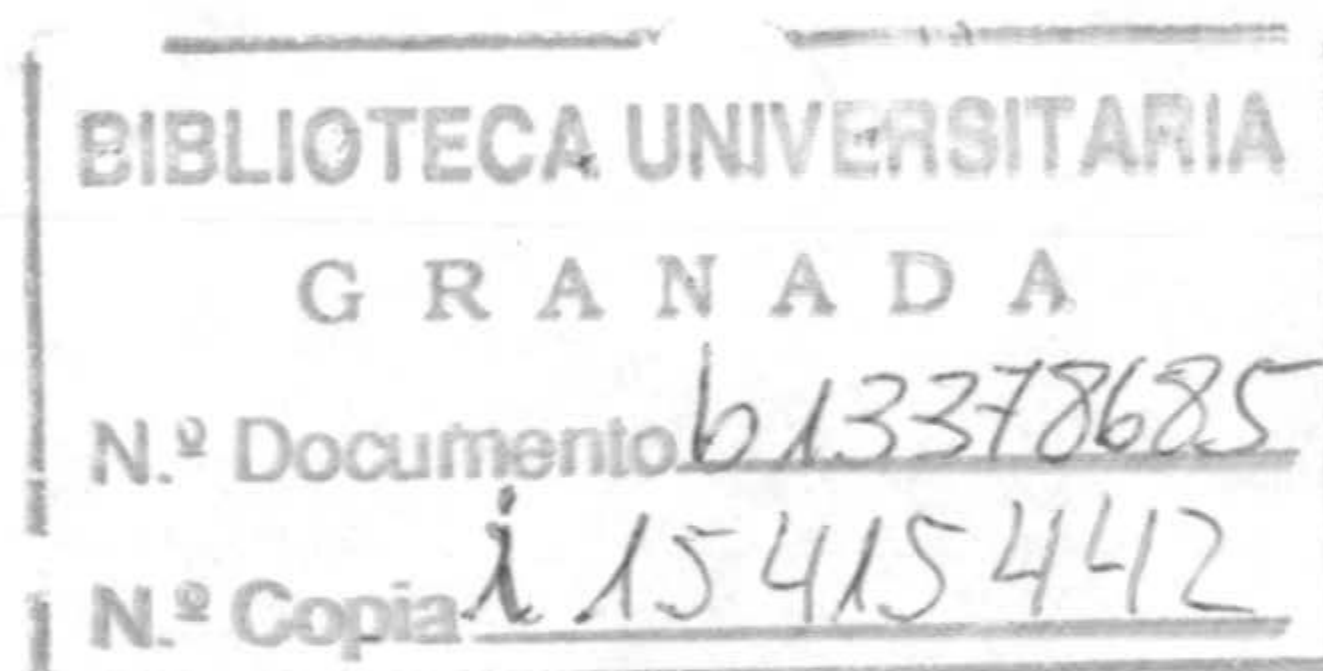
Tesis Doctoral

Matilde Gil García

Granada, 1999

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALPECHÍN COMO
BASE PARA DESARROLLAR UNA ESTRATEGIA
BIOLÓGICA PARA SU ELIMINACIÓN



Tesis Doctoral

Matilde Gil García

Granada, 1999

Esta Tesis doctoral ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC), Granada.

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALPECHÍN COMO BASE
PARA DESARROLLAR UNA ESTRATEGIA BIOLÓGICA PARA SU
ELIMINACIÓN**

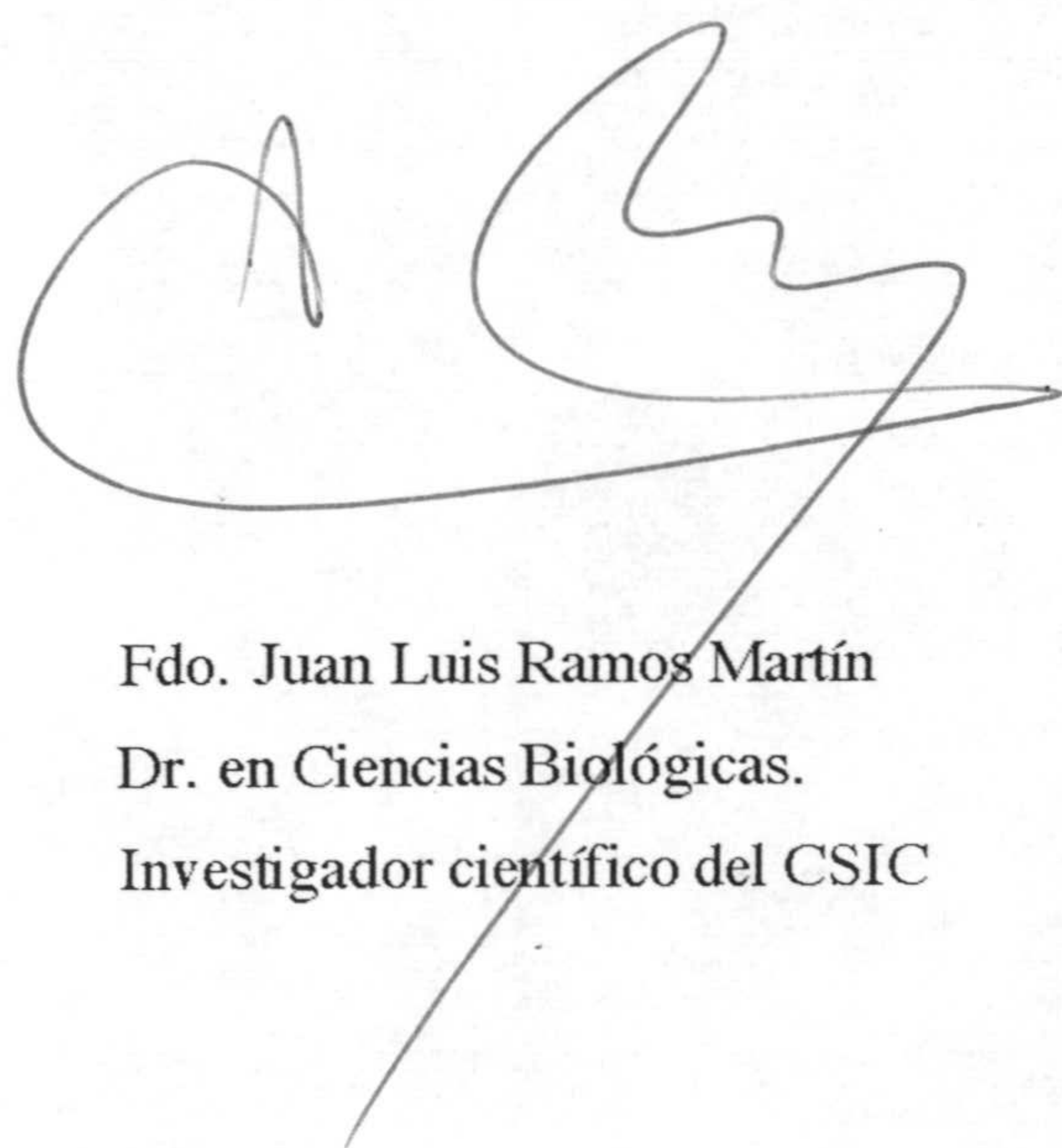
Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Químicas Matilde Gil García para aspirar al título de Doctor en Ciencias Químicas.

Granada, 16 de Julio de 1999

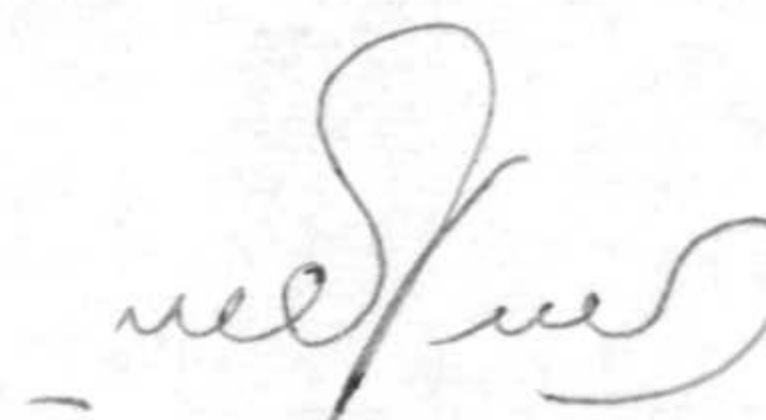


Fdo. Matilde Gil García

Vº Bº de los directores de la Tesis:



Fdo. Juan Luis Ramos Martín
Dr. en Ciencias Biológicas.
Investigador científico del CSIC



Fdo. Ali Haidour
Dr. en Ciencias Químicas

Universidad de Granada. 1999

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. LA INDUSTRIA DEL ACEITE DE OLIVA Y SU PROBLEMÁTICA.....	1
I.1.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA.....	3
I.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS DIFERENTES AGUAS RESIDUALES OBTENIDAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA.....	7
I.1.3. EFECTO FITOTÓXICO Y ANTIMICROBIANO DEL ALPECHÍN.....	9
I.1.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN.....	11
I.1.5. SOLUCIONES PROPUESTAS AL PROBLEMA DE CONTAMINACIÓN POR ALPECHÍN.....	11
I.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....	20
I.2.1. ANÁLISIS QUÍMICO DEL ALPECHÍN.....	20
I.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ACEITE DE OLIVA Y EN OTRAS PARTES DE LA PLANTA (<i>Olea europaea</i> Linn).....	23
I.2.3. COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN COMUNES A OTRAS PLANTAS.....	26
I.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO.....	27
I.3.1. MICROORGANISMOS CAPACES DE CATABOLIZAR COMPUESTOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN.....	27
I.3.2. RUTAS CATABÓLICAS DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS PRESENTES EN EL ALPECHÍN Y ENZIMAS IMPLICADAS EN ELLAS.....	30
I.3.2.1. RUPTURA DEL ENLACE ÉTER.....	35
I.3.2.2. RUTAS CATABÓLICAS DEL BENCENO.....	36
I.3.2.3. RUTAS CATABÓLICAS DE ALQUILBENCENOS.....	38
I.3.2.4. METABOLISMO DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN.....	42
I.3.2.4.1. Rutas catabólicas para la degradación de catecol y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (ácido protocatéquico).....	42
I.3.2.4.2. Rutas catabólicas para la degradación de ácidos hidroxicinámicos.....	43

I.3.2.4.3. Rutas catabólicas para la degradación de ácido benzoico y sus derivados.....	46
I.3.2.4.4. Rutas catabólicas para la degradación de derivados del ácido fenilacético.....	49
I.3.2.4.5. Rutas catabólicas para la degradación del ácido 3-fenilpropiónico.	52
I.3.2.4.6. Rutas catabólicas para la degradación de flavonoides.....	53
O.OBJETIVOS.....	55
A. TÉCNICAS GENERALES.....	57
A.1. INSTRUMENTACIÓN Y TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	57
A.1.1. PUNTOS DE FUSIÓN.....	57
A.1.2. ESPECTROS DE IR.....	57
A.1.3. ESPECTROS DE RMN- ¹ H.....	57
A.1.4. ESPECTROS DE RMN- ¹³ C.....	57
A.1.5. ESPECTROS BIDIMENSIONALES DE RMN (RMN-2D).....	58
A.1.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	58
A.1.7. CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG).....	59
A.1.8. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EIMS).....	59
A.1.9. DISOLVENTES.....	60
A.1.10. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA CONVENCIONAL.....	60
A.1.11. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA A PRESIÓN.....	61
A.1.12. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).....	61
A.1.13. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA (CCFP).....	61
A.2. REACCIONES GENERALES.....	62
A.2.1. ACETILACIÓN.....	62
A.2.2. ESTERIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS CON DIAZOMETANO.....	62
A.2.3. REDUCCIÓN CON NaBH ₄	63
A.2.4. SAPONIFICACIÓN.....	63
A.2.5. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE TRIMETILSILIL ÉSTERES.....	63
A.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS DIFERENTES RESIDUOS QUE SE OBTIENEN EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE	

OLIVA.....	64
A.3.1. EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS PRESENTES EN ALPECHÍN EN DISTINTAS CONDICIONES DE pH.....	64
A.3.2. EXTRACCIÓN DE ORUJO.....	68
A.3.3. EXTRACCIÓN DE “ALPEORUJO”.....	68
A.3.4. ANÁLISIS PRELIMINAR DE EXTRACTOS PROCEDENTES DE LA EXTRACCIÓN DE ALPECHÍN.....	71
A.3.5. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE HEXANO.....	71
A.3.5.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE HEXANO.....	72
A.3.5.2. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA A PRESIÓN DEL EXTRACTO DE HEXANO METILADO (CROMATOGRAFÍA A).....	72
A.3.5.3. SAPONIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN A1.....	72
A.3.5.4. ESTERIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE A1.....	72
A.3.5.5. ACETILACIÓN DE LAS FRACCIONES A2 Y A3.....	72
A.3.5.6. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA A PRESIÓN DE A A1 (CROMATOGRAFÍA B).....	73
A.3.6. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO.....	73
A.3.6.1. ELIMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO.....	73
A.3.6.2. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO LIBRE DE ÁCIDOS GRASOS.....	73
A.3.6.3. SILILACIÓN DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO SIN ESTERIFICAR.....	74
A.3.7. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ÉTER.....	74
A.3.7.1. ELIMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL EXTRACTO DE ÉTER.....	74
A.3.7.2. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ÉTER.....	74
A.3.7.3. DERIVATIZACIÓN DEL EXTRACTO DE ÉTER.....	75
A.3.8. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	75
A.3.8.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	75
A.3.8.2. ACETILACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN METILADO.....	75
A.3.8.3. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO METILADO Y ACETILADO DE ALPECHÍN (CROMATOGRAFÍA C).....	76

A.3.8.4.	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN C7.....	76
A.3.8.5.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN C3 (CROMATOGRAFÍA D).....	77
A.3.8.6.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 2 [extracción neutra]) (CROMATOGRAFÍA E).....	77
A.3.8.7.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 3 [extracción 3b]) (CROMATOGRAFÍA F).....	77
A.3.8.8.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN F2 (CROMATOGRAFÍA G).....	78
A.3.8.9.	ACETILACIÓN DE LAS FRACCIONES G2, G6, G8, Y G11.....	78
A.3.8.10.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN G2 ACETILADA (CROMATOGRAFÍA H).....	79
A.3.8.11.	ESTERIFICACIÓN DE LAS AGRUPACIONES H3, H4, H5 Y H6.....	79
A.3.8.12.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA AGRUPACIÓN H3 METILADA (CROMATOGRAFÍA I).....	79
A.3.8.13.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN H4 METILADA (CROMATOGRAFÍA J).....	80
A.3.8.14.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA AGRUPACIÓN H6 METILADA (CROMATOGRAFÍA K).....	80
A.3.8.15.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA A PRESIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE "ALPEORUJO" (CROMATOGRAFÍA L).....	81
A.3.8.15.1.	Saponificación de la fracción L3.....	82
A.3.8.15.2.	Esterificación del compuesto 16.....	82
A.3.8.15.3.	Reducción de la fracción L1.....	82
B.	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.....	83
B.1.	CEPAS BACTERIANAS.....	83
B.2.	MEDIOS DE CULTIVO.....	84
B.2.1.	MEDIOS RICOS.....	84
B.2.2.	MEDIOS MÍNIMOS.....	84
B.3.	ANTIBIÓTICOS.....	85
B.4.	ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE	

BACTERIAS DE DIFERENTES SUSTRATOS.....	86
B.5. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	86
B.6. CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS.....	xxx
B.7. PLÁSMIDOS.....	87
B.8. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO.....	89
B.8.1. AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA.....	89
B.8.1.1. MÉTODO "MAGIC-MINIPREP"	89
B.8.1.2. MÉTODO "QIAPREPS"	89
B.8.2. AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA Y PURIFICACIÓN EN GRADIENTE DE CsCl.....	89
B.9. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO.....	90
B.9.1. MINIPREPARACIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO.....	91
B.9.2. MÉTODO "RAPID PREP MICRO"	92
B.10. MANIPULACIÓN DE ADN.....	92
B.10.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN.....	92
B.10.2. RESTRICCIÓN DE ADN.....	93
B.10.3. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN Y PLÁSMIDOS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	93
B.10.4. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE LOS GELES DE AGAROSA.....	94
B.11. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA DE NYLON E HIBRIDACIÓN.....	94
B.11.1 TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA DE NYLON.....	94
B.11.1.1. TRANSFERENCIA DE ADN POR CAPILARIDAD.....	95
B.11.1.2. TRANSFERENCIA DE ADN AL VACÍO.....	95
B.11.2. MARCADO DE LA SONDA CON NUCLEÓTIDOS SUSTITUIDOS CON DIOXIGENINA.....	95
B.11.3. HIBRIDACIÓN.....	96
B.11.4. DETECCIÓN DE HIBRIDOS DE ADN.....	97
B.12. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	97
B.12.1. ANÁLISIS DE METABOLITOS POR CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC)	97
B.12.2. ANÁLISIS DE METABOLITOS POR RESONANCIA	

MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN- ¹ H)	98
R. RESULTADOS.....	99
R.1. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE HEXANO.....	99
R.1.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE HEXANO DE ORUJO.....	99
R.1.2. ESTUDIO DE LAS FRACCIÓNES ANTERIORES.....	100
R.1.2.1. ESTUDIO DE LA FRACCIÓN A1 ENRIQUECIDA EN TRIGLICÉRIDOS.....	100
R.1.2.2. ESTUDIO DE LAS FRACCIONES A2 Y A3.....	100
R.1.2.2.1 Evidencias de la estructura de oleanano en los compuestos 1 y 2. Asignación de protones y carbonos de los compuestos 1 (3β- acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo) y 2 (2α, 3β-diacetoxi- olean-12-en-28-oato de metilo) y su configuración.....	101
R.2. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO Y ÉTER.....	111
R.2.1. ELIMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO.....	111
R.2.2. SILILACIÓN DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO LIBRE DE ÁCIDOS GRASOS.....	112
R.2.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ÉTER DE ALPECHÍN Y “ALPEORUJO”.....	113
R.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	115
R.3.1. DERIVATIZACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	116
R.3.1.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	116
R.3.1.2. ACETILACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	116
R.3.2. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO METILADO Y ACETILADO DE ALPECHÍN (CROMATOGRAFÍA C).....	117
R.3.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO 3’.....	117
R.3.2.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO 4’.....	119
R.3.3. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 2 [EXTRACCIÓN NEUTRA]) (CROMATOGRAFÍA E).....	122
R.3.3.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS 5 Y 6.....	123

R.3.4.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 3 [EXTRACCIÓN3b]) (CROMATOGRAFÍA F).....	125
R.3.4.1.	CROMATOGRAFÍA G.....	126
R.3.4.2.	CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN G2 ACETILADA (CROMATOGRAFÍA H).....	127
R.3.4.2.1.	Cromatografía sobre sílica gel en columna de la agrupación H3 metilada (Cromatografía I).....	128
R.3.4.2.2.	Cromatografía sobre sílica gel en columna de la agrupación H4 metilada (Cromatografía J)	131
R.3.4.2.3.	Cromatografía sobre sílica gel en columna de la agrupación H6 metilada (Cromatografía K)	133
R.3.5.	ESTUDIO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE “ALPEORUJO” (CROMATOGRAFÍA L)	134
R.4.	AISLAMIENTO DE PRODUCTOS LINEALES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE “ALPEORUJO”	139
R.4.1.	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN ESTUDIO.....	139
R.4.2.	ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE “ALPEORUJO”	140
R.4.3.	ESTUDIO DE ALGUNAS DE LAS FRACCIONES RECOGIDAS EN LA CROMATOGRAFÍA L.....	141
R.4.3.1.	DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS 11 Y 12.....	141
R.4.3.1.1.	Reducción del compuesto 11.....	145
R.4.3.1.2.	Saponificación del compuesto 12.....	145
R.4.3.1.3.	Esterificación del compuesto 16.....	146
R.4.3.2.	CONCLUSIONES DE LOS ANÁLISIS PREVIOS.....	147
R.5.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CAPACES DE UTILIZAR DIFERENTES COMPUESTOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN COMO FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA.....	151
R.5.1.	CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS A EXPENSAS DE ÁCIDO <i>o</i> -ANÍSICO COMO FUENTE DE	

CARBONO.....	155
R.5.2. ELUCIDACIÓN DE LOS PRIMEROS PASOS DE LA RUTA CATABÓLICA.....	155
R.5.2.1. EL PRIMER PASO DE LA RUTA ES LA <i>o</i> -DEMÉTILACIÓN E HIDROXILACIÓN DEL ÁCIDO <i>o</i> -ANÍSICO. EVIDENCIAS OBTENIDAS CON DICAMBA (ÁCIDO 3,6-DICLORO-2-METOXIBENZOICO) COMO SUSTRATO.....	156
R.5.2.2. ELUCIDACIÓN DEL SEGUNDO Y TERCER PASOS DE LA RUTA CATABÓLICA DEL ÁCIDO <i>o</i> -ANÍSICO. METABOLIZACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO, ÁCIDO GENTÍSICO Y CATECOL POR LAS CEPAS DAO1, DAO2 Y DAO3.....	159
R.5.2.3. IDENTIFICACIÓN DEL METABOLITO QUE APARECE EN LA RUTA CATABÓLICA DEL ÁCIDO <i>o</i> -ANÍSICO.....	162
R.5.3. DEGRADACIÓN DE ÁCIDO <i>o</i> -ANÍSICO POR UN CONSORCIO BACTERIANO.....	164
R.5.3.1. ESTUDIO CON DAO4 DE LA BIODEGRADACIÓN DEL ÁCIDO <i>o</i> -ANÍSICO DURANTE LAS PRIMERAS 24 HORAS.....	164
R.5.3.2. EL CONSORCIO DAO4 METABOLIZA EL ÁCIDO GENTÍSICO (ÁCIDO 2,5-DIHIDROXIBENZOICO) PERO NO OTROS ÁCIDOS BENZOICOS DIHIDROXILADOS.....	166
R.5.4. ORGANISMO DEGRADADOR DEL CONSORCIO.....	167
R.5.4.1. AISLAMIENTO DE CADA UNA DE LAS CEPAS QUE COMPONEN EL CONSORCIO DAO4.....	167
R.5.4.2. CONFIRMACIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO.....	169
R.5.4.3. PAPEL DE CADA UNA DE LAS BACTERIAS COMPONENTES DEL CONSORCIO BACTERIANO.....	171
R.5.4.4. PROPORCIÓN EN LA QUE SE ENCUENTRAN DAO4-A Y DAO4-B EN EL CONSORCIO BACTERIANO.....	175
R.5.5. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE ESTE CAPÍTULO..	176
R.6. CATABOLISMO DEL ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIFENILACÉTICO.....	181
R.6.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CAPACES DE UTILIZAR ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIFENILACÉTICO COMO FUENTE DE CARBONO.....	182
R.6.2. HIBRIDACIÓN EN "SOUTHERN" PARA LOCALIZAR GENES DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO <i>p</i> -	

HIDROXIFENILACÉTICO.....	183
R.6.2.1. HIBRIDACIÓN CON <i>hpaB</i>	184
R.6.2.2. HIBRIDACIÓN CON <i>hpaD</i>	185
CONCLUSIONES.....	189
ESPECTROS.....	209
BIBLIOGRAFÍA.....	265

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La actividad agrícola e industrial del hombre ha conducido a la acumulación sobre la biosfera de grandes cantidades de compuestos químicos unos similares a los sintetizados por los seres vivos, y otros, denominados xenobióticos, con estructuras o substituyentes raros en los productos naturales. Tanto los productos biogénicos como los xenobióticos exhiben varios grados de degradabilidad; así, mientras que los biogénicos son fácilmente degradables, los xenobióticos son, en general, recalcitrantes y permanecen en el medioambiente constituyendo una fuente de contaminación, e incidiendo negativamente sobre la biosfera y sobre la calidad de vida de los seres vivos. La eliminación de xenobióticos es una prioridad de los Ministerios del Medio Ambiente en países de Europa y la Agencia del Medio Ambiente de USA.

I.1. LA INDUSTRIA DEL ACEITE DE OLIVA Y SU PROBLEMÁTICA

Una de las principales actividades agrícolas de los países de la cuenca del Mediterráneo es la industria almacerera. La producción de aceite de oliva constituye una de las principales fuentes de la economía en estas zonas, siendo cada año mayor el número de almazaras así como su producción. En la actualidad, debido al interés por una buena nutrición, son cada vez más los países consumidores de aceite de oliva. Es bien conocido el efecto positivo de este aceite sobre la salud, en particular se tiene conocimiento de que puede contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares. España produce cerca del 30% del aceite de oliva del mundo, y Andalucía soporta el 20% de la producción mundial (Martínez-Nieto, y *col.*, 1994).

En el proceso de producción de aceite de oliva se obtienen unas aguas residuales que reciben el nombre de alpechín. El alpechín está constituido por las aguas de vegetación de la aceituna, las aguas de molturación y lavado del fruto así como las resultantes de la extracción del aceite. Estas aguas residuales constituyen un importante problema de contaminación medioambiental debido a su composición química y física.

En la Tabla I.1.1 se resume el contenido de un alpechín fresco conforme a los análisis elaborados por la Agencia del Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (AMA).

Tabla I.1.1. Composición de las aguas residuales de almazaras

Agua, 83-94%		
Materia orgánica, 7-15%	Ácidos grasos	0,02-1%
	Proteínas	1,2-2,4%
	Azúcares	2-8%
	Ácidos orgánicos	0,5-1,5%
	Polialcoholes	1-1,5%
	Pectinas	0,5-1,5%
	Taninos	0,5-1%
Minerales, 1,5-2,0%	Polifenoles	0,5-1%
	Carbonatos	0,32-0,42%
	Fosfatos	0,21-0,28%
	Sales de potasio	0,70-0,94%
	Sales de sodio	0,11-0,14%
	Otros	0,17-0,22%

En la Tabla I.1.2 se presentan las características físico-químicas del alpechín en relación a su poder contaminante.

Tabla I.1.2. Características físico-químicas de alpechín

		g/l
pH	5,3	
DQO		212
DBO		179
Sólidos totales		56
Sólidos volátiles		44
Sólidos no volátiles		11
Sólidos sedimentables		8
Sólidos no sedimentables		48
Sólidos suspendidos		2
Sólidos disueltos		45
Fenoles totales	0,7%	

Datos de Martínez Nieto y Garrido Hoyos, 1994.

Una campaña almacerera dura alrededor de 100 días y se puede decir que en ese período de tiempo se produce una media de 10 millones de metros cúbicos de alpechín. Teniendo en cuenta el valor de su DBO (Demanda biológica de oxígeno) se puede considerar que su contaminación es equivalente a la generada por una ciudad de 16 millones de habitantes en el mismo periodo.

La causa del poder contaminante del alpechín, su toxicidad y recalcitrancia es debida a su contenido en materia orgánica, sobre todo en polifenoles así como su elevada concentración de sólidos. Las partículas en suspensión se depositan en los lechos de los ríos, y producen una capa que impide la transferencia de O_2 a los microorganismos que se encuentran en los mismos. Solamente sobreviven los anaerobios cuyo metabolismo conduce a catabolitos malolientes. La grasa en emulsión forma una película superficial que también impide la disolución de O_2 atmosférico, y dificulta la penetración de los rayos solares que pueden llegar a impedir el normal desarrollo de la vida animal y vegetal en las aguas (Martínez-Nieto y *col.*, 1993). Se ha calculado que son necesarios 50 g de oxígeno para depurar por oxidación el alpechín de 1 kg de aceituna (Martínez-Nieto y *col.*, 1994).

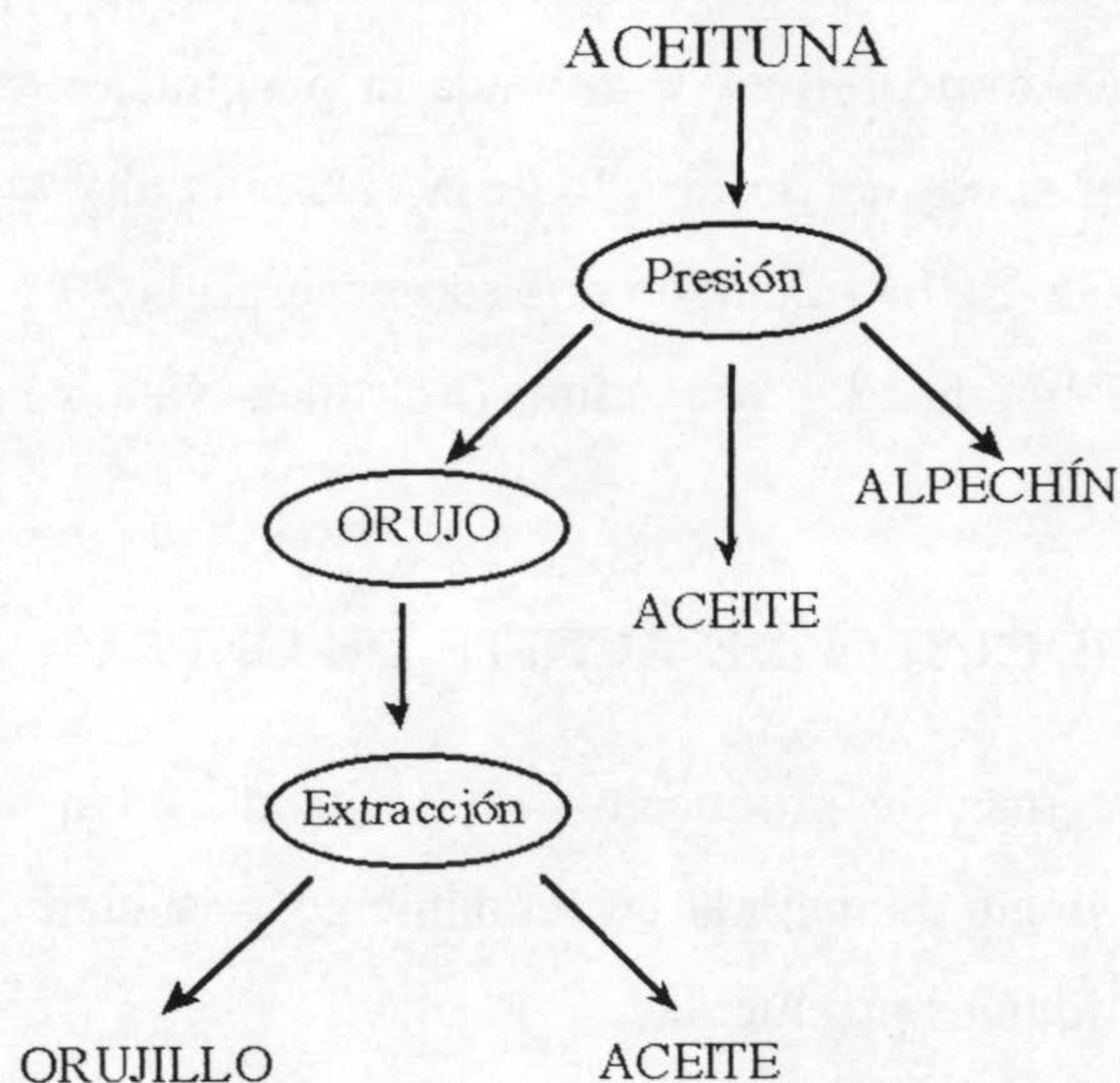
I.1.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA

Existen diferentes sistemas de producción de aceite de oliva que han ido evolucionando con el tiempo con objeto de mejorar en rendimiento y calidad del mismo y disminuir el volumen de aguas residuales producidas.

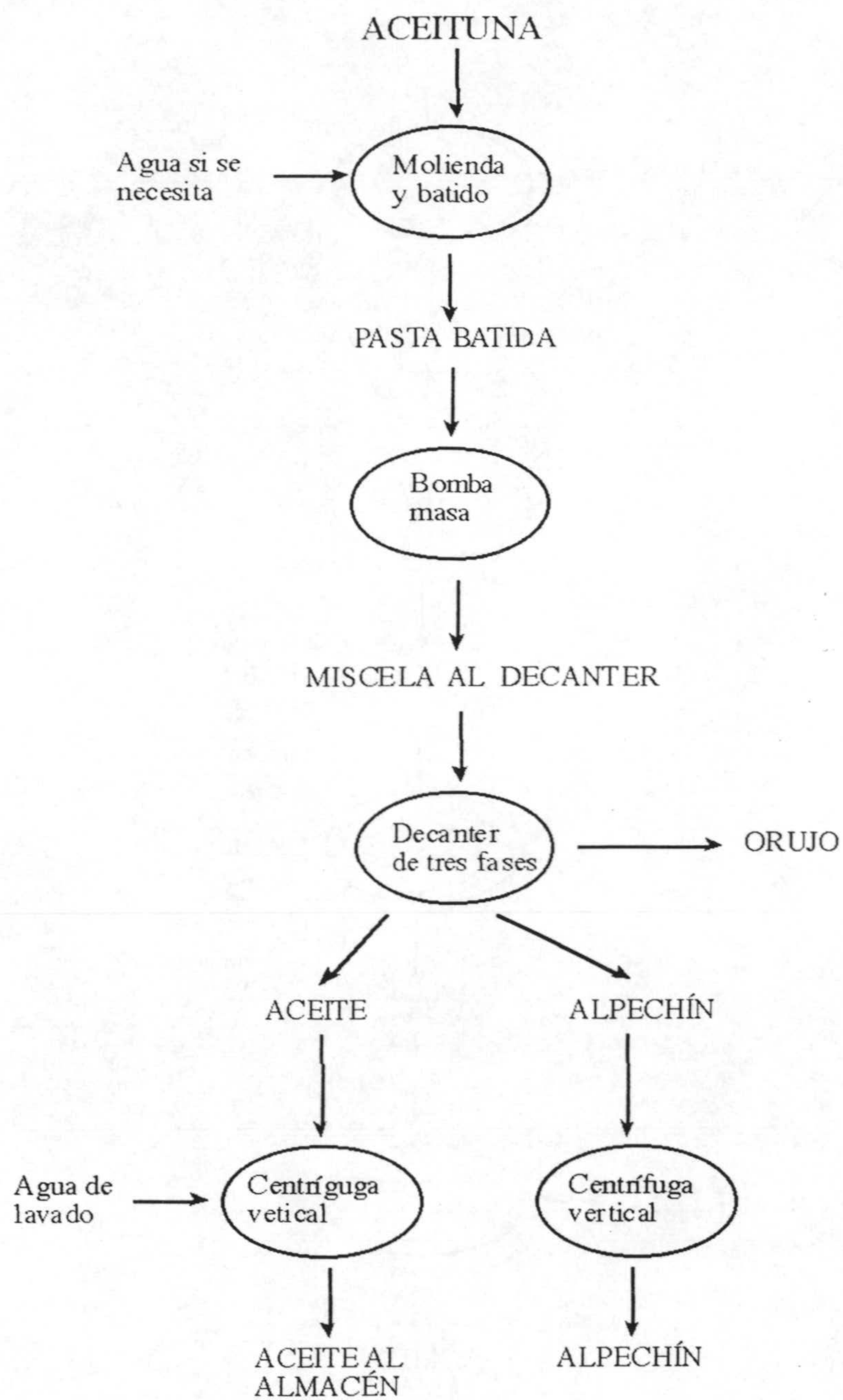
Se pueden hablar de varios procesos de extracción de aceite de oliva. El proceso más clásico y tradicional es el de prensado o discontinuo (Esquema I.1.1). En este proceso se utiliza muy poca cantidad de agua y al final del mismo se obtienen tres fases: una fase oleosa que constituye el aceite de oliva; otra fase sólida que constituye el orujo, y por último una fase acuosa, que se trata del agua residual o alpechín. Debido a las características del aceite obtenido en este proceso y a su rendimiento, este sistema empezó a ser sustituido por el sistema continuo de tres fases (Esquema I.1.2). Éste consiste básicamente en una molturación de la aceituna, la cual se mezcla con agua caliente y tras una serie de procesos de centrifugación se separan el aceite y agua residual o alpechín. El sólido resultante en la molturación se conoce como orujo.

Debido al gran consumo de agua y a la elevada producción de alpechín hace unos cuatro años se empezó a desarrollar un tercer sistema, es el denominado sistema en

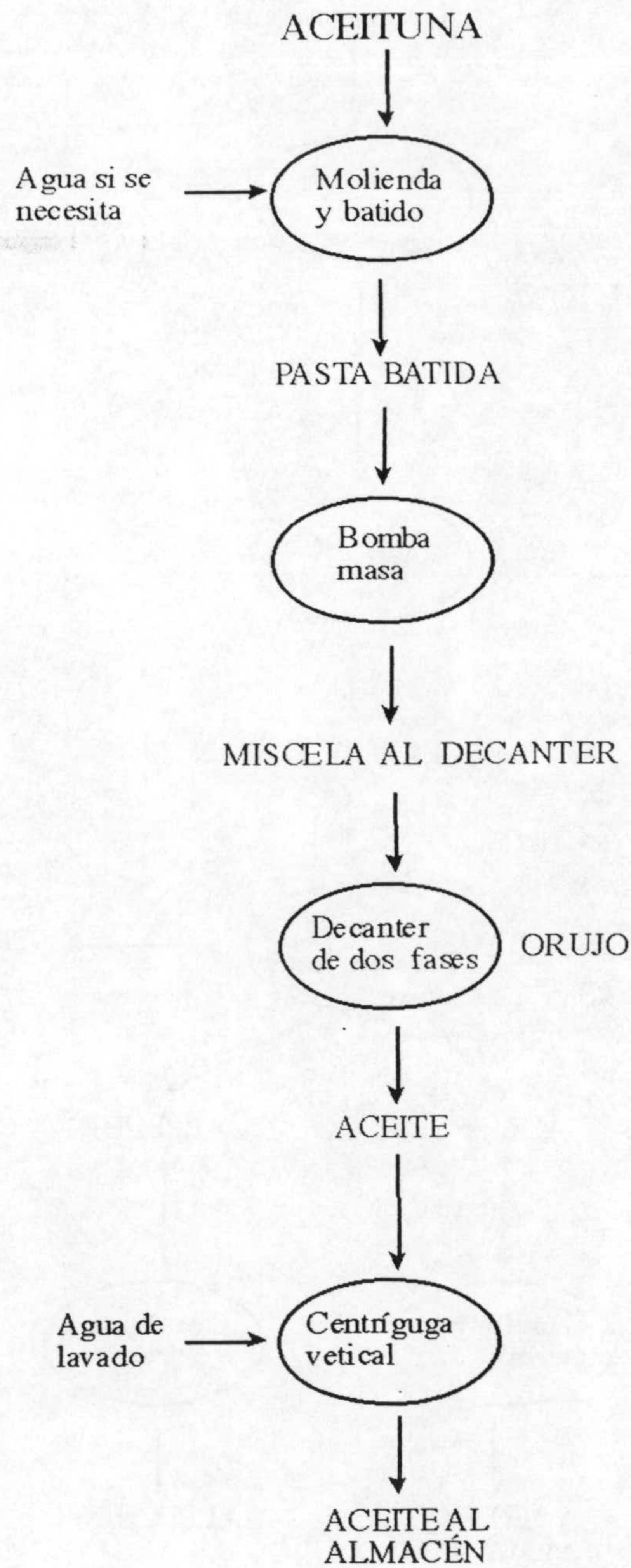
continuo de dos fases (Esquema I.1.3). El fundamento es similar al sistema continuo de tres fases, solo que en esta ocasión no se utiliza tanta agua de lavado del aceite de oliva, por lo que el consumo de agua es menor. Como su nombre indica en este sistema se obtienen sólo dos fases, una oleosa que al igual que en los casos anteriores es el aceite, y otra fase sólida, con un elevado contenido en agua que se denomina “alpeorujo” y que está constituida por los clásicos orujo y alpechín de un sistema continuo de tres fases. En este sistema se obtiene del orden de un 35-40% menos de volumen de aguas residuales, aunque el aceite de oliva que se obtiene tiene un 30% más de contenido polifenólico, mejorando así las características antioxidativas del mismo (Angerosa y col., 1996).



Esquema I.1.1. Esquema de un sistema de producción de aceite de oliva tradicional o de prensado (Martínez-Nieto y col., 1994)



Esquema I.1.2. Esquema de un sistema de producción de aceite de oliva continuo de tres fases (Martínez-Nieto y *col.*, 1994)



Esquema I.1.3. Esquema de un sistema de producción de aceite de oliva continuo de dos fases (Martínez Nieto y *col.*, 1994).

Por el procedimiento clásico 1 kg de aceituna da lugar aproximadamente a 0,5 litros de alpechín y por centrifugación se alcanzan valores de 1 litro de alpechín por kg de aceituna molturada o superiores (Martínez-Nieto y *col.*, 1994).

No obstante sea cual sea el sistema de obtención de aceite de oliva que se utilice siempre se va a obtener un residuo más o menos concentrado y con una composición química similar, que va a constituir un importante problema de contaminación medio ambiental debido a sus características físico-químicas (Hamdi, 1993).

I.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS DIFERENTES AGUAS RESIDUALES OBTENIDAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

El volumen de alpechín producido por una almazara depende del sistema de obtención de aceite de oliva utilizado. Así, en los sistemas tradicionales donde el empleo de agua es mínimo se obtienen del orden de 0,5 a 0,6 litros por kilogramo de aceituna molturada mientras que en un sistema en continuo de tres fases en el que se utiliza mayor volumen de agua tanto en el proceso de molturación como de lavado del aceite, se obtiene del orden de 1 litro de alpechín por kilogramo de aceituna molturada, por tanto, las aguas residuales tienen una concentración en materias contaminantes que es la mitad aproximadamente que las obtenidas en un sistema de prensado. No obstante, la carga orgánica contaminante producida en el proceso es prácticamente independiente del método utilizado. Se estima que la producción anual de alpechín es alrededor de $1 \times 10^7 \text{ m}^3$ (Fiestas Ros de Ursinos y col., 1992). En el sistema en continuo de dos fases, el agua residual que se produce es 10 veces menor que la que se produce en el sistema de tres fases, sin embargo presenta problemas de tratamiento debido a la excesiva humedad y elevada concentración de productos que confieren DQO al alpechín. Este nuevo residuo también presenta problemas de re-extracción de aceites ya que previo a ello es necesario su secado que se ve complicada por la presencia de los azúcares, que se caramelizan y recubren las partículas de orujo a extraer dificultando la penetración del disolvente y disminuyendo el rendimiento extractivo. Además debido a sus características físicas, algo viscoso su almacenamiento y transporte también se ven dificultados (Benitez y col., 1997; Martínez-Nieto y col., 1994). En la tabla I.1.3 se presentan las características respecto a su poder contaminante de un alpechín producido en una almazara clásica y en una almazara continua de tres fases.

Tabla I.1.3. Características de alpechín respecto a su poder contaminante

Parámetro	Almazara clásica	Almazara continua
pH	4,5-5	4,7-5,2
DQO	120-130 g/l	45-60 g/l
DBO	90-100 g/l	35-48 g/l
Sólidos en suspensión	1 g/l	9 g/l
Sólidos totales	120 g/l	60 g/l
Sólidos minerales	15 g/l	5 g/l
Sólidos volátiles	105 g/l	55 g/l
Grasas	0,5-1,0 g/l	3-10 g/l

En la tabla I.1.4 se presentan las características de las aguas residuales producidas por un sistema de prensado y un sistema continuo (Martínez Nieto y *col.*, 1994). Y en la tabla I.1.5 se muestra la composición grosera de la materia orgánica del alpechín de un sistema de prensado y de un sistema continuo (Martínez Nieto y *col.*, 1994).

Tabla I.1.4. Composición media de alpechín, según el sistema empleado para la extracción de aceite.

Parámetro	Almazara sistema clásico	Almazara sistema continuo
pH	4,5-5	4,7-5,2
Sustancia seca a 105°C	12%	4%
Sustancia orgánica	10,5%	3,5%
Sustancia mineral	1,5%	0,5%
D.B.O. ₅	90-100000 ppm	30-40000 ppm

Tabla I.1.5. Composición media de la sustancia orgánica

	Almazara clásica %	Almazara continua %
Azúcares totales	2-8	0,5-2,6
Sustancias nitrogenadas	0,5-2	0,17-0,4
Ácidos orgánicos	0,5-1	0,2-0,4
Polialcoholes	1-1,5	0,3-0,5
Pectinas, mucílagos, taninos	1-1,5	0,2-0,5

Polifenoles	1-2,4	0,3-0,8
Grasas	0,03-1,0	0,5-2,3

La composición de alpechín no está estudiada a fondo y depende de múltiples factores, pero contiene aproximadamente un 90% de agua, un 7-15% de sustancia orgánica y un 1-2% de sustancias minerales, como ya se mostró en la Tabla I.1.1 (Janer del Valle y *col.*, 1997).

Entre los compuestos orgánicos identificados en el alpechín se encuentran azúcares como: la rafinosa, manosa, sacarosa, glucosa, arabinosa y xilosa. En cuanto a los aminoácidos se han aislado 19 de ellos, siendo los más abundantes el ácido aspártico, ácido glutámico, prolina y glicina. Así se han descrito valores de ácido glutámico y prolina en el residuo seco del orden de 6 g/kg y 5 g/kg, respectivamente, hasta la histidina que se encuentra en baja cantidad 0,3g/kg (Hamdi, 1993; Ielmini y *col.*, 1976; Janer del Valle, 1980). Entre los ácidos orgánicos (no fenólicos) descritos en el alpechín se encuentran el acético, cítrico, fumárico, glicérico, hexánico, láctico, málico, malónico, múscico, oxálico, succínico, tartárico y tricarbálico (Martínez y *col.*, 1986) (Vázquez-Roncero y *col.*, 1974).

De las sustancias minerales el 20% son insolubles en agua mientras que un 80% son solubles en agua. El análisis de la fracción mineral de alpechín reveló la presencia de ácido fosfórico, azufre (SO_3^- y SO_4^-), CaO, cloruro de potasio, sales de cobre, P_2O_5^- , FeO, K_2O , Na_2O , zinc, carbonato potásico, carbonato sódico y óxido de silicio (Martínez y *col.* 1986; Vazquez-Roncero y *col.*, 1974).

I.1.3. EFECTO FITOTÓXICO Y ANTIMICROBIANO DEL ALPECHÍN

Los fenoles y sus derivados han sido utilizados desde hace alrededor de 100 años como antisépticos. Se pueden hacer varios grupos; los que se utilizan en alimentos como los ésteres metilo, propilo y heptilo del ácido *p*-hidroxibenzoico; derivados fenólicos entre los cuales se encuentran alquil, hidroxí- y metoxifenoles, así como polifenoles complejos algunos de los cuales se utilizan como aditivos en los alimentos por su efectividad antimicrobiana (Davidson y *col.*, 1981).

En la actualidad sólo tres compuestos fenólicos están permitidos para su adición directa a los alimentos, estos son el metil, propil y heptil ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico. Los ácidos *p*-hidroxibenzoicos como muchos otros compuestos fenólicos son más efectivos contra bacterias gram-positivas y mohos que contra bacterias gram-negativas.

Hay que hacer hincapié en las propiedades antimicrobianas de los compuestos presentes en el alpechín, aunque esta actividad es más debido a la mezcla de compuestos fenólicos que contiene que a uno sólo de ellos. Además, la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos de *Olea europaea*, tanto en hojas, fruto y aceite, se conocen desde hace mucho tiempo (Borja Padilla y col., 1990), (Capasso y col., 1992).

Las aceitunas así como el alpechín contienen un compuesto fenólico, el glicósido oleuropeina, que tiene una importante actividad antimicrobiana, es un inhibidor potente de ciertas bacterias del ácido láctico así como de otros microorganismos e incluso hongos, aunque su efecto depende directamente de su concentración. Entre los microorganismos cuyo crecimiento se inhibe por la oleuropeina están: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* (Burnett y col., 1931; Capretti, 1948; Capretti y col., 1949; De Nunno, 1947; Fleming y col. 1967).

Hay que destacar que *Lactobacillus plantarum* puede hidrolizar la oleuropeina via producción de β -glucosidasa al aglicano y otros compuestos más simples, como el β -3,4-dihidroxifeniletanol (Ciopardini y col., 1994). El aglicano formado por hidrólisis de la oleuropeina es más tóxico que el producto de partida, este aglicano puede ser degradado hasta ácido elenólico, un compuesto que también tiene actividad antibacteriana. Algunos productos de hidrólisis de la oleuropeina son el β -3,4-dihidroxifeniletanol, ácido elenólico y su aglicano (Fleming y col., 1969; Rodriguez y col., 1988; Ruiz-Barba y col., 1993; Walter y col., 1973). Otros compuestos con actividad antibiótica presentes en el alpechín son el β -hidroxifeniletanol, 3,4-dihidroxifeniletanol, y en menor medida el catecol, ácido cafeico y ácido protocatéquico (Bernard Le Tutour y col., 1992; Fleming y col., 1969; Fleming y col., 1973; Federici y col., 1983; Garrido-Fernández y col., 1978; Juven y col., 1968; Renis, 1969; Servili y col., 1989; Yu y col., 1990).

El contenido de oleuropeina varía con el tipo de aceituna y el grado de madurez del fruto. La cantidad de oleuropeina descende en el alpechín debido a los

procesos de hidrólisis que sufre durante el proceso de obtención del aceite de oliva y por su propia naturaleza y contenido enzimático de las aceitunas (Fleming y *col.*, 1973).

1.1.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN

Se pueden considerar tres mecanismos generales para la actividad antimicrobiana: a) reacción con la membrana celular para causar un aumento de la permeabilidad con el resultado de la pérdida de los constituyentes celulares; b) inactivación de enzimas esenciales; c) destrucción o inactivación funcional de material genético.

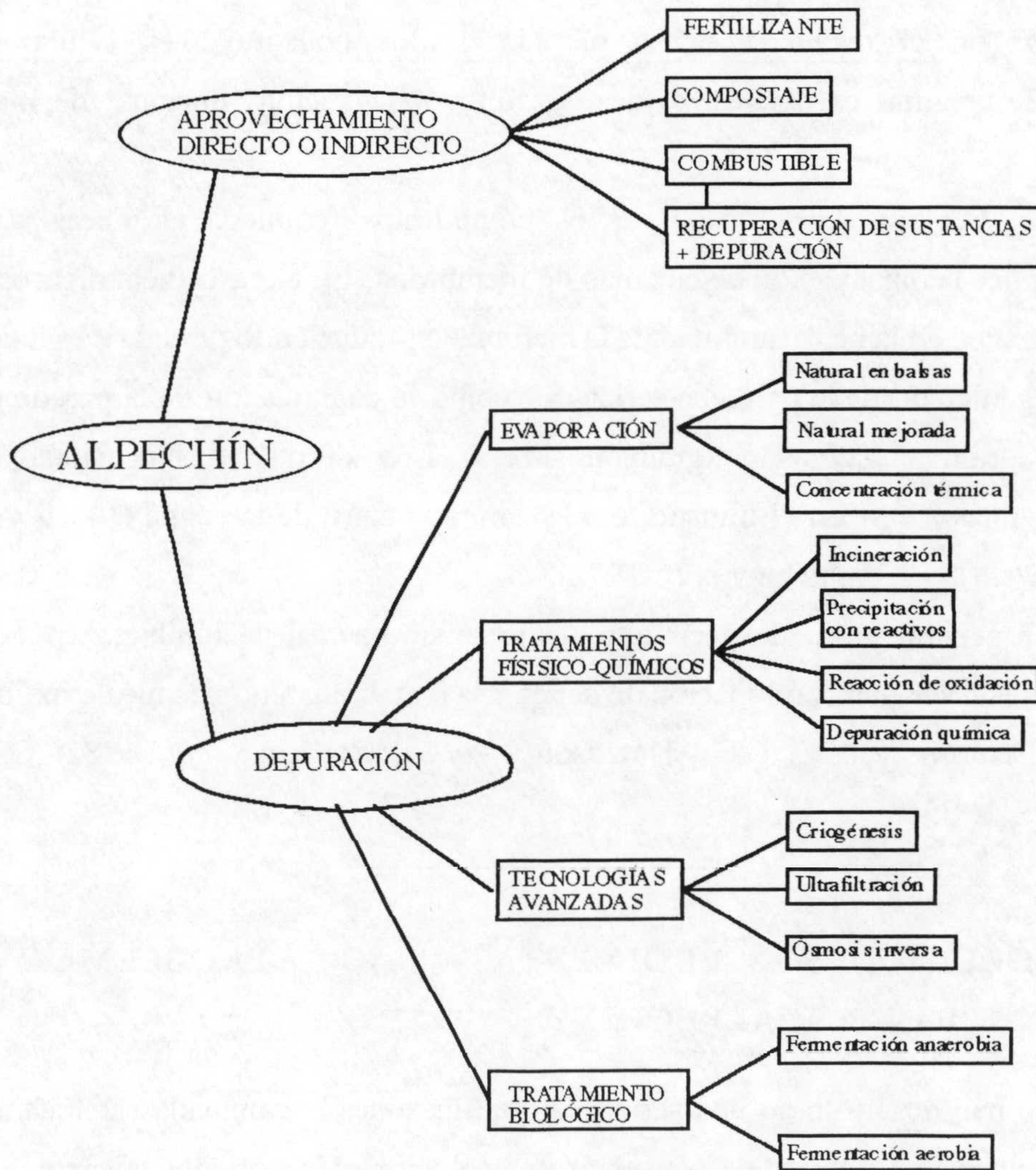
Se cree que en el caso de los compuestos fenólicos el mecanismo de inhibición implica la inactivación de enzimas de membrana. En el caso de la oleuropeina, ésta causó cambios en la permeabilidad de la membrana produciendo pérdida de glutamato y fosfato inorgánico desde la pared bacteriana así como la degradación de la pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas. Los derivados hidroxilados con sustituciones en *para* inhiben el transporte de sustratos dentro de la célula (Juven y *col.*, 1968; Juven y *col.*, 1970; Juven y *col.*, 1972).

En general se puede decir que el mecanismo actual de inhibición por estos compuestos puede ser una combinación de daños a la membrana citoplásmica e inhibición de enzimas (Beltrame y *col.*, 1984; Davidson y *col.*, 1981; Liu y *col.*, 1982; Oikawa Setsuko y *col.*, 1985).

1.1.5. SOLUCIONES PROPUESTAS AL PROBLEMA DE CONTAMINACIÓN POR ALPECHÍN

Se han desarrollado una serie de investigaciones encaminadas al tratamiento de este contaminante con objeto de conseguir una solución más o menos eficaz para este gran problema de contaminación medio ambiental (Fiestas Ros. y *col.*, 1992; Hamdi, 1993; Janer del Valle, 1980; Martínez y *col.*, 1986). No obstante hasta el momento no se ha encontrado ninguna solución realmente eficaz desde el punto de vista económico y medio ambiental (Martínez Nieto y *col.*, 1994; Moreno y *col.*, 1987). El tratamiento de alpechín es muy difícil por sus características físicas y su contenido químico. La

investigación desarrollada se ha centrado en dos aspectos fundamentalmente, por un lado en el aprovechamiento del alpechín y por otro en su tratamiento o depuración. En el esquema siguiente se presenta un resumen de los métodos encaminados a solucionar en mayor o menor medida el problema de contaminación por alpechín (Martínez Nieto y *col.*, 1994).



Esquema I.1.4. Esquema de los diferentes métodos de depuración y/o aprovechamiento del alpechín.

A continuación se comentan algunas de estas soluciones, con énfasis en su posible aprovechamiento y reciclaje.

1) Como fertilizante para riego de olivos e incluso de otro tipo de cultivos como maíz y trigo. Para ello se utiliza un alpechín diluido, a veces neutralizado (Saiz-Jiménez y *col.*, 1987). La mezcla de riego se conduce a través de un canal que distribuye agua a través de un sistema de ramificaciones. La aplicación de alpechín como fertilizante está basado en que contiene porciones aprovechables de nutrientes minerales que pueden sustituir o disminuir el abonado mineral (Tabla I.1.6).

Tabla I.1.6. Composición del alpechín desde el punto de vista de su aplicación como fertilizante.

	Sistema clásico kg/m ³	Sistema continuo kg/m ³
Sustancia orgánica	105,00	26,00
N	2,00	0,60
P	0,50	0,10
K	3,60	1,20
Mg	0,20	0,04

Se puede decir que el alpechín es rico en potasio y tiene una elevada cantidad de nitrógeno, fósforo y magnesio (Martínez-Nieto y *col.*, 1994). Sin embargo, las características físico-químicas de un suelo después de ser tratado con alpechín se alteran ya que se compacta y endurece, lo que indica que el riego con estas aguas conduce a un perjuicio del suelo en cuanto a aireación y humidificación, por lo que reduce la capacidad del suelo para degradar residuos. Otro detrimento del suelo es un aumento de la conductividad, la cual parece ser irreversible. Esto está relacionado con la capacidad de intercambio iónico, el alto contenido en Na⁺, K⁺ y Mg²⁺ del alpechín da lugar a la sustitución del calcio del suelo conduciendo a la degradación de la estructura del mismo y la salinización de los mismos.

Es posible que el riego con alpechín dé lugar a efectos perjudiciales sobre ciertos grupos microbianos del suelo e incluso sobre microorganismos con capacidad de degradar los compuestos presentes en el alpechín. Las bacterias formadoras de esporas juegan un papel importante en el ciclo de la materia orgánica en la naturaleza por su capacidad para degradar moléculas orgánicas complejas. Estos residuos causan una reducción en el número de bacterias formadoras de esporas, por lo que la contaminación

del suelo por alpechín afecta a su eficiencia (Paredes y col., 1987). El alpechín presenta una actividad fitotóxica sobre el poder germinativo de las plantas (Martínez-Nieto y col., 1994), (Paredes y col., 1986; Paredes y col., 1986). Se puede decir, en general, que su aplicación en la agricultura no es aconsejable (Martínez y col., 1986).

2) Como pienso para el ganado, bien sólo diluido o mezclado con otros residuos agrícolas o estiércol. Tras un proceso de evaporación el residuo seco de alpechín tienen una composición de proteína bruta del 6% siendo el contenido en lípidos del 1%; en fibra del 0,1%; en ceniza del 10,7%; en sustancias no nitrogenadas del 82%; en potasio del 5,9%; en calcio del 0,4%; en fósforo del 0,5%; y pH, 5,1. Por otro lado a partir del alpechín se puede obtener levadura para pienso rica en proteínas y vitaminas, solo hay que añadirle para el crecimiento de la levadura sulfato amónico 0,13 g/g de azúcar. El agua residual que deja tiene una D.B.O. inferior al 89% que aquella en alpechín original (Janer del Valle, 1980). También se puede utilizar como parte de la dieta de la lombriz roja californiana (*Lumbricus rubellus*) (Martínez-Gordo, 1993), ésta es una lombriz que consume materia orgánica, en su intestino la densidad de bacterias es 10 veces superior a la que existe en el suelo, sus excretas son ricas en hongos, actinomicetos y bacterias de ácido butírico (del tipo *Clostridium*). Sus excretas también son ricas en enzimas, tales como proteasas, amilasas, lipasas, celulasas y quitinasas, las cuales continúan la desintegración de la materia orgánica, fracturación parcial del suelo al ingerirlo.

3) Elaboración de compost junto con otros residuos sólidos agrícolas, forestales o urbanos. La misión de éste sería el aporte de sustancias fácilmente fermentables que aumentarían el desarrollo de microorganismos durante el compostaje, el proceso se ha descrito para alpechín mezclado con orujos desgrasados (Papadimitriou y col., 1997).

4) A partir del alpechín se pueden obtener sustancias útiles como por ejemplo:

- sustancias de acción antibiótica con una cierta eficacia contra gérmenes gram positivos y gram negativos (Janer del Valle, 1980).
- sustancias con poder repelente frente a la mosca del olivo (*Dacus oleae*) (Janer del Valle, 1980).
- empleo de algunos polifenoles del alpechín como antioxidantes para grasas y aceites (Janer del Valle, 1980).
- utilizar el alpechín como sustrato para obtener productos de fermentación (Janer del Valle, 1980).

- producción de proteína celular utilizando levaduras como *Saccharomyces* y *Candida* para alimentación animal, el problema es que los compuestos fenólicos se fijan sobre las levaduras, es necesario eliminar esta contaminación además de la producida por pectinas, taninos y polifenoles. También se utilizan hongos como *Aspergillus* sp. y *Geotricum candidum* que producen una biomasa con una alta digestibilidad y con un contenido en proteínas por encima del 30% que es potencialmente utilizable para la alimentación de rumiantes (Hamdi, 1993).
- producción de enzimas pectolíticas (Hamdi, 1993).

Respecto a los tratamientos encaminados a la depuración o descontaminación de este residuo han sido varios a lo largo del tiempo, algunos de ellos son:

1) Tradicionalmente el alpechín se vertía a los ríos siendo fácil su detección, ya que estos adquirirían un color negro oscuro característico, así como un olor penetrante. El problema se agravaba cuando coincidía con un período de sequía considerable con el consiguiente descenso en el caudal de los ríos y como consecuencia de ello la capacidad de depuración de éstos se sobrepasó. Además cada vez son más los nuevos vertidos industriales de aguas residuales no depuradas. Esto hizo que se aplicaran medidas restrictivas para prohibir el vertido de alpechín a los ríos.

La legislación española prohíbe el vertido de alpechín en ríos, lagos u otras aguas continentales, estableciendo multas de hasta 50 millones de pesetas para aquellos que incumplan la normativa. La solución adoptada mayoritariamente es la de establecer balsas de evaporación. El gobierno dio un 100% de subsidios a los olivareros para construir balsas de almacenamiento y evaporación natural de alpechín, aunque no para la adquisición de tierras apropiadas. La introducción de este sistema de evaporación supuso una marcada mejora para la calidad de los ríos.

Las balsas de evaporación se desarrollaron con objeto de almacenar de manera progresiva los alpechines y conseguir su evaporación en el período de tiempo existente entre dos campañas. Sin embargo, presentan algunos problemas. Debido a la sustitución del clásico sistema de prensado por el sistema continuo se produjeron vertidos debido, principalmente a su capacidad insuficiente. Además producen mal olor, probablemente debido a que la mayoría de ellas son demasiado profundas y es probable que en el fondo ocurran un número elevado de fermentaciones, en muchos casos las balsas de

evaporación no se han situado en los lugares apropiados y las corrientes de aire arrastran los olores a los pueblos y ciudades situados en sus proximidades, en la mayoría de los casos no se han realizado estudios hidrogeológicos de manera que ocurren filtraciones a aguas subterráneas, el excedente de alpechín no evaporado se sitúa alrededor de 4×10^5 m³ por año, los cuáles pueden llegar a ser de hasta 10^6 m³ en años de excelente cosecha, produciéndose el rebosamiento de estas balsas. Solo resultan útiles para pequeñas almazaras aisladas. Por otra parte implican la necesidad de disponer de terrenos próximos a las almazaras para evitar el transporte. Las balsas se construyen con 0,5-1,5 m de profundidad para conseguir la evaporación total antes del verano. El residuo seco resultante se recoge con palas excavadoras y se puede utilizar como fertilizante, ya que puede llegar a tener hasta el 5-10% de K₂O y entre el 1-2,5% de P₂O₆, o bien se quema. También se les puede agregar residuos agrícolas o forestales para la obtención de compost. De cualquier forma parece que el terreno queda inservible por impermeable y salino a no ser que se utilicen plásticos de recubrimiento (Martínez-Nieto y *col.*, 1994).

2) Evaporación natural mejorada. Vertido sobre la tierra para su evaporación y percolación por aspersión o por surcos, teniendo cuidado de evitar la contaminación de las aguas subterráneas (Janer del Valle, 1980). La percolación precisa un estudio profundo del suelo y del vertido con objeto de no sobrepasar la capacidad degradadora del mismo. El suelo se deja en recuperación durante un período de tiempo similar al de contaminación, puede apreciarse cierto grado de recuperación de las características primitivas (Martínez y *col.*, 1986).

Otra manera de mejorar la evaporación es aumentando la capacidad de evaporación de las balsas, mediante el uso de unos paneles donde el alpechín es esparcido y al exponerse a la acción del viento presentan una capacidad de evaporación 40 veces mayor que la de una balsa de la misma área de superficie o bien por instalación de unas hidrobombas que flotan por la superficie de la balsa y van esparciendo el alpechín sobre la superficie de la balsa aumentando el área superficial del alpechín para ser evaporado (Fiestas Ros de Ursinos y *col.*, 1992).

3) Concentración térmica o evaporación, consistente en la eliminación de parte del agua, utilizando evaporadores o concentradores de múltiple efecto, para evitar elevados consumos energéticos. La aplicación de este proceso disminuye en un 70-75% el volumen de este agua residual y permite la obtención de un concentrado de alpechín que puede tener aplicación para su adición a los piensos por su valor alimenticio, o bien como

fertilizantes en agricultura o, incluso, previa investigación correspondiente, como medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos de posible interés químico-farmacéutico. No obstante el agua procedente de la condensación de los vapores contiene la mayor parte de los componentes volátiles del alpechín, así como pequeñas cantidades de éste por arrastre o proyecciones. Esto hace que dicha agua requiera un proceso posterior de depuración para su vertido o posible utilización en la propia almazara. Puede ser un proceso biológico aeróbico con el que se puede eliminar hasta un 80% de la materia orgánica en 3 días de fermentación o anaerobio, o bien, un proceso físico por ósmosis inversa. (Borja-Padilla y *col.*, 1991), (Borja-Padilla y *col.*, 1991).

4) Incineración en una torre en la que se alcanzan los 1000°C. En primer lugar se obtiene una evaporación del agua y posteriormente la combustión de la sustancia orgánica presente. Tiene un elevado costo. Una opción para abaratar el sistema sería utilizar orujo como combustible (Janer del Valle, 1980).

5) Depuración por precipitación de alpechín con reactivos como el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y polielectrolitos diversos alcanzándose depuraciones del orden de 60-70% de la DQO. Se produce un precipitado que "arrastra" a los compuestos orgánicos disueltos y en suspensión con lo que se obtiene una clarificación y depuración del alpechín. El agua residual, acondicionada de pH adecuado puede tratarse posteriormente con carbón activo, ultrafiltración u ósmosis inversa para terminar su tratamiento. Como inconveniente se aduce el consumo de reactivos y el aumento de fangos que se forman en el proceso (aproximadamente el 20% del alpechín tratado) de difícil salida comercial (Martínez-Nieto y *col.*, 1994). Otra posibilidad es la precipitación con óxido de calcio, sales de hierro y aluminio que arrastran bastante sustancia orgánica al precipitar los hidróxidos que tienen una gran capacidad de absorción. Es poco efectivo y deja grandes cantidades de fangos que son necesarios eliminar igualmente (Janer del Valle, 1980).

6) Depuración química, que consiste en pasar el alpechín por una columna de cloración que tiene la propiedad de oxidar, ya sea la sustancia orgánica en suspensión ya sea la que está en estado coloidal (Janer del Valle, 1980). También se han descrito procesos de oxidación utilizando diferentes reactivos como cloro, una desventaja adicional de este tratamiento es la formación de derivados organoclorados de alto poder contaminante (Benítez y *col.*, 1993). También es muy frecuente el tratamiento con ozono con objeto de disminuir los niveles de compuestos tóxicos e inhibidores presentes en el alpechín. Se ha ensayado con éxito en el caso de los ácidos cafeico (3,4-

dihidroxicinámico), *p*-cumárico (*trans*-4-hidroxicinámico), siríngico (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), *p*-hidroxibenzoico y protocatecuato (3,4-dihidroxibenzoico) (Benitez y col., 1993; Benítez y col., 1997; Bondioli y col., 1992; Mantzavinos Dionissios y col., 1996; Yamamoto Yorihiro y col., 1979). También se ha estudiado un tratamiento de las aguas de vegetación con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Martínez y col., 1986; Wlassics y col., 1992).

7) Criogénesis, se enfría el alpechín en una columna criogénica, en el seno del mismo se forman cristales de agua que se separan en forma de hielo de las sustancias en suspensión y disueltas. Se obtiene así agua al fundirse el hielo y un concentrado de aplicación general igual que en los casos anteriores para abono o alimentación de ganado. El inconveniente es el consumo de agua de lavado de los cristales, que siempre arrastran sales de la disolución en donde se han formado (Martínez-Nieto y col., 1994).

8) Depuración de alpechín mediante ultrafiltración a través de membranas de acetato de celulosa de diferente porosidad acoplada a otros métodos de depuración (biológica, ósmosis inversa, destilación, etc...) (Janer del Valle, 1980). Puede separar compuestos de pesos moleculares entre 1000 y 100000 y que pueden corresponder a microorganismos, polialcoholes, polifenoles y colorantes (Martínez-Nieto y col., 1994).

9) Depuración por ósmosis inversa (Janer del Valle, 1980). Separan las sustancias disueltas en función del tamaño de sus partículas o moléculas, empleando membranas porosas de diámetros diferentes. Estas técnicas difieren de las técnicas de separación convencionales como la filtración, decantación y centrifugación en que la separación se lleva a cabo entre sustancias que forman una sola fase aparente, es decir en solución. Separa compuestos cuyos pesos moleculares oscilan entre 100 y 1000 como pueden ser ácidos volátiles, alcoholes, sustancias aromáticas y sales minerales del agua (Martínez-Nieto y col., 1994).

10) Depuración biológica. Ésta depende de una serie de factores entre ellos el pH, y ausencia de sustancias tóxicas para los microorganismos y poder contaminante no superior a ciertos valores. Puede ser un proceso aerobio o anaerobio, o bien, una combinación de ambos (Janer del Valle, 1980; Martínez-Nieto y col., 1992; Ranalli, 1992). Como ya se ha mencionado el alpechín contiene altas proporciones de compuestos fenólicos, los cuales se caracterizan por su gran efecto antimicrobiano (Moreno y col., 1987; Martínez y col., 1986) y esto obstaculiza en gran medida el tratamiento biológico de este residuo (Rodríguez y col., 1988).

El tratamiento aeróbico consiste en la eliminación de los compuestos orgánicos disueltos o en suspensión, bajo ciertas condiciones, por los microorganismos naturales o seleccionados que transforman, en presencia de oxígeno, dichos compuestos en anhídrido carbónico, agua y materiales celulares biológicamente estables. Existen microorganismos aeróbicos capaces de crecer en alpechín (Benitez. y *col.*, 1997; Martínez-Nieto y *col.*, 1992; Scioli-Custode y *col.*, 1997). Se puede conseguir una reducción del poder de contaminación del 62% y una biomasa final de buena digestibilidad.

Con el tratamiento anaeróbico la ruptura de las moléculas orgánicas se efectúa, generalmente, por una reacción enzimático-hidrolítica seguida de reacciones de oxidación-reducción. Las fermentaciones que generalmente se producen en las alpechineras de las almazaras son de este tipo, ya que la casi totalidad del alpechín está fuera del contacto del aire. Los productos resultantes de las primeras transformaciones son utilizados posteriormente por otras bacterias que las transforman en metano. En el proceso anaerobio se puede conseguir una reducción del contenido fenólico de hasta un 73%, así como una reducción de un 75% de ácidos grasos volátiles dependiendo del tipo de reactor utilizado (Dalis y *col.*, 1996). El tratamiento anaeróbico se ve influenciado por el pH entre otros factores (Borja-Adrilla y *col.*, 1991). La fermentación anaerobia presenta una serie de ventajas sobre la aeróbica como que las necesidades energéticas son menores, las bacterias anaerobias transforman la materia orgánica en gas metano, los lodos formados sólo suponen un 10% de la demanda química de oxígeno (DQO) y menor requerimiento de nutrientes.

No obstante la digestión anaeróbica al igual que ocurre con el proceso aerobio está dificultada por la elevada toxicidad que presenta este contaminante, y la fuerte actividad inhibidora de algunos de los compuestos fenólicos. Por ello, es de gran interés un tratamiento previo a la biometanización, con el que se consiga eliminar en su mayor parte los compuestos fenólicos, responsables de su poder inhibidor, con objeto de que el proceso de fermentación anaerobia se lleve a cabo a velocidades mucho mayores y con tiempos de residencia en el reactor más pequeños. Entre los tratamientos previos al anaerobio está el someter el alpechín a un tratamiento aerobio inicial entre otros (Borja-Adrilla y *col.*, 1991; Hamdi y *col.*, 1992). Dada la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos anaerobios se han desarrollado diversas tecnologías para su inmovilización en el seno de los bioreactores, con el fin de evitar su pérdida en los

efluentes y con ello una posible disminución de la velocidad del proceso y mejorar el tratamiento anaerobio (Borja Padilla, R. y *col.*, 1990; Borja Padilla y *col.*, 1990).

Normalmente se obtienen mejores resultados con una combinación de los dos procesos aerobio y anaerobio o viceversa (Borja-Padilla y *col.*, 1990; Borja-Padilla y *col.*, 1991; Borja-Padilla y *col.*, 1992; Borja-Padilla y *col.*, 1992; Borja-Padilla y *col.*, 1992; Hamdi y *col.*, 1992; Maestro-Durán y *col.*, 1991).

También se puede llevar a cabo un pretratamiento con oxidantes antes de un tratamiento biológico en general, puesto que pueden existir compuestos orgánicos que no sean fáciles de tratar biológicamente. Esto ha conducido al desarrollo de varios procesos de oxidación alternativos desde oxidación húmeda catalítica, ozonólisis e irradiación con U.V. Sin embargo, estos son frecuentemente más caros que los tratamientos biológicos (Mantzavinos-Dionissios y *col.*, 1996; Martínez-Nieto y *col.*, 1994).

I.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

De todas las soluciones propuestas al problema de contaminación producido por las aguas residuales que se obtienen en el proceso de extracción del aceite de oliva la alternativa más adecuada parece ser el tratamiento biológico, por ser más económico y no presentar riesgo alguno ni para el medio ambiente o los seres vivos. No obstante, para que un tratamiento biológico sea eficaz es necesario seguir una serie de etapas y una de las primeras es la caracterización química del contaminante en cuestión con objeto de conocer la naturaleza de los compuestos químicos que debemos tratar (Martínez-Nieto y *col.*, 1992).

I.2.1. ANÁLISIS QUÍMICO DEL ALPECHÍN

En la bibliografía hay un estudio bastante amplio de la composición química del alpechín, aunque no se puede considerar suficientemente completo debido a que en la mayoría de los casos la identificación de los compuestos presentes en el mismo se ha llevado a cabo por comparación con soluciones patrón mediante técnicas cromatográficas, y este procedimiento no se considera que garantice la identificación de todos los compuestos químicos (Vázquez-Roncero y *col.*, 1974; Martínez-Nieto y *col.*, 1992).

El alpechín se ha estudiado tras extracción fraccionada siendo el extracto de acetato de etilo, en el que se encuentran los compuestos más polares y la mayoría de compuestos fenólicos, los más estudiados. El tipo de compuestos en el que se ha centrado la caracterización química de este residuo han sido aromáticos polifenólicos que son los que confieren al alpechín su poder contaminante (Martínez y *col.*, 1986).

El alpechín contiene ácidos hidroxicinámicos (cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico), que se encuentran en la mayoría de las plantas como ácidos conjugados solubles, frecuentemente como *o*-ésteres incluyendo los muy extendidos 1-*o*-acil glucósidos. Así por ejemplo el ácido cafeico libre no existe en la pulpa de la aceituna, pero sí en el alpechín debido a procesos de hidrólisis ocurridos durante la obtención de éste. Otro posible origen de los ácidos fenólicos (verátrico, vanílico, y sirínico) es a partir de la lignina de las semillas de las (Martínez-Nieto y *col.*, 1992). Así los fenoles existentes en el alpechín proceden de los glucósidos fenólicos de la pulpa y de la semilla de la aceituna.

En el proceso de obtención del aceite de oliva principalmente durante la molienda y el batido y mediante el proceso de prensado que sufren las semillas, se producen hidrólisis químicas debido a la acidez y las enzimas hidrolíticas que quedan en contacto íntimo con sus sustratos, análogamente, la polifenoloxidasas, muy abundante en la pulpa, oxida y polimeriza parte de los polifenoles presentes, especialmente los ortodifenoles. Se ha comprobado que los polifenoles, componentes mayoritarios de la pulpa, descienden considerablemente en el alpechín. La cantidad de polifenoles presentes en un alpechín depende en gran medida del procedimiento seguido en la obtención del aceite (Maestro-Durán y *col.*, 1991).

Las aceitunas antes de su consumo deben ser tratadas, el proceso más usual es una serie de tratamientos consecutivos con soluciones de NaOH. Tras este tratamiento alcalino los componentes del alpechín sufren unas transformaciones, en el caso de la oleuropeína su proporción disminuye debido a que sufre una hidrólisis y uno de sus componentes, el hidroxitirosol aumenta (Brenes y *col.*, 1992).

Se sabe que los componentes presentes en el alpechín y que dan a este una fuerte actividad antibiótica pueden variar con el tiempo; sin embargo, a pesar de ello la actividad antibiótica se puede detectar en alpechín almacenado durante cinco años, si bien se ha encontrado que la oleuropeína es el glucósido antibacteriano por excelencia de la aceituna (Fleming y *col.*, 1969; Vázquez-Roncero y *col.*, 1974). Durante el

almacenamiento también es posible que se dé la hidrólisis parcial de verbascoside dando ácido cafeico y otros *o*-difenoles. Otros compuestos también identificados que sufren cambios similares son luteolin 7-glucosido, éste sufre hidrólisis en condiciones ácidas (Brenes y col., 1992).

A continuación se relacionan los derivados fenólicos descritos en la bibliografía como componentes del alpechín. Se pueden hacer dos grandes grupos. Dentro del grupo de los no flavonoides se ha descrito a) derivados del ácido cinámico: ácido cinámico, ácido cafeico, ácido *trans*-cafeico, ácido *cis*-cafeico, ácido dihidrocafeico. 1-cafeil glucosa, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido dihidroxicinámico; b) derivados del ácido benzoico: ácido protocatéquico, aldehído protocatéquico, catecol, ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, vainillol, ácido vainillínico, *p*-vainillina, ácido siríngico, siringaldehído, ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico. ácido verátrico, ácido 1,3,4-dihidroximandélico, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico; c) derivados del alcohol β -3,4-dihidroxifeniletanol: hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), tirosol, β -hidroxifeniletanol, *p*-hidroxitirosol *m*-glucósido, *p*-hidroxitirosol diglucósido, oleuropeina, esculetina, verbascoside, rutin, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico. ácido 2-hidroxicinámico, ácido *p*-hidroxicinámico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético. (Baruch-Shasha y col., 1961; Bourquelot y col., 1908; Brenes y col., 1992; Cruess y col., 1934; Fiestas Ros de Ursinos y col., 1992; Fleming y col., 1969; Giorgio-Bianchi y col., 1994; Juven y col., 1968; Maestro-Durán y col., 1991; Martínez-Nieto y col., 1992; Pérez y col., 1990; Rodríguez y col., 1988).

Y dentro del grupo de los flavonoides se han descrito: apigenina, cianidina. cianidin-3-monoglucósido, flavanona o flavanol, luteolina, luteolin 7-glucósido y quercetina (Brenes y col., 1992, Fiestas Ros de Ursinos y col., 1992; Maestro Durán y col., 1991; Martínez-Nieto, y col., 1992; Vázquez-Roncero y col., 1974).

La concentración de los compuestos fenólicos en el alpechín varía en función de la variedad de aceituna, condiciones climáticas y las condiciones de almacenamiento (Brenes y col., 1992).

La oleuropeina, verbascosido y el ácido cafeico son los mayoritarios *orto* difenoles del fruto de la aceituna, éstos juegan un papel muy importante en el oscurecimiento del fruto el cual es el resultado de complejas interacciones en las que está implicada la actividad difenol oxidasa, el contenido en oleuropeina y muchos otros

factores (Pascale-Goupy y *col.*, 1991). Las sustancias fenólicas presentes en la oliva y en el aceite de oliva podían tener interés nutricional y farmacológico Balice y *col.*, 1984; Brenes-Balbuen y *col.*, 1992; Capasso y *col.*, 1992; Giorgio-Bianchi y *col.*, 1994; Luigi-Panizzi y *col.*, 1960; Amiot y *col.*, 1989; Limiroli y *col.*, 1995).

I.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ACEITE DE OLIVA Y EN OTRAS PARTES DE LA PLANTA (*Olea europaea* Linn)

Las propiedades antioxidativas que presentan los compuestos fenólicos presentes en el alpechín son muy importantes de cara a la calidad del aceite de oliva producido. Si se hace un estudio de la composición fenólica del aceite de oliva, en especial de la fracción polar, existen compuestos fenólicos comunes al alpechín. La actividad antioxidativa está relacionada con el contenido total de polifenoles y *o*-difenoles presentes en el aceite. Algunos de estos compuestos son el tirosol, hidroxitirosol, derivados de los ácidos hidroxicinámicos (ácido cinámico, ácido cafeico) e hidroxibenzoico (ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido homovanílico, ácido siríngico, ácido gálico), ácido *p*-hidroxifenilacético y ácido protocatéquico (Akasbi y *col.*, 1993; Angerosa y *col.*, 1996; Evangelisti y *col.*, 1997; Tsimidou y *col.*, 1996). También se han encontrado glicósidos fenólicos como la oleuropeina y el ligstrosido (Angerosa y *col.*, 1996; Baldioli y *col.*, 1966; Biedermann y *col.*, 1995; Cinquanta y *col.*, 1997; Filippo y *col.*, 1997; Litridou y *col.*, 1997; Montedoro y *col.*, 1993; Morales y *col.*, 1997).

De la misma forma que hemos descrito compuestos comunes entre el alpechín y el aceite de oliva, como cabía esperar si tenemos en cuenta los constituyentes del alpechín, también se puede deducir que compuestos presentes en la hoja de esta planta (*Olea europaea* L.) son comunes al alpechín, sobre todo glicósidos fenólicos, y que además tienen importantes propiedades farmacológicas y terapéuticas. Uno de ellos es la oleuropeina. Otros compuestos fenólicos presentes en menor cantidad en la hoja de la oliva son la demetiloleuropeina, ligstroside, verbascoside, oleoside 7-metil éster, secoirideos no glucosídicos y oleuroside, un éster glucosídico de ácido elenólico, tirosol (4-hidroxifeniletanol), ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, hidroxitirosol han sido aislado en hojas y en diferentes especies de oleaceas (*Fraxinus*, *Ligustrum* y *Syringa*), otros compuestos también presentes son glicósidos flavonoides principalmente rutin, luteolin 7-glucósido, luteolin 7-rutinósido y luteolin 4'-glucósido y apigenina 7-rutinósido, (De

Nino y col., 1997; Gariboldi y col., 1986). Otro compuesto es el cornosido que también es hidrolizado por la β -glucosidasa para dar el aglicano y otro compuesto menos polar denominado rengiolano ó halleridone de pendiendo del autor (aunque aparece como una mezcla racémica de isómeros *trans*, el cual está en equilibrio con el cornosido (Bianco y col., 1993).

Otros compuestos aislados e identificados espectroscópicamente han sido los compuestos kaempferol, quercetin, esculetin (6,7-dihidroxicoumarin) y esculin (6- β -D-glucosil-7-hidroxicoumarin) (Amiot y col., 1989; Brenes y col., 1995; Sansei y col., 1981).

La oleuropeina oleosido 7-[2-(3,4-dihidroxifenil)etil]éster) también se ha encontrado en la corteza de *Olea europaea* L. (Oleaceae), y también en *O. europaea* L. subespecie *africana* (MILL.) GREEN (*O. africana* MILL.) y *O. capensis* L (Tsukamoto y col., 1985).

En bibliografía hay descrita la presencia de triterpenos en la cáscara, cera, hojas y cera de las hojas de *Olea europaea*. Entre otros se encuentran derivados de la familia de oleanano (Gil y col., 1997), como cabía esperar aparecen triterpenos de esta familia en las aguas residuales del proceso de obtención del aceite de oliva. En algunos casos se han encontrado triterpenoles del orden de un 8-30% y ácidos triterpénicos entre un 40-67%.

En la cera de las hojas de estos árboles también se han encontrado ácidos grasos, alcanos, aldehídos, alcoholes y triacilgliceroles así como alquil ésteres aunque el análisis por CG de este tipo de compuestos mostró la presencia de picos que correspondían a compuestos sin identificar, aunque parecía ser ésteres de triterpenos. También se encontraron metil fenil ésteres y 2-fenil-etanol-1-ésteres. También se encontraron triterpenoides que comprendía esterolés libres, triterpenoles pentacíclicos y ácidos triterpénicos. Los triterpenos en este caso se identificaron comparando con soluciones patrón mediante espectrometría de masas. Los triterpenos mayoritarios fueron los derivados del ácido olenólico y betulínico. Se puede decir que los principales componentes de la cera de la piel de las hojas de la oliva son los triterpenos pentacíclicos.

Hay pocos datos en bibliografía donde se encuentran los triterpenos como componentes mayoritarios de las hojas. Los triterpenoles y ácidos de triterpeno con esqueleto de amirenil son los principales componentes, parece ser que en las hojas se encuentra un mayor porcentaje de triterpenos que en el fruto. Dependiendo del tipo de

aceituna, hay ciertas diferencias respecto a la proporción de uno y otros compuestos triterpénicos (Bianchi y col., 1993).

Se ha encontrado en las hojas y cáscaras de la oliva (*Olea europaea*) tanto ácido maslínico como oleanólico en variables cantidades. La presencia del ácido maslínico sugiere que puede ser un metabolito de la planta, procedente de la α hidroxilación microbiana del ácido oleanólico ya que se produce durante el envejecimiento de las cáscaras de la oliva (Caputo y col., 1974; Patrizia y col., 1975).

Otros ácidos pentacíclicos triterpénicos se han encontrado en la piel de la aceituna. Los ácidos oleanólico y maslínico también se han encontrado en el hueso de las aceitunas frescas, aunque se considera que el ácido maslínico podría ser el fruto de una hidroxilación microbiana endógena del ácido oleanólico en el fruto. Otros triterpenos presentes en bajas proporciones, son el uvaol y eritrodiol. La composición lipídica cuticular de las aceitunas son diferentes de las ceras comunes de la superficie de las plantas, la superficie lipídica de las aceitunas son principalmente ácidos triterpenos pentacíclicos (90-95%) concentrados sobre la cutícula del fruto de la aceituna, ambos ácido oleanólico y maslínico son biosintetizados por el fruto de la aceituna en comparables cantidades, los huesos de la aceituna pueden representar una conveniente fuente de los dos ácidos triterpénicos (Bianchi y col., 1994).

Se ha descrito también como componentes de la cera superficial del fruto de la oliva alcanos, alquil ésteres saturados e insaturados, aldehídos, metil fenil ésteres, triacilgliceroles, alcoholes y ácidos grasos, y triterpenos pentacíclicos y ácidos triterpénicos. El ácido oleanólico y el maslínico fueron los triterpenos mayoritarios así como los triacilgliceroles (son los componentes mayoritarios). En las aceitunas verdes y negras también encontramos diferencia respecto a la proporción en la que se encuentran estos compuestos. La composición puede cambiar durante la maduración. Solo derivados triterpenos pentacíclicos, uvaol, eritrodiol, ácidos ursólico, y oleanólico son encontrados en la superficie lipídica de la aceituna, el fitosterol tetracíclico que se encuentra en el aceite de oliva, β -sitosterol, campesterol, brassicasterol, Δ -5-avenasterol, Δ -7-stigmasterol, etc. se encuentran sólo en muy pequeña cantidad en la cera (Giorgio y col., 1992).

I.2.3. COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN COMUNES A OTRAS PLANTAS

Existen compuestos similares a los componentes del alpechín o en general se puede decir que de la especie *Olea europaea* L. que se han encontrado en otras especies como es el caso de ligstrosido el cual sufre también hidrólisis por la enzima β -glucosidasa igual que la oleuropeina. Este compuesto se ha encontrado en *Fraxinus griffithii*. En esta especie existen otros glicósidos fenólicos al igual que en el caso de *Olea europaea* L., como es el caso del glucósido siringin [siringin(3-(4-glucosil-3,5-dimetoxifenil)-2-propenol)] y de su aldehído sinapaldehído glucósido [Sinapaldehído glucosido(3-(4-glucosil-3,5-dimetoxifenil)-2-propenal)] (Inouye y col., 1975; Sutarjadi y col., 1978).

Otra serie de glucosidos secoirideos similares a los presentes en *Olea europaea* L. han sido aislados de *Ligustrum japonicum*, estos son ligustalosite A, ligustalosite B, 10-hidroxioluropeina, oleuropeina y ligstroside (Inoue y col., 1982). La oleuropeina y el ligstrosido junto con otros glicósidos fenilpropanoicos se han aislado de *Osmanthus asiaticus* y se ha llevado a cabo su descripción espectroscópica a través de UV, IR, RMN-¹H y RMN-¹³C (Sugiyama y col., 1993). Este tipo de compuestos junto con verbascoside y otros similares y derivados de los encontrados en el alpechín como el 10-hidroxiligstroside también se han aislado y caracterizado espectroscópicamente de *Fraxinus excelsior* (Oleaceae) y *Fraxinus chinensis* (Damtoft y col., 1992; Kuwajima y col., 1992; Rosendal y col., 1976).

Tanto en *Olea eurpaea* como en plantas del género *Prunella*, *Eucalyptus*, *Isodon*, *Shorea*, *Ambroma*, *Symplocos*, *Prunus*, *Phytolacca* y *Terminalia* se han descrito triterpenos de la familia de oleanano y maslínico así como derivados de éstos (Ali y col., 1990; Biessels y col., 1974; Bombardelli y col., 1974; Cheung y col., 1972; Furuya y col., 1987; Gil y col., 1997; Kojima y col., 1986; Kojima y col., 1987; Razdan y col., 1983; Sarwar y col., 1996; Seo y col., 1975; Seo, y col., 1981; Tori y col., 1974). Así, se han descrito saponinas triterpenoides y derivadas del ácido maslínico de plantas como *Cilicodiscus* y *Symplocos* (Higuchi-Ryuichi y col., 1982; Pambou-Tchivounda y col., 1991).

I.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO

Como ya se ha mencionado, una de las alternativas más aceptadas para resolver el problema de contaminación medio ambiental que producen las aguas residuales obtenidas en el proceso de extracción del aceite de oliva es el tratamiento biológico, ya que es un proceso económico y no representa ningún impacto negativo para el medio ambiente.

Para llevar a cabo con éxito un tratamiento biológico de cualquier contaminante, además de conocer la naturaleza química de los compuestos problema, es necesario aislar microorganismos que sean capaces de catabolizar los compuestos que constituyen el contaminante. En el caso concreto del alpechín, el tratamiento biológico se ve dificultado por la presencia de los compuestos fenólicos que, como ya se describió en la Sección I.1.3, presentan una importante actividad antimicrobiana. La misión principal de los compuestos fenólicos en las plantas es inhibir a los microorganismos patógenos, por tanto, estos compuestos son tóxicos para las bacterias que realizan la depuración. La toxicidad de estos compuestos depende del tipo de bacteria y de una serie de factores, entre ellos el pH del medio, en general, es mayor la toxicidad cuando éste es ácido, como es el caso del alpechín (Fleming y *col.*, 1967; (Juven y *col.*, 1970; Maestro-Durán y *col.*, 1990; Maestro-Durán y *col.*, 1991; Mas y *col.*, 1984; Martínez y *col.*, 1986; Moreno y *col.*, 1983; Pérez y *col.*, 1990; Sáinz-Jiménez y *col.*, 1986; Sorlini y *col.*, 1986.

I.3.1. MICROORGANISMOS CAPACES DE CATABOLIZAR COMPUESTOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN

Los microorganismos en la naturaleza tanto de suelos como de aguas son capaces de degradar una gran variedad de compuestos orgánicos, incluidos los hidrocarburos aromáticos (Gibson, 1984). La degradación de estos compuestos ayuda a mantener el equilibrio del ciclo del carbono. Algunos de estos compuestos son compuestos xenobióticos, o sea, no degradables por los microorganismos naturales. Sin embargo, existen una gran cantidad de enzimas que participan en la degradación de estos compuestos, en algunos casos no en su total degradación pero sí contribuyen a la misma biotransformando dichos compuestos en otros compuestos que pueden ser degradados o biotransformados por otras enzimas y así sucesivamente hasta llegar a la biodegradación

completa. De esta manera y mediante manipulación genética de algún microorganismo concreto se puede conseguir la biodegradación de los denominados compuestos xenobióticos. Uno de los microorganismos con mayor potencial de biodegradación son las bacterias del género *Pseudomonas*. Se conoce un gran número de cepas que bien en su forma natural, bien por manipulación genética son capaces de degradar un elevado número de compuestos químicos aromáticos. La biología molecular ofrece en este sentido una herramienta útil para la degradación de compuestos xenobióticos mediante manipulación genética, utilizando bacterias manipuladas genéticamente y cuyo comportamiento en el laboratorio es similar al de las bacterias parentales (de Lorenzo, 1994; Ramos y col., 1994).

Es posible que organismos aislados en un mismo medio sigan distintas rutas metabólicas para degradar un determinado compuesto. Incluso se ha descrito que muchos análogos estructuralmente son degradados por rutas diferentes.

Se han descrito un buen número de cepas bacterianas que son capaces de utilizar compuestos presentes en el alpechín como fuente de carbono y energía (Tabla I.3.1). También se conoce la existencia de un gran número de bacterias capaces de utilizar compuestos químicos aromáticos del tipo de los presentes en el alpechín (Tabla I.3.1).

Tabla I.3.1. Relación de algunas cepas bacterianas capaces de utilizar los compuestos químicos aromáticos indicados como fuente de carbono y energía.

Cepa bacteriana	Compuesto químico catabolizado
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RJE74	Benceno
<i>Acinetobacter</i> sp.	Ácido 4-hidroxifenilacético, ácido cafeico
<i>Aeromonas</i> sp.	Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba)
<i>Alcaligenes</i> sp.	Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba)
<i>Bacillus brevis</i>	Ácido 3,5-diclorosalicílico, ácido 5-clorosalicílico
<i>Bacillus subtilis</i>	Ácido ferúlico
<i>Corinebacterium</i> C125	<i>o</i> -xileno
<i>Corynespora</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Curvalaria</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Escherichia coli</i>	Ácido 3-fenilpropiónico
<i>Flavobacterium</i> JS-7	{ Ácido DL- α -fenilhidracrílico, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido fenilacético
<i>Fusarium</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Hansenula</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Moraxella</i> sp.	Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba)

Cont.

Continuación Tabla I.3.1.

<i>Mucor</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Mycobacterium</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Nocardia</i> sp.	Ácido ferúlico, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -xilenos
<i>Paecilomyces</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Penicillium</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Pestalotia</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ácido vanílico
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>m</i> -cresol, 2,5-xilenol, 3,5-xilenol
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ácido ferúlico
<i>Pseudomonas fluorescens</i> UI670.....	Ácido ferúlico
<i>Pseudomonas maltophilia</i> DI-6.....	Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba)
<i>Pseudomonas putida</i>	{ Ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-metoxibenzoico, catecol, quercetin
<i>Pseudomonas putida</i> U(BU).....	Fenol, <i>o</i> -, <i>m</i> -, y <i>p</i> -cresol, 2,3-xilenol y 3,4-xilenol
<i>Pseudomonas putida</i> WCS358.....	Ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vanílico
<i>Pseudomonas</i> sp.	{ Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba), ácido ferúlico, tolueno
<i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	Ácido benzoico, ácido 3-clorobenzoico
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600.....	{ Fenol, 3,4-, 3,5-, 2,3-, 2,4-, 2,5- y 2,6-dimetilfenol, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -cresol
<i>Pseudomonas</i> sp. HR199.....	Vainillina
<i>Pseudomonas</i> sp. JS150.....	Benceno, alquilbencenos
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>o</i> -xileno
<i>Rhizobium fredii</i>	Genistein
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Quercetin
<i>Rhizobium meliloti</i>	Luteolin
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234.....	Daidzein, apigenina
<i>Rhizopus</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Rhodopseudomonas</i>	Ácido benzoico
<i>Rhodotorula</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Saccharomyces</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> SYK-6.....	Ácido 5,5'-dehidrodivanílico, ácido siríngico, ácido vanílico
<i>Streptomyces</i> sp.	Ácido ferúlico
<i>Xanthobacter</i> 124X.....	Estireno
<i>Xantomonas</i> sp.	Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba)

Así como las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de metabolizar un amplio espectro de compuestos aromáticos, *E. coli* es capaz de utilizar sólo ciertos compuestos aromáticos. Este microorganismo es capaz de metabolizar el ácido 3- y 4-

hidroxifenilacético siguiendo la misma ruta catabólica que ciertas pseudomonadas y especies de *Acinetobacter*. Sin embargo, otras cepas de *E. coli* no son capaces de utilizar estos compuestos aromáticos. Los dos compuestos mencionados son metabolizados por la ruta del 3,4-dihidroxifenilacético en lugar de la ruta del 2,5-dihidroxifenilacético.

Algunas especies de los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium* son capaces de metabolizar flavonoides, compuestos presentes en el alpechín.

También se han descrito levaduras, del género *Sacharomyces* y hongos como *Penicillium glaucum* y *Aspergillus niger* (Balice y col., 1986; Balice y col., 1988; Borja y col., 1990; Borja y col., 1990; Garrido y col., 1978; Federici y col., 1983; Maestro-Durán y col., 1990; Medici y col., 1985; Sorlini y col., 1986), que son capaces de utilizar algunos de los compuestos presentes en el alpechín.

Las cepas que degradan un gran número de ácidos, y metabolizan aromáticos metoxilados pueden prevenir las propiedades no deseables en las aguas residuales de la producción del aceite de oliva (alpechín) las cuales son el resultado de su contenido fenólico. (Zhixian Huang y col., 1993) (Pérez, J. y col., 1990).

En el alpechín se han aislado, al menos 38 cepas bacterianas que son capaces de utilizar los ácidos fenólicos asociados con los pigmentos poliméricos del mismo (ácido verátrico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido ferúlico...) como fuente de carbono. La mayoría (un 65%) son del género *Pseudomonas*.

Sólo se detectaron 4 cepas que son capaces de degradar ácido verátrico, mientras que 22 microorganismos son capaces de biotransformar ácido ferúlico en otro compuesto. Para obtener microorganismos que sean capaces de degradar ácido siríngico es necesario utilizar ácido vanílico, ya que el propio núcleo de sirínquil no induce su degradación, mientras que el ácido vanílico sí induce la ruptura del anillo (Ralph, J. P. y col., 1993).

I.3.2. RUTAS CATABÓLICAS DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS PRESENTES EN EL ALPECHÍN Y ENZIMAS IMPLICADAS EN ELLAS

Un compuesto aromático se considera que es biodegradado si el anillo sufre ruptura. Durante el metabolismo aeróbico de compuestos aromáticos naturales y sintéticos

las bacterias expresan una batería de distintos sistemas enzimáticos para convertir el sustrato en dihidroxilados desestabilizando las estructuras del anillo, tales como los catecoles. El catecol es un intermediario en la degradación de compuestos tales como benzoato, naftaleno, salicilato y fenol. Catecoles substituidos son intermediarios en el catabolismo de derivados metilados y clorinados de estos compuestos (Dagley, 1986; (Reineke y Knackmuss, 1988). Estos catecoles intermediarios sirven como los sustratos para la fisión del anillo, los productos resultantes de la ruptura son entonces metabolizados hasta intermediarios del ciclo de Krebs por una o dos alternativas metabólicas (rutas de fisión *orto* y *meta*).

Hay un gran número de enzimas que llevan a cabo las reacciones iniciales en las rutas catabólicas y que son capaces de atacar un amplio espectro de sustratos. El tipo de reacciones que llevan a cabo es limitado.

Bajo condiciones aerobias el oxígeno molecular es requerido no solo como aceptor de electrones terminal durante la respiración sino para la inserción dentro de los compuestos durante la hidroxilación y división del anillo (reacciones mediadas por enzimas oxigenasas). Las monooxigenasas y dioxigenasas son unas enzimas que utilizan oxígeno molecular para hidroxilar o romper el núcleo del benceno, respectivamente. En el catabolismo aeróbico de moléculas aromáticas estas reacciones conducen generalmente a la formación de intermedios aromáticos dihidroxilados que tienen grupos hidroxilo en dos carbonos adyacentes del anillo aromático (*orto*) o en carbonos opuestos del anillo (*para*) y que son los intermediarios clave para la entrada dentro de las rutas centrales. Dependiendo de que el sustrato lleve ya grupos hidroxilo o no, la hidroxilación puede ser llevada a cabo por una enzima mono- ó dioxigenasa. La formación de fenoles dihidricos parece ser una importante estrategia bioquímica de las bacterias para desestabilizar la estructura resonante química estable del anillo aromático y así facilitar su ruptura.

Hay dos modos distintos de división oxidativa del núcleo del benceno:

- División "*orto*" o "intradiol", se trata de la división del enlace entre átomos de carbono adyacentes que llevan grupos hidroxilo, y el producto dividido es metabolizado por la ruta *orto* o β -cetoacilato. La dioxigenasa que divide el enlace carbón-carbón es designada por el nombre del compuesto que es atacado y la posición del enlace carbón-carbón dividido. Así la división del catecol (1,2-dihidroxibenceno) es por la catecol 1,2-dioxigenasa y el protocatecuato (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) es por la protocatecuato 3,4-dioxigenasa.

• División entre dos átomos de carbono, uno de los cuales lleva un grupo hidroxilo y el otro átomo de carbono es no sustituido o sustituido con otro grupo hidroxilo. En este caso los grupos hidroxilo pueden ser *orto* o *para* u otra posición, y las enzimas que catalizan tal división son designadas por la posición del enlace de carbono atacado. Así el catecol es oxidado por la catecol 2,3-dioxigenasa y el ácido protocatéuico por la protocatecuato 4,5-dioxigenasa o protocatecuato 2,3-dioxigenasa. Este tipo de fisión es conocida como fisión *meta* y la ruta por la cual los productos de tal ruptura son metabolizados es llamada la ruta *meta*. Cuando los grupos hidroxilo son *para* uno de otro como en el ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) la división oxidativa es catalizada por la gentisato 1,2-dioxigenasa, y la subsecuente ruta es la ruta del gentisato.

Tras la fisión del anillo, los metabolitos son metabolizados hasta intermediarios del ciclo de Krebs. Típicamente los compuestos no sustituidos y haloaromáticos son metabolizados por división *orto* (ó β -cetoadipato). Las rutas de división *orto* no producen normalmente alquilaromáticos porque muchas enzimas de división *orto* tienen muy bajas afinidades para las rutas de alquilatecoles. Los alquilaromáticos son más procesados por rutas *meta*.

Normalmente en la degradación de los compuestos fenólicos o compuestos fenólicos metoxilados, en primer lugar, hay una pérdida inicial de grupos metoxilo por la acción de demetilinasas o lacasas, seguida de una pérdida de grupos hidroxilo del anillo aromático antes que la dioxigenasa del microorganismo rompa el anillo, estos anillos son convertidos a estructuras de tipo *o*-difenoles. Algunas de estas estructuras se forman por demetilación, que resulta en la pérdida de grupos metoxilo, los cuales se detectarían como nuevos picos (Martínez-Nieto y col., 1992).

En algunos casos toda o parte de una ruta catabólica es especificada por plásmidos. Estos plásmidos pueden ser transferidos lateralmente a otras bacterias y expandir así el potencial metabólico de otros miembros de un ecosistema. Muchos organismos del suelo poseen dos o más rutas para la degradación de un sustrato, aunque, en algunas situaciones dadas sólo una de estas rutas es inducida. *P. putida* degrada benzoato a través de la ruta del β -cetoadipato que es inducida por *cis,cis*-muconato. Si *P. putida* porta el plásmido TOL, el cual especifica una ruta de fisión *meta*, la ruta β -cetoadipato no es inducida; por el contrario el benzoato induce la síntesis de las enzimas de la ruta *meta* y es metabolizado a catecol, el cual es atacado por una catecol 2,3-dioxigenasa (Gibson, 1984).

Algunas enzimas conocidas que están implicadas en el metabolismo de compuestos presentes en el alpechín se muestran a continuación. En general, aunque se mencione el nombre de la cepa en la que se han purificado también se han aislado en otras cepas.

- Protocatecuato 3,4-dioxigenasa de *Brevibacterium fuscum*. El protocatecuato es un intermedio en rutas de biodegradación bacteriana de una amplia variedad de compuestos aromáticos. Esta enzima cataliza la etapa de apertura del anillo en estas rutas (figura I.3.1). Estas enzimas catalizan la fisión entre los carbonos 2-3, 3-4 y 4-5 del anillo aromático del protocatecuato. Estas enzimas se separan en dos familias, intradiol ó extradiol basándose en el sitio de fisión relativo a las funciones del grupo hidroxilo terminal del sustrato (W. Whittaker y col.).

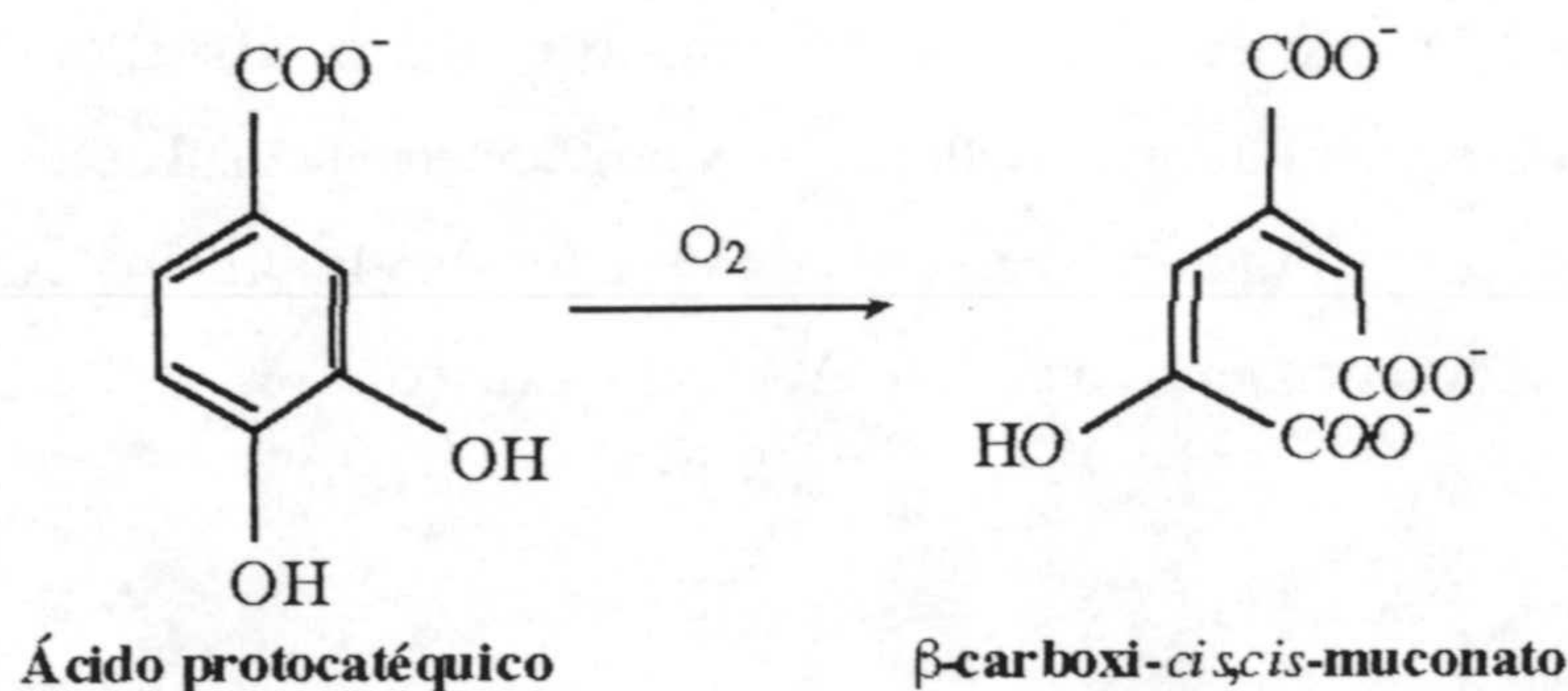


Figura I.3.1. Acción de la enzima protocatecuato 3,4-dioxigenasa

- Protocatecuato 4,5-dioxigenasa de *Pseudomonas testosteroni*. Esta enzima cataliza la etapa de apertura del anillo en el metabolismo de protocatecuato, el cual es un intermediario en la biodegradación de muchos compuestos aromáticos (figura I.3.2). Esta enzima necesita Fe²⁺ para catalizar la reacción. Presenta dos tipos de subunidades. La enzima requiere grupos hidroxilo vecinales en las posiciones 3 y 4. El sulfonilcatecol es el único sustrato con una modificación en la posición del carboxilato que es sustrato de esta enzima. Muchos grupos incluyendo OH, OCH₃, CH₃, y Cl pueden ocupar la posición 5 sin pérdida de actividad (Arciero y col.).

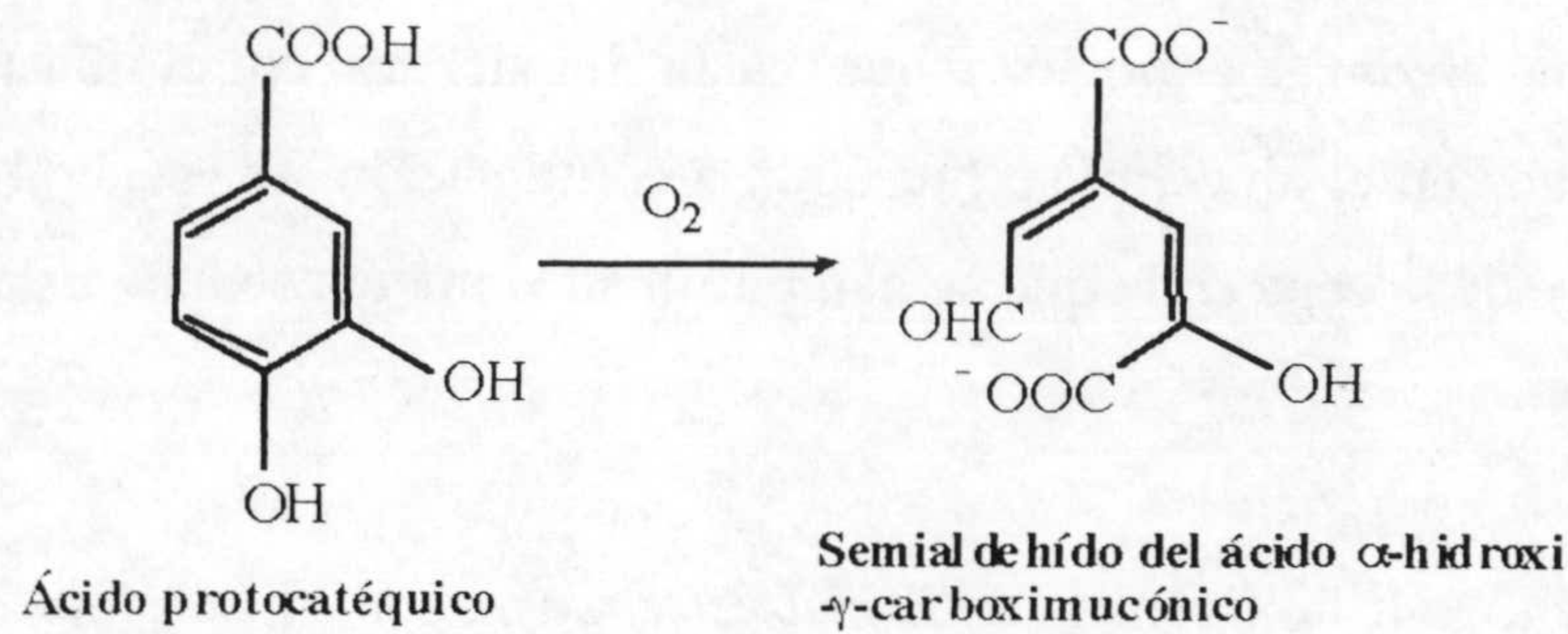


Figura I.3.2. Acción de la enzima protocatecuato 4,5-dioxigenasa

•Protocatecuato 2,3-dioxigenasa de *Bacillus macerans*. Esta enzima sólo ha sido detectada en bacterias formadoras de esporas aeróbicas. Esta enzima cataliza la etapa crítica de fisión del anillo en rutas de biodegradación de muchos compuestos aromáticos complejos (Figura I.3.3). Esta enzima tiene un amplio espectro de sustratos, incluyen muchos 3- y 4- catecoles sustituidos, muchos 2- ó 5-protocatecuatos sustituidos, ésteres de protocatecuato, así como protocatecuatos análogos en los que la función carboxilato es sustituida por propionato, mandelato ó acetato (Wolgel y Lipscomb,).

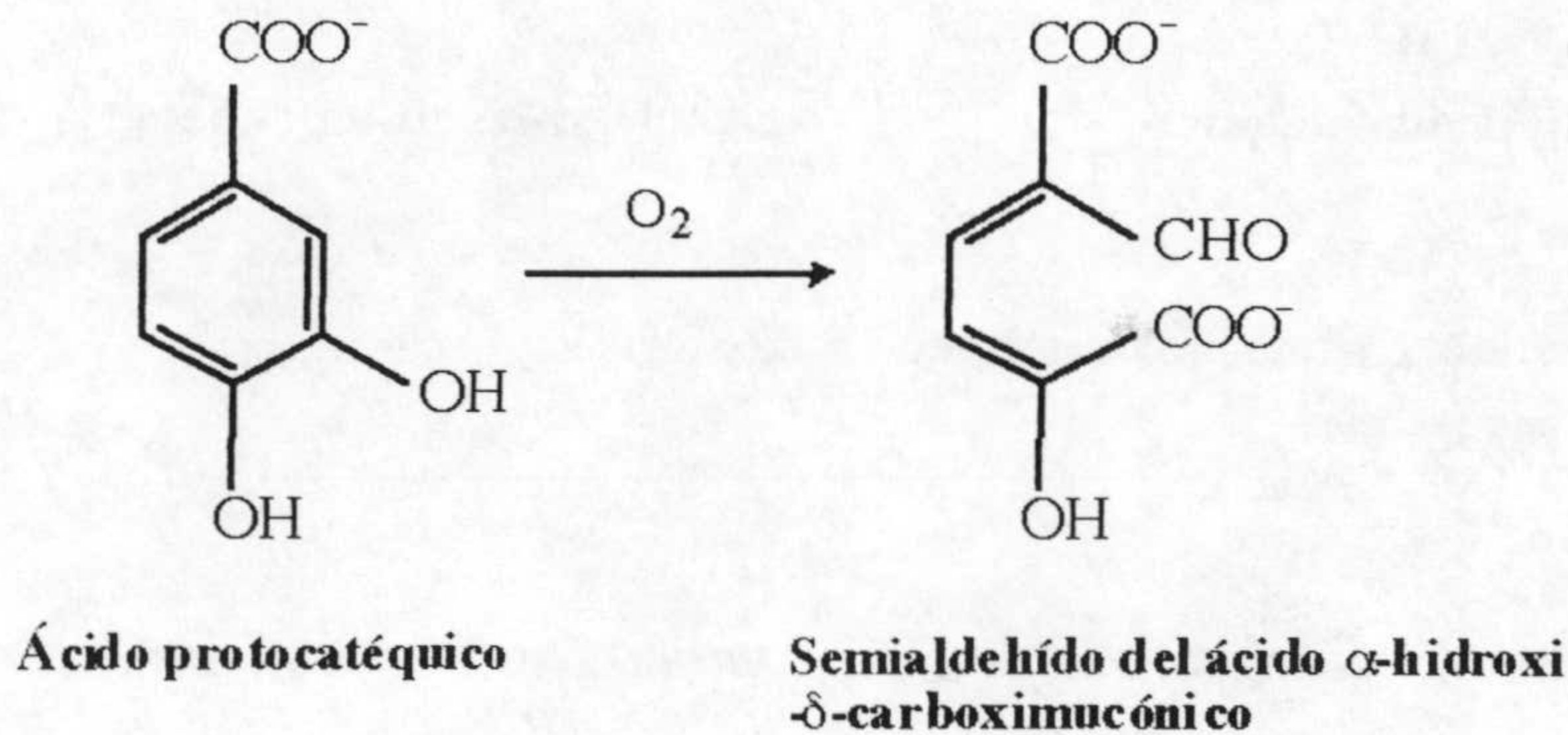


Figura I.3.3. Acción de la enzima protocatecuato 2,3-dioxigenasa

•Gentisato 1,2-dioxigenasa de *Pseudomonas acidovorans*. Esta enzima cataliza la división de gentisato y estructuras relacionadas en el medioambiente (figura I.3.4), siendo sustrato del enzima un amplio espectro de alquil- y halo-gentisatos sustituidos, sin embargo la actividad se reduce cuando el gentisato tiene sustituciones (metil, etil, 2-propil, bromo, fluoro) en la posición C-3 del anillo, similares resultados

sucedan cuando este tipo de sustituciones está en posición C-4 del anillo ó en C-3 y en C-4 (Harpel y Lipscomb,).

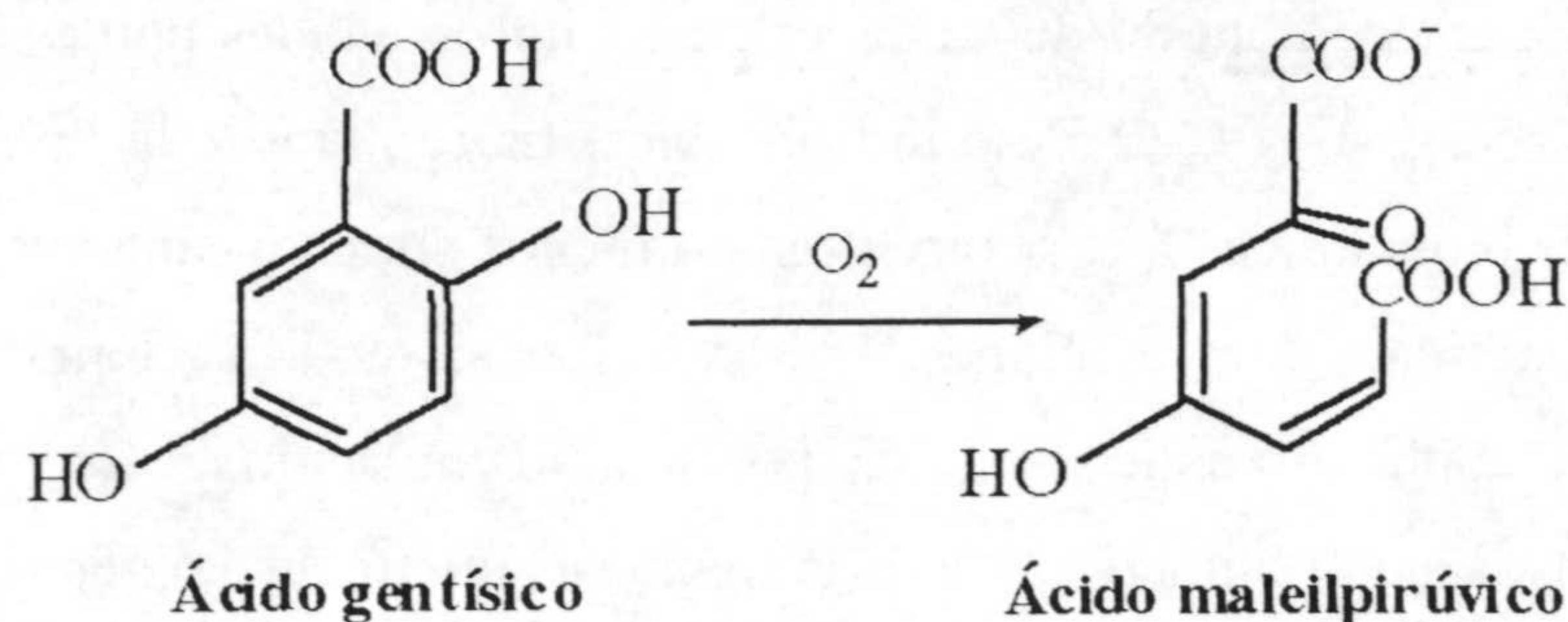


Figura I.3.4. Acción de la enzima entisato 1,2-dioxigenasa

I.3.2.1. RUPTURA DEL ENLACE ÉTER

El enlace éter es la unión más simple y común que confiere a ambos compuestos biológicos y xenobióticos un alto grado de resistencia a la mineralización biológica. Monómeros de lignina, el segundo más abundante polímero orgánico de origen natural, son enlazados via intermonómeros con puentes éter, los cuales contribuyen a la recalcitrancia de este polímero. También existen distintos de compuestos xenobióticos los cuales son regularmente aplicados a suelos y descargados en los cursos de agua y acuíferos con enlaces éter, en particular agroquímicos y detergentes. En respuesta a éstos compuestos un número de comunidades bacterianas tienen la capacidad de degradar parcial o totalmente tales compuestos xenobióticos.

Se han descrito cuatro mecanismos principales para el ataque a los enlaces éter, estos son ruptura oxigenativa via monooxigenasas; oxidación del átomo de carbono α -unido al enlace éter, seguido por hidrólisis de éster resultante; hidrólisis directa del enlace C-O; y fisión mediada por una liasa del enlace carbón-oxígeno. En general podemos decir que las bacterias tienen capacidad para romper enlaces éter mediante reacciones de oxigenación, deshidrogenación, transferencia de grupos hidroxilo, hidrólisis, reducción, sustitución nucleofílica y dismutación. Muy pocas enzimas implicadas en la división éter han sido purificadas y caracterizadas y, a pesar de haber una aparente mezcla rica de mecanismos implicados en el catabolismo éter, solo cuatro enzimas de división éter son acreditadas como tal, denominadas isocorismato piruvato

liasa, carboximetiloxisuccinato liasa, 4-metoxibenzoato monooxigenasa y polietilen glicol acetaldehído liasa. Todas están dentro del grupo de las liasas de carbón-oxígeno.

La lignina es una de las sustancias aromáticas más abundantes presente en la biosfera, es un polímero compuesto de unidades de fenilpropanoides unidas a través de una variedad de enlaces C-C y C-O-C no hidrolizables. La ruptura de la lignina implica múltiples reacciones bioquímicas que ocurren más o menos simultáneamente: ruptura de uniones intermonoméricas, demetilaciones, hidroxilaciones, modificaciones de cadena lateral, y fisión del anillo aromático seguida por una disimilación de los metabolitos alifáticos producidos. La despolimerización de la lignina es un proceso oxidativo llevado a cabo predominantemente por hongos aeróbicos lignolíticos, los cuales conducen a la producción de numerosos compuestos oligoméricos y monoméricos aromáticos, incluyendo alquil-aril éteres, los cuales sirven como sustratos potenciales para los sistemas de división éter bacterianos. La dealquilación de alquil-aril éteres puede ocurrir en bacterias aeróbicas y anaeróbicas (Brunel y Davison, 1988; Martínez y *col.*, 1986; Smith, 1990; Vicuña, 1988; White y *col.*, 1996).

I.3.2.2. RUTAS CATABÓLICAS DEL BENCENO

El anillo de benceno es un constituyente de muchos compuestos químicos encontrado en la naturaleza, no es sorprendente que una amplia serie de microorganismos eucarióticos y procarióticos posean enzimas que pueden atacar su estructura.

Un intermedio en la degradación del benceno es el catecol, el cual es catabolizado por una catecol 1,2-dioxigenasa (división *orto* o intradiol) y subsecuentemente la ruta del β -cetoadipato, o bien por una catecol 2,3-dioxigenasa (división *meta* o extradiol).

La biodegradación del benceno también ha sido re-examinada desde el punto de vista biotecnológico. Una cepa mutante *Pseudomonas* sp. acumula catecol y éste y sus derivados son utilizados principalmente para la producción de sabores sintéticos tales como la vanillina. En la figura I.3.5 se muestran 2 rutas divergentes empleadas en la biodegradación bacteriana del benceno, se identifican los intermediarios y se caracterizaron los sistemas enzimáticos.

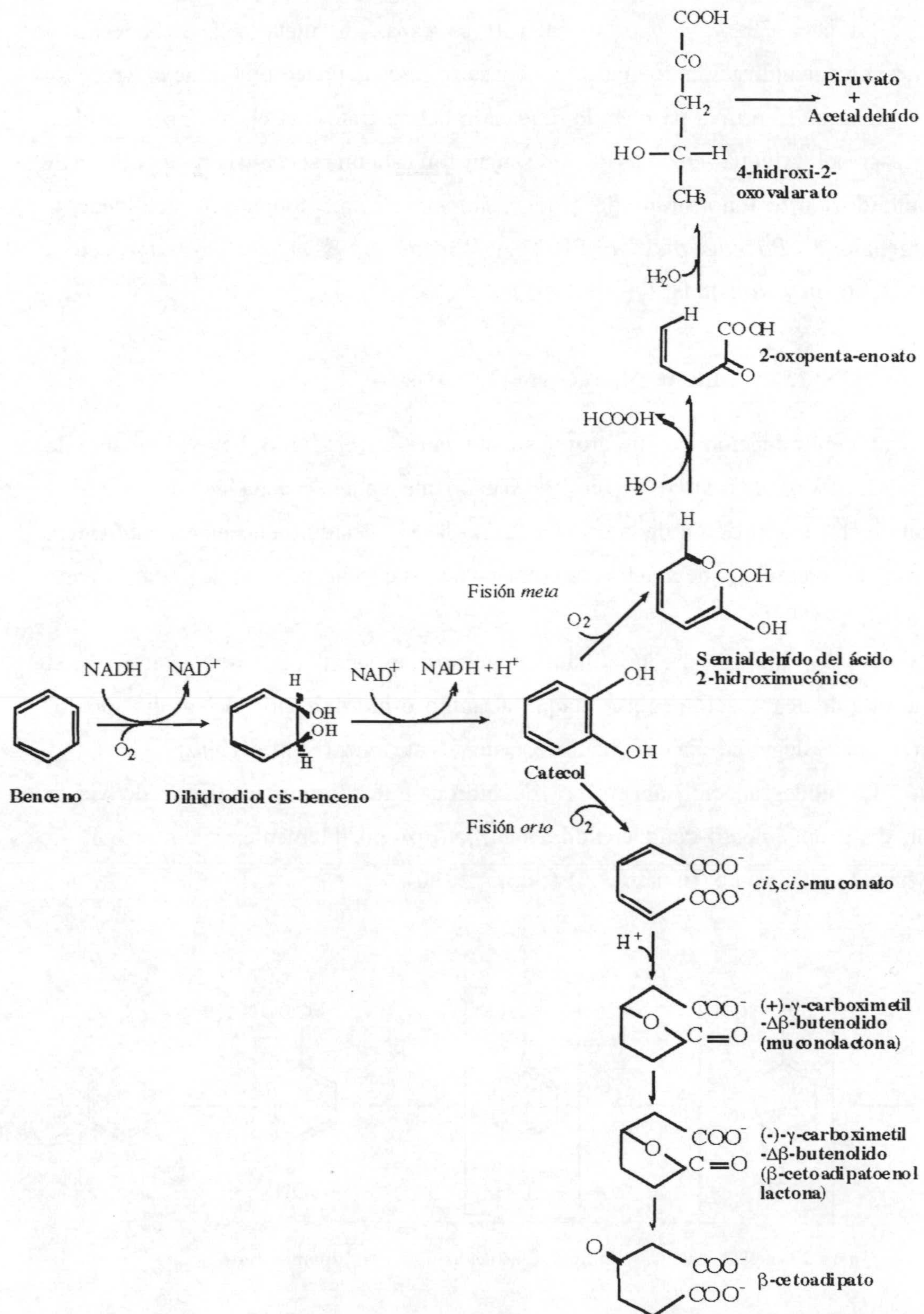


Figura I.3.5. Rutas de biodegradación del benceno

La cepa *Pseudomonas* sp. JS150 es capaz de metabolizar benceno y alquilbencenos por utilización de una dioxigenasa, esta cepa posee una tolueno/benceno-2-monooxigenasa. El primer paso es la oxidación del sustrato, así el tolueno se oxida a *o*-, *m*- y *p*-cresol. Algunas enzimas que presentan con ésta una secuencia polipeptídica de gran similitud, son la fenol hidroxilasa de *Pseudomonas* sp., tolueno-3- y tolueno-4-monooxigenasa de *Bacillus pickettii* PKO1 y *Pseudomonas mendocina* KR1, etc... (Glenn R. Johnson y Ronald H. Olsen, 1995).

I.3.2.3. RUTAS CATABÓLICAS DE ALQUILBENCENOS

La introducción de un grupo sustituyente en el anillo bencénico abre la posibilidad de modos alternativos de biodegradación, ataque a la cadena lateral o ataque al anillo. En efecto, la oxidación de la cadena lateral larga en alquilbencenos es suficiente para permitir el crecimiento de muchos microorganismos que no pueden degradar la parte aromática (Smith, 1990).

Biodegradación de mono-alquilbencenos; en algunos casos como en el tolueno la ruta de degradación es por ataque al anillo e hidroxilación del grupo metilo. También se puede degradar via catecol u subsecuente ruta *meta* (Smith, 1990).

La biodegradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos procede via la oxidación del grupo metilo conduciendo a benzoato o, posiblemente, via *p*-cresol, *p*-hidroxibenzoato y benzoato (figura I.3.6) (Smith, 1990).

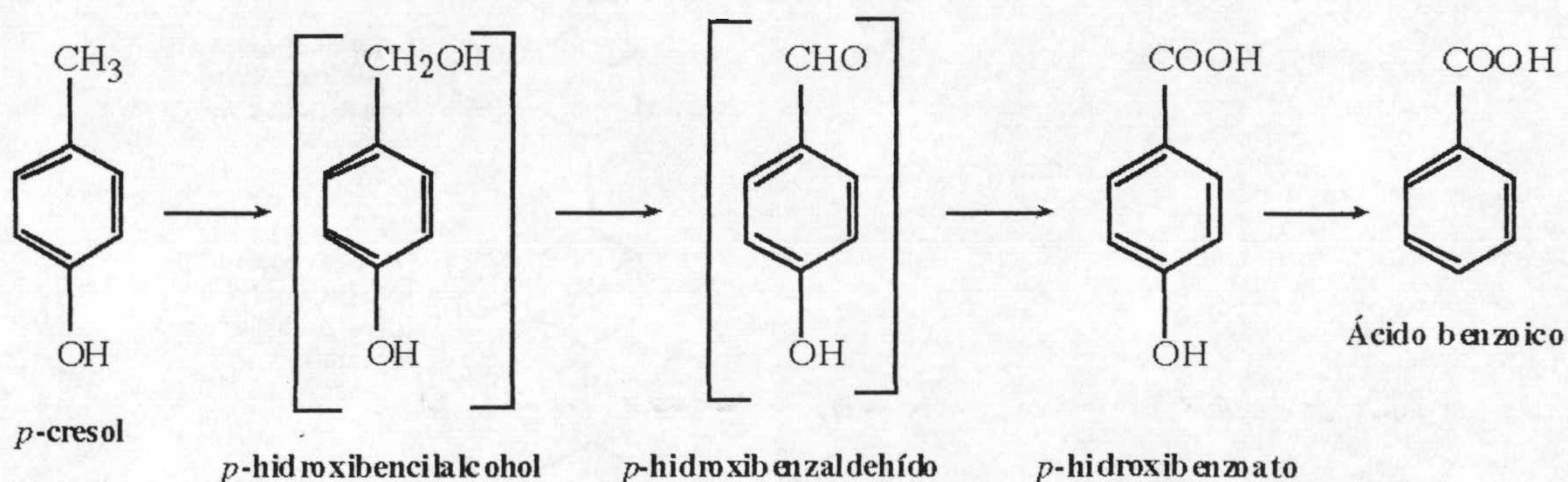


Figura I.3.6. Ruta degradativa del *p*-cresol.

En algunos casos ocurre primero la ruptura directa de la parte aromática de alquilbencenos sin el ataque previo a la cadena lateral, es el caso de etilbencenos, 2-fenilbutano, 3-fenilpentano, n-butilbenceno, isopropilbenceno y *tert*-butilbenceno. Estos son catabolizados via ataque del anillo resultando en la correspondiente 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi alquilbenceno el cual sufre una reducción al correspondiente 2,3-dihidroxi-intermedio (3-alkilsustituidos catecoles). Los catecoles sustituidos en posición 3 son fisionados por una enzima tipo extradiol entre C₁ y C₂, dando lugar a productos característicos de fisión de anillo-*meta*. El catabolismo es por ataque hidrolítico para dar ácidos carboxílicos dependientes de cadena alquímica y, presumiblemente, 2-oxopenta-4-enoato (Smith, 1990). Una ruta general para el completo catabolismo de estos monoalquilbencenos está dada en la figura I.3.7.

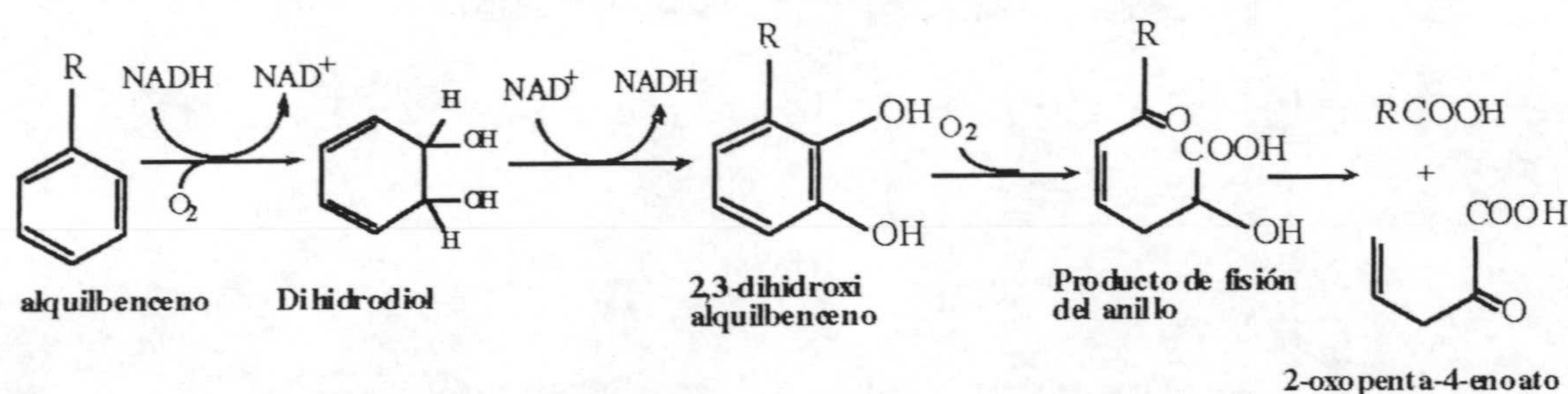


Figura I.3.7. Ruta de biodegradación de alquilbencenos (C1-C7).

Cuando la cadena lateral excede de 7 carbonos la ruta preferida es el ataque a la cadena alquímica, así tenemos la degradación de n-dodecil- y n-nonil-bencenos (1-fenildodecano y 1-fenilnonano) por ataque inicial a la cadena lateral via ω - y β - oxidación. Ambos compuestos podían ser catabolizados a través de ácido 2,5-dihidroxifenilacetico (ácido homogentísico) (Smith, 1990).

Respecto a la biodegradación de di-alquilbencenos: *m*- y *p*- isómeros de xileno son degradados por *Pseudomonas* (que contiene el plásmido TOL), por una oxidación inicial de uno de los grupos metilo a los correspondientes alcoholes bencílicos, benzaldehídos, ácidos toluicos y metil catecol. La biodegradación de *m*- y *p*-xileno a su correspondiente metil catecol se muestra en la figura I.3.8. Los catecoles resultantes sufren fisión *meta*. Los productos de fisión del anillo de 2 catecoles metílicos diferentes (3-metilcatecol desde *m*-xileno y 4-metil catecol desde *p*-xileno) son catabolizados por

diferentes sistemas enzimáticos. El semialdehído resultante de la fisión de 3-metilcatecol es degradado por una simple enzima tipo hidroxilasa, mientras que el semialdehído resultante del 4-metilcatecol es convertido via las enzimas de la rama de 4-oxocrotonato. Estas rutas se ilustran en la figura I.3.9. En algunos casos existen bacterias que degradan *p*- y *m*-xileno pero no pueden atacar a *o*-xileno y vice versa (Smith, 1990).

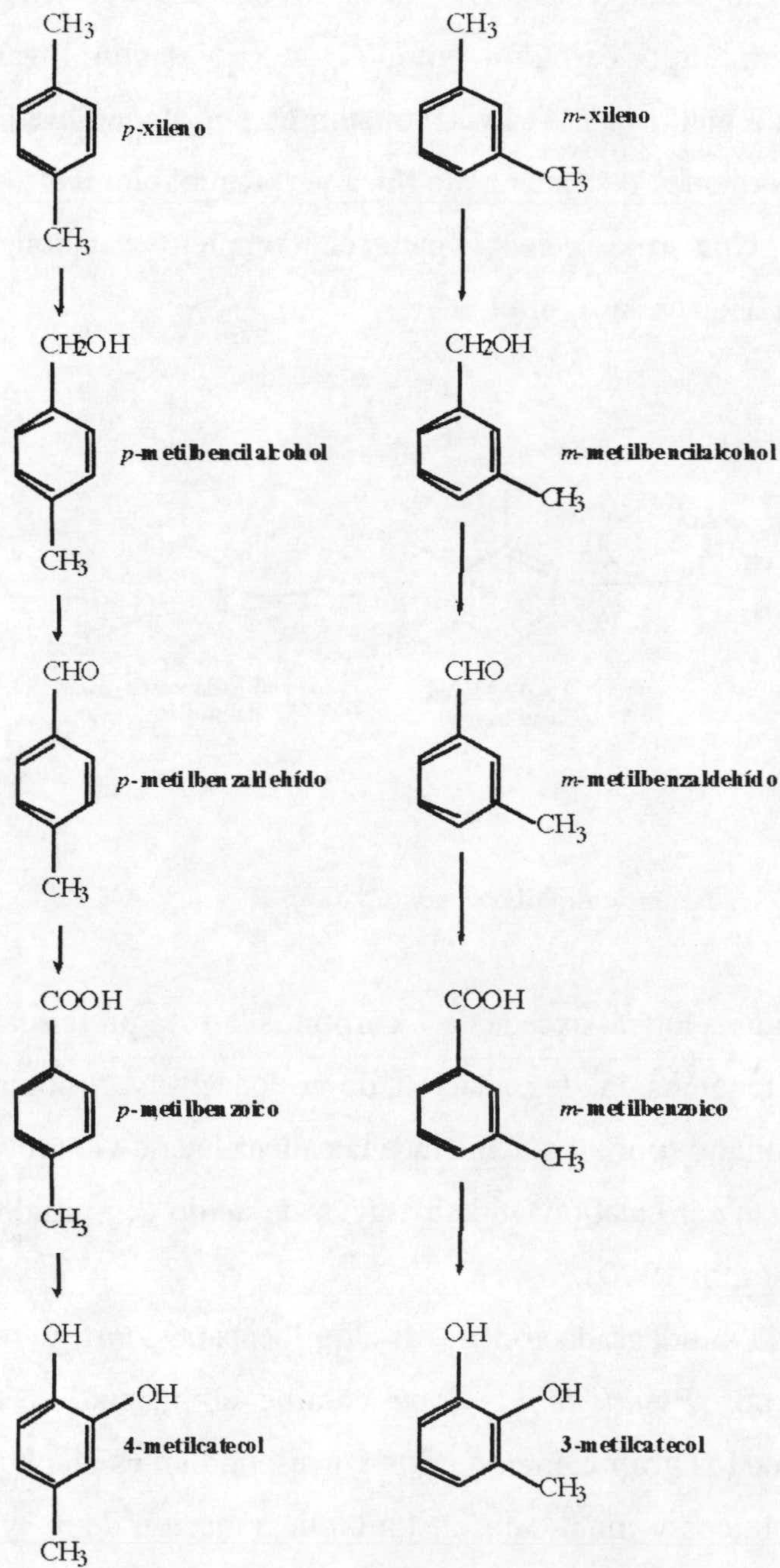


Figura I.3.8. Reacciones iniciales en la biodegradación de *m*- y *p*-xilenos

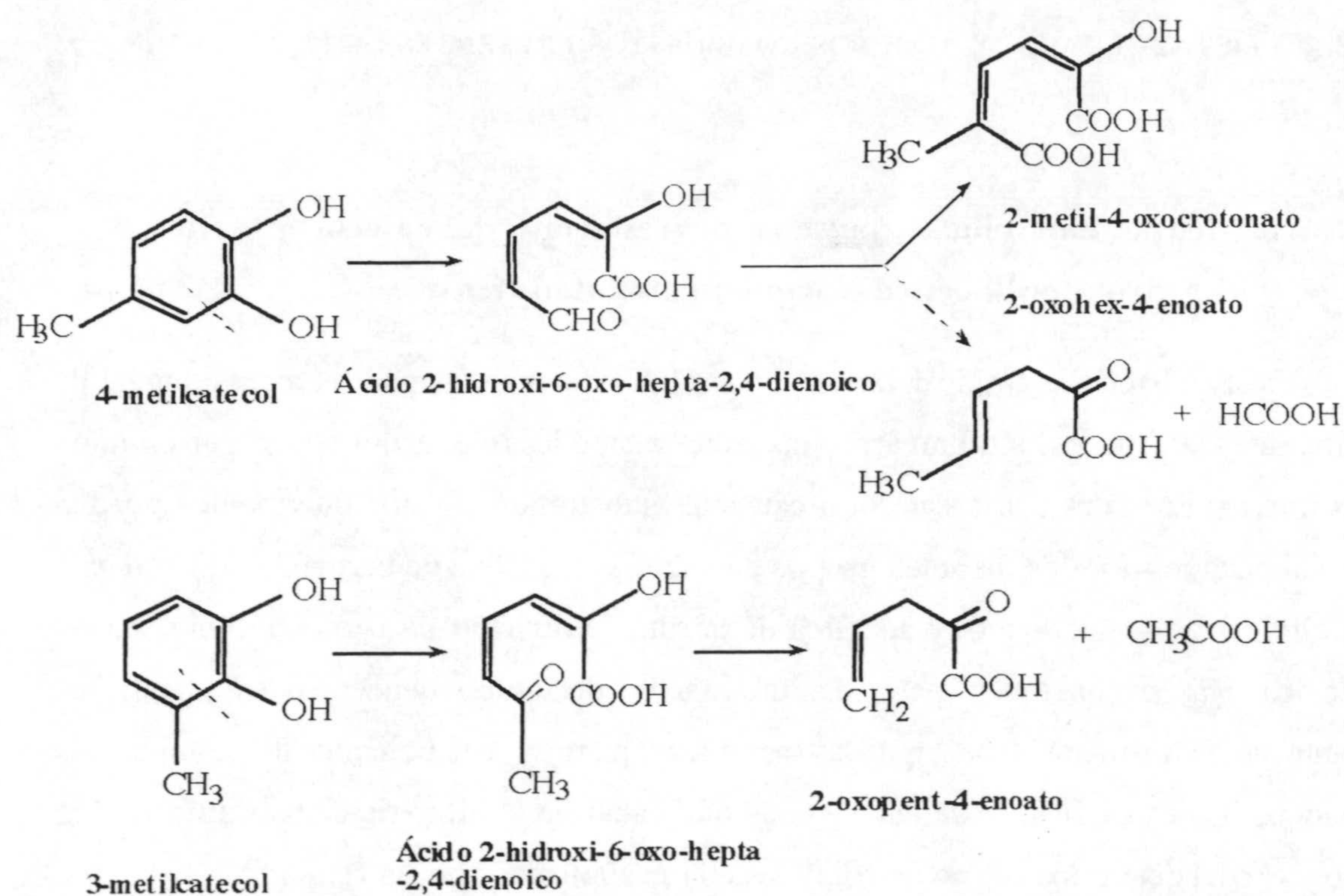


Figura I.3.9. Rutas catabólicas de 4- y 3-metilcatecoles

Miembros del género *Nocardia* pueden metabolizar los tres isómeros del xileno. Los isómeros *para* y *meta* xilenos son metabolizados via fisión *orto* mientras que *o*-xileno es degradado via *meta*. En *Pseudomonas stutzeri* *Corinebacterium* C125 el metabolismo del *o*-xileno ocurre via 3,4-dimetilcatecol con subsecuente fisión *meta*. La ruta se ilustra en la figura I.3.10 (Smith, 1990).

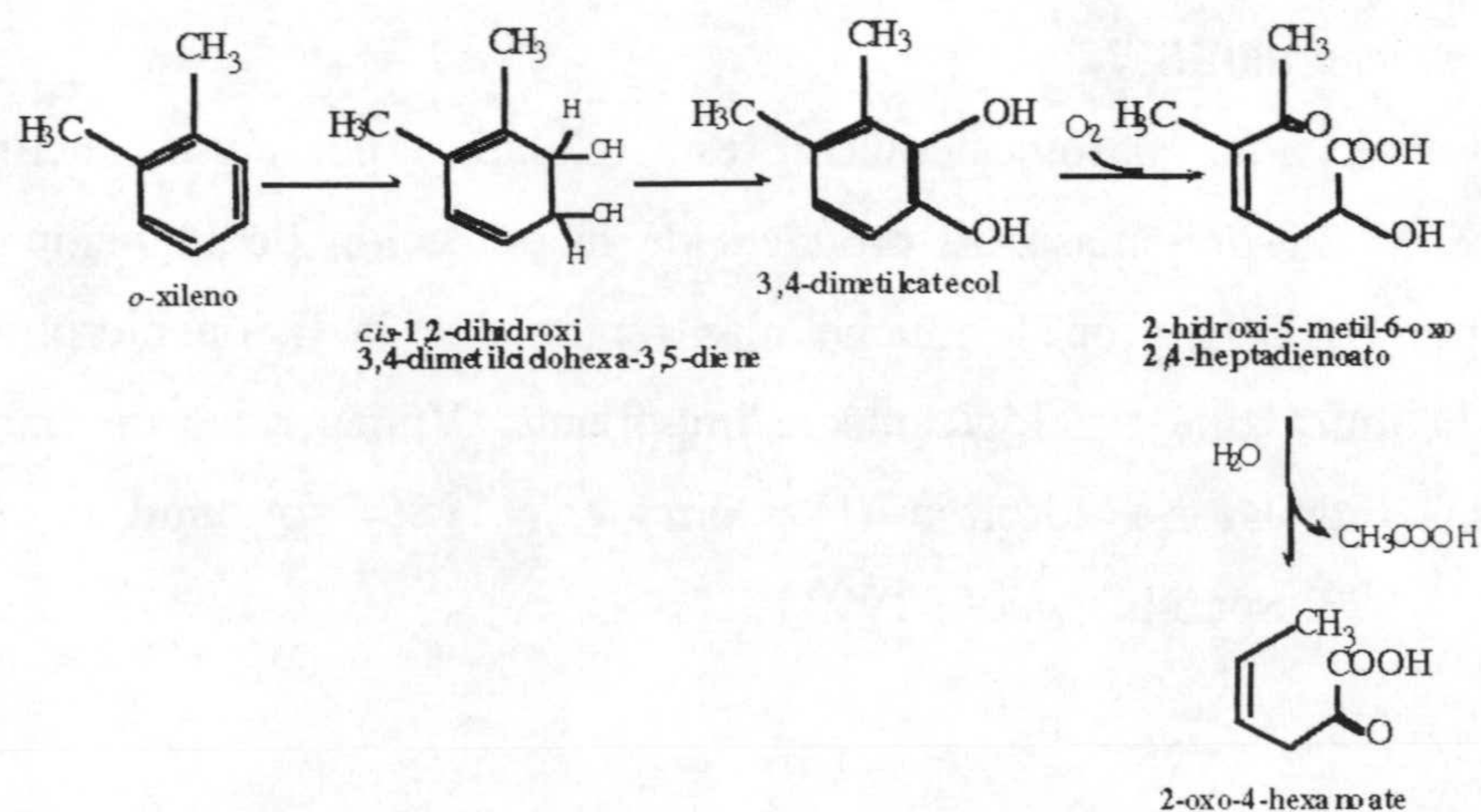


Figura I.3.10. Ruta biodegradativa de *o*-xileno

I.3.2.4. METABOLISMO DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN

I.3.2.4.1. Rutas catabólicas para la degradación de catecol y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (ácido protocatéquico)

Las bacterias emplean un amplio espectro de enzimas para el ataque inicial de los diferentes substratos, sin embargo, las rutas catabólicas tienden a converger en unos pocos intermediarios tales como catecol o catecoles substituidos. Estos intermediarios pueden ser metabolizados por dos distintos grupos de enzimas: aquellos de la ruta de división *orto* o intradiol (ruta β -cetoadipato) y aquellos de la ruta de división *meta* o extradiol (ruta α -cetoácido). Hay excepciones, pero la hidroxilación del anillo bencénico es un factor limitante en la primera etapa en rutas aeróbicas para el catabolismo de compuestos aromáticos. La especificidad de las enzimas que catalizan la hidroxilación es uno de los factores el cual determina el tipo de compuestos metabolizados por la célula.

Catecoles y ácido protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) pueden ser divididos por dos rutas: ruptura entre los dos grupos hidroxilo (división *orto* o intradiol, ruta β -cetoadipato) donde están implicadas la catecol 1,2-dioxigenasa y protocatecuato 3,4-dioxigenasa, respectivamente; ó ruptura próxima a una de los grupos hidroxilo (división *meta* o extradiol, ruta α -cetoácido).

La dehidrogenasa tiene una alta afinidad por los productos de fisión del anillo derivados del catecol y 4-metilcatecol.

El ácido homoprotocatéquico es hidroxilado a ácido 2,4,5-trihidroxifenilacético, el cual es inestable y es rápidamente oxidado a la hidroxiquinona por la cepa *Flavobacterium JS-7*.

El ácido homoprotocatéquico es oxidado por una ácido 3,4-dihidroxifenilacético 2,3-oxigenasa. El producto de la oxidación de la fisión *meta* de protocatecuato por NAD(P) procede mucho más rápido que la fisión hidrolítica y es probablemente la única ruta fisiológicamente importante. Varias rutas de fisión *meta* emplean aldolasas, hidratasas e hidrolasas (Franklin y col., 1989; Nordlund y col., 1990; Nordlund y col., 1993; Sparnins y col., 1993).

I.3.2.4.2. Rutas catabólicas para la degradación de ácidos hidroxicinámicos

a) **Ácido ferúlico:** El ácido ferúlico es un compuesto muy abundante en la naturaleza, está relacionado con los productos aromáticos procedentes de la degradación de la lignina así como que es uno de los componentes del alpechín.

El ácido ferúlico es degradado vía ácido vanílico, la primera etapa en la degradación de ácido ferúlico implica la conversión a ácido vanílico, seguido por la demetilación a ácido protocatéquico. El paso de ácido ferúlico a ácido vanílico es mediado por dos proteínas Fca y Vdh, los genes que expresan estas proteínas son *fca* y *vdh*.

Dos proteínas, VanA y VanB, forman la vanillato demetilasa y son responsables de la demetilación de ácido vanílico a protocatéquico. VanA es una monooxigenasa, mientras que VanB parece estar relacionada con ferredoxinas. La aldehído dehidrogenasa es responsable para la conversión de vanillina a ácido vanílico. Estos dos componentes demetilan también otro monómero fenólico, ácido verátrico. Estos genes son inducidos por el sustrato, ácido vanílico pero mayor inducción se produce cuando las células se siembran en presencia de los productos de la reacción, ácido protocatéquico.

El ácido ferúlico es degradado por diversas cepas bacterianas (Figura I.3.11). La primera etapa de la degradación del ácido ferúlico implica el acortamiento de la cadena lateral en un fragmento de dos carbonos dando ácido vanílico seguido de una demetilación para dar ácido protocatéquico el cual sigue una fisión *orto* del anillo (Priefert y col., 1997). Fca y Vdh son las únicas proteínas implicadas en la transformación de ácido ferúlico a ácido vanílico y se encuentran en un sólo operón (*fca/vdh*) (Venturi y col., 1998).

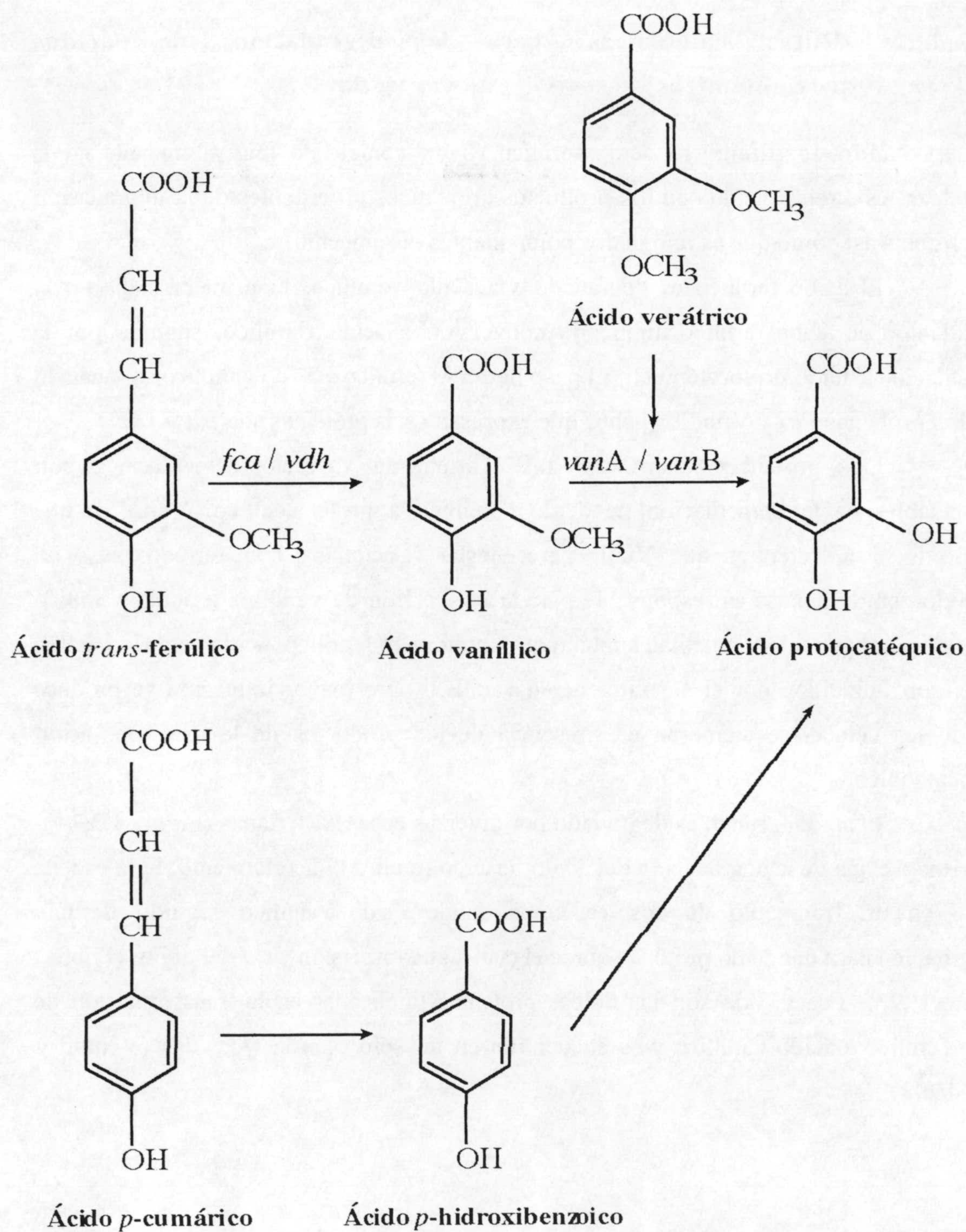


Figura I.3.11. Ruta degradativa de los ácidos ferúlico y protocatéquico

El ácido ferúlico además de ser secuencialmente degradado por la cepa *Pseudomonas fluorescens* a vanillina, ácido vanílico y ácido protocatéuico, también puede ser descarboxilado a 4-hidroxi-3-metoxiestireno. En la figura I.3.12 se muestra un esquema de la descarboxilación del ácido ferúlico. El ácido ferúlico se convierte en un tautómero quinoideo, es un ácido vinílico β -cetoácido que descarboxila espontáneamente para dar el 4-hidroxi-3-metoxiestireno (figura I.3.12) (Huang y col., 1994). El ácido vanílico es también transformado a guaiacol y catecol. Se han descrito rutas catabólicas para la degradación del ácido ferúlico a 4-hidroxi-3-metoxiestireno y ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilpropiónico por las cepas *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* (Figura I.3.13) (Nali y col., 1985).

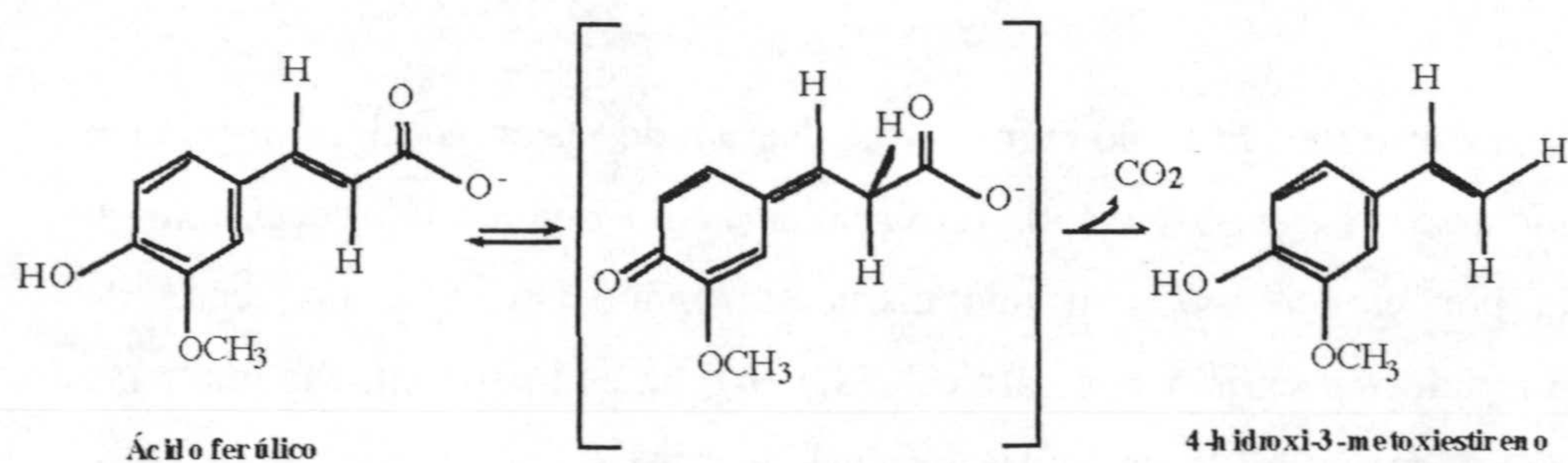


Figura I.3.12. Descarboxilación del ácido ferúlico

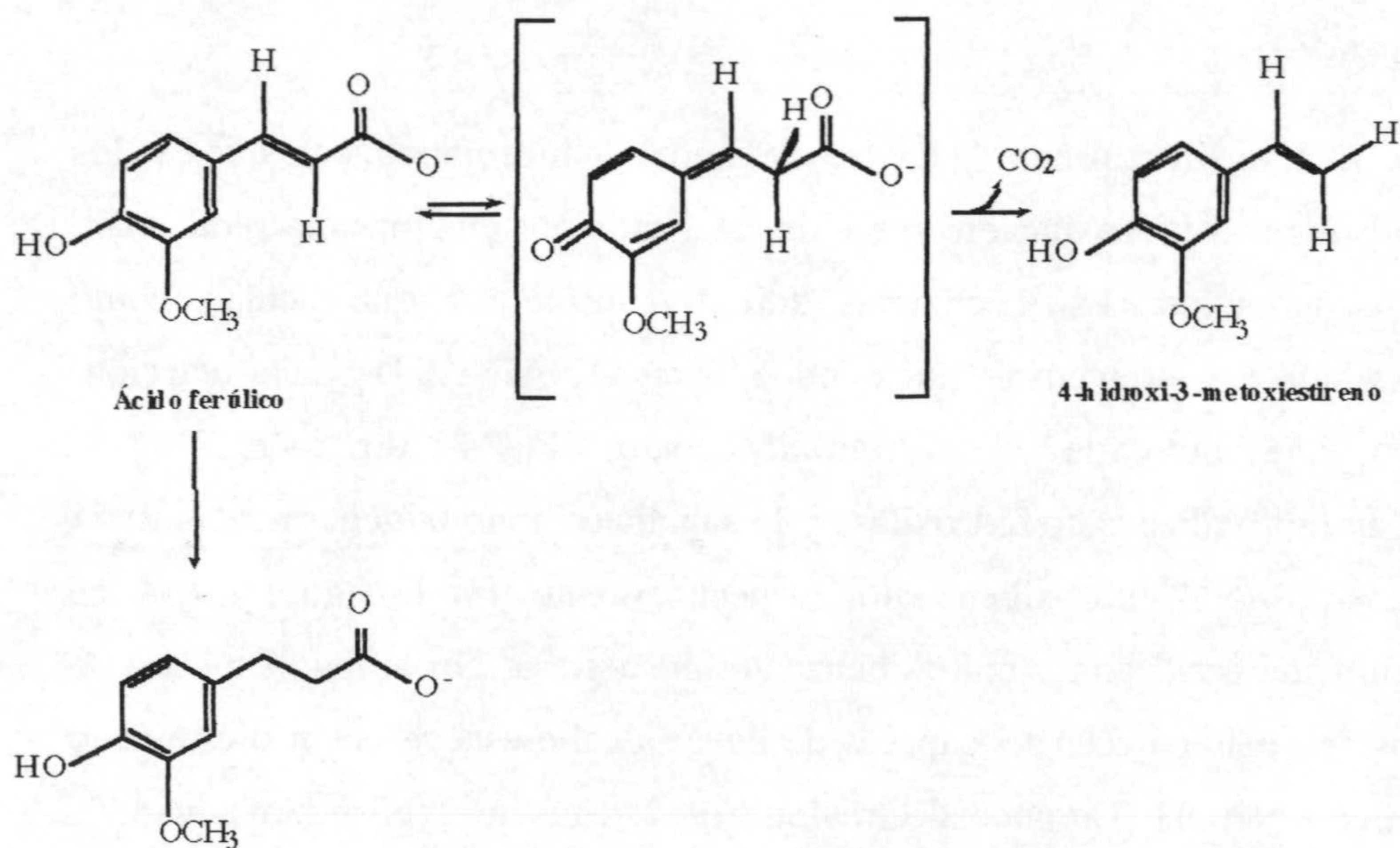


Figura I.3.13. Ruta degradativa del ácido ferúlico.

Pseudomonas fluorescens UI 670 lleva a cabo la decarboxilación de ácido ferúlico a 4-hidroxi-3-metoxiestireno, esta reacción es catalizada por la enzima ácido ferúlico decarboxilasa, es una enzima constitutiva, ya que su producción no se ve afectada por la presencia de ácido ferúlico en el medio de cultivo, no requiere cofactores, ni la adición de iones metálicos para la completa actividad de la enzima, ni contiene ningún grupo prostético. Esta enzima también decarboxila el ácido 4-hidroxicinámico pero no los ácidos 2- ó 3-hidroxicinámico, lo cual indica que es necesario un grupo hidroxilo en posición *para* al ácido carboxílico a la cadena lateral insaturada para la reacción enzimática. Este requerimiento también lo presentan otras enzimas como la *p*-cumarato decarboxilasa de *Cladosporium phlei* y la vanillato hidroxilasa de *Sporotrichum pulverulentum* y la oxidasa del alcohol vanilílico de *Penicillium simplicissimum*.

b) **Ácido *p*-cumárico:** El ácido cumárico es degradado vía ácido hidroxibenzoico por la cepa *Pseudomonas putida* WCS358. La proteína ácido *p*-cumárico decarboxilasa (PDC) expresada por el gen *pdc* con una estructura monocistrónica, es capaz de metabolizar sólo los ácidos *p*-cumárico y cafeico. Esta enzima es totalmente distinta a las ácido *p*-cumárico y ferúlico decarboxilasas aisladas de *Bacillus pumilus* y de *Pseudomonas fluorescens* (Cavin y col., 1997).

I.3.2.4.3. Rutas catabólicas para la degradación de ácido benzoico y sus derivados

a) **Ácidos hidroxibenzoicos:** Hay tres isómeros de hidroxibenzoatos, y que los cuales son degradados tras hidroxilación, reacción catalizada por enzimas diferentes para cada uno de los isómeros. Estas enzimas son flavoproteínas que actúan como monooxigenasas y que requieren piridín nucleótido reducida (NAD(P)H) para la reacción. Así, la enzima que hidroxila el 4-hidroxibenzoato, la 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa, *m*-hidroxibenzoato hidroxilasa y la salicilato monooxigenasa catalizan la hidroxilación de 4-, 3- y 2-hidroxibenzoato, respectivamente. En la figura I.3.14 se presenta la reacción que cataliza la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa. Un amplio espectro de microorganismos del suelo parecen ser capaces de llevar a cabo esta reacción o el mismo tipo de reacción con NADH (Dimarco y Ornston, 1994; Entsch, ; Nishikawa y col., 1998).

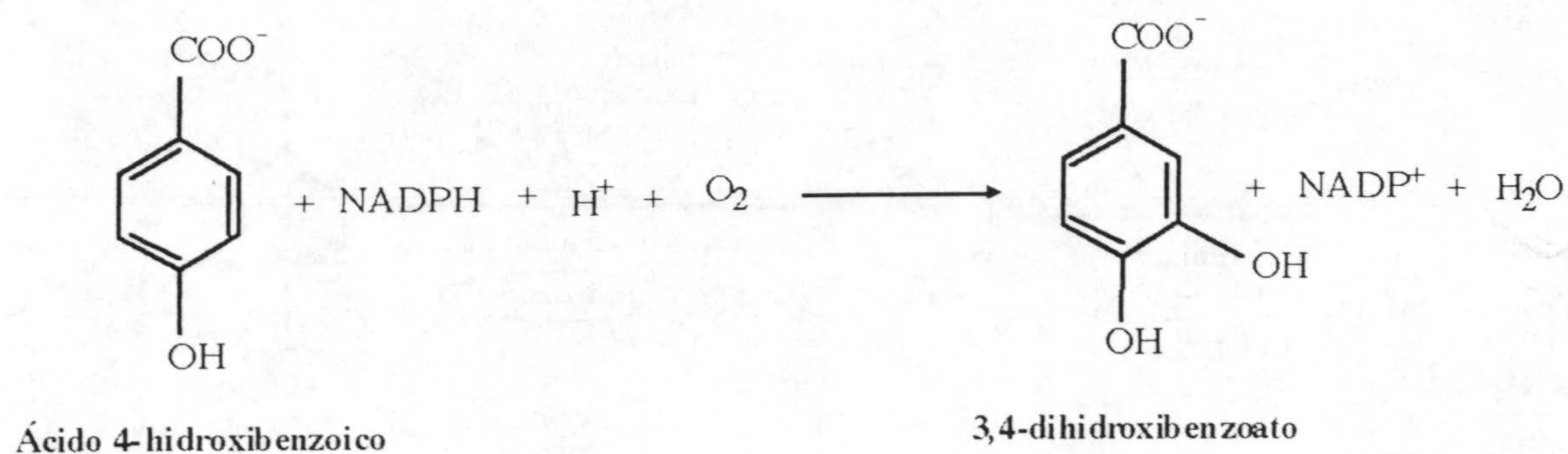


Figura I.3.14. Reacción catalizada por la enzima p-hidroxibenzoato hidroxilasa.

b) **Ácido gentísico y homogentísico:** En el caso del ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) u homogentísico, cuyos dos grupos hidroxilo están en posición *para*, la apertura del anillo entre el carbono 1 y 2 se produce por la acción de la gentisato 1,2-dioxigenasa u homogentisato 1,2-dioxigenasa. Las reacciones de división del anillo de gentisato y homogentisato son fisión *meta*. Las enzimas de fisión del anillo son generalmente proteínas multiméricas consistiendo en una especie de polipéptido simple, aunque la protocatecuato 3,4-dioxigenasa de especies de *Pseudomonas* están compuestas por dos diferentes polipéptidos.

c) **Ácido vanílico y ácido verátrico:** La ruta degradativa de la vainillina se conoce bien (figura I.3.15), el éter metílico aromático es demetilado via hidroxilación, generando un hemiacetal inestable, el cual se descompone a ácido protocatéquico y formaldehído. Se conocen los genes implicados en la bioconversión de vainillina a protocatecuato, éstos son *vdh*, *vanA*, y *vanB*. Esta bioconversión es llevada a cabo por la cepa *Pseudomonas* sp. HR199. Estos fueron identificados como una nueva vainillina dehidrogenasa (*vdh*) y dos subunidades de una vanillato demetilasa (*vanA* y *vanB*), respectivamente. La transferencia de estos genes *vdh*, *vanA*, y *vanB* a otra cepa, por ejemplo, *Alcaligenes eutrophus* y a otras cepas diferentes de *Pseudomonas*, las cuales son incapaces de utilizar vainillina o vainillato como fuente de carbono, confiere la capacidad de crecer a estas bacterias sobre estos sustratos (Priefert y col., 1997).

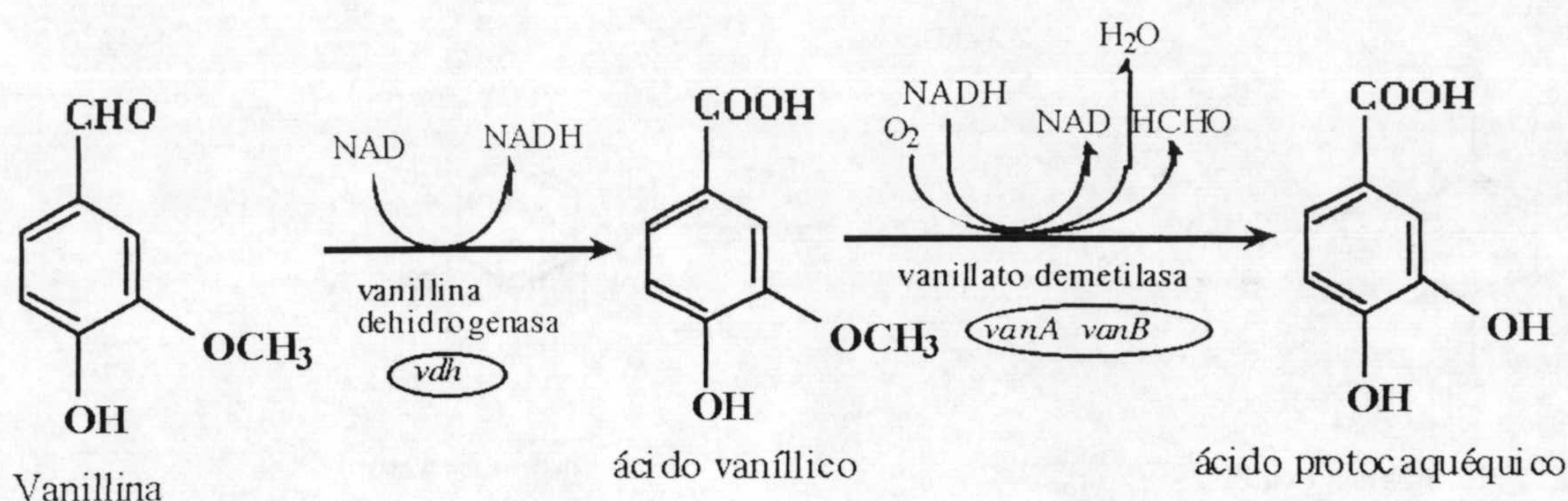


Figura I.3.15. Ruta catabólica de vanillina por la cepa *Pseudomonas* sp. HR 199.

La reacción catalizada por las proteínas VanA y VanB implica la monooxigenación a ácido vanílico demetilado con NAD(P)H como donador de electrones, produciendo ácido protocatéquico y formaldehído. Las proteínas VanAB son también responsables para la demetilación de ácido vanílico a protocatecuato en *Pseudomonas* sp. ATCC 19151 y *Pseudomonas* sp. HR199. La proteína VanA es la monooxigenasa y VanB es la reductasa dependiente de NADH del sistema enzimático.

El ácido verátrico es también degradado por las proteína VanA y VanB; este compuesto es mineralizado vía ácido protocatéquico, inicialmente requiere dos reacciones de demetilación si comparamos con el ácido vanílico que solo requiere una. VanAB catalizan la demetilación de ambos grupos metoxi en el sustrato ácido verátrico.

El operon *vanAB* se expresa sólo cuando ciertos ácidos aromáticos están presentes en el medio de cultivo; por ejemplo ácido vanílico y ácido protocatéquico; sin embargo el ácido ferúlico no es un inductor (Venturi y col., 1998).

Pseudomonas aeruginosa es capaz de crecer en vanillato, y posteriormente puede *o*-demetilar varios 3-metoxibenzoatos, la reacción implica una monooxigenasa, sin embargo no es capaz de crecer o demetilar el ácido 4-metoxibenzoico. *Pseudomonas testosteroni* después de crecer en vanillato es capaz de demetilar ambos 3- y 4-metoxibenzoatos. Sólo en conciciones anaeróbicas se puede mostrar la actividad demetilasa de *Pseudomonas testosteroni* y es un complejo de al menos dos fracciones de proteínas las cuales parecen ser sensibles al oxígeno. Esta cepa es capaz de oxidar el veratrato consumiendo 4 moles de O₂, presenta un espectro más amplio de actuación que *Pseudomonas aeruginosa* (Ribbons, 1971).

d) **Ácido 4-metoxibenzoico:** La 4-metoxibenzoato *o*-demetilasa se aisló de *Pseudomonas putida* y fue separada en dos componentes, una monooxigenasa oligomérica denominada putidamonooxina y la NADH-putidamonooxina oxidoreductasa, una proteína conjugada que contiene centro sulfo férrico y FMN como un grupo prostético. Ésta última se inactiva en ausencia del sustrato 4-metoxibenzoato y su activación total depende de iones Fe^{2+} y en la presencia de grupos sulfidrilo. (Bernhardt y col., 1975; Bernhardt y Meisch, 1980).

I.3.2.4.4. Rutas catabólicas para la degradación de derivados del ácido fenilacético

a) **Ácido DL- α -fenilhidracrílico:** El ácido DL- α -fenilhidracrílico es degradado en una reacción oxidativa inicial vía fenilacetaldehído y posteriormente es convertido en el ácido fenilacético. Las enzimas responsables de este catabolismo son la fenilhidracrílico dehidrogenasa y fenilacetaldehído dehidrogenasa, respectivamente. El ácido fenilacético es hidroxilado principalmente vía 3-hidroxifenilacético a homogentisato. Sin embargo, el ácido 3-hidroxifenilacético no es metabolizado vía homoprotocatecuato como se describe para *Escherichia coli*, (Cooper y Skinner, 1980).

Las cepas que son capaces de crecer en ácido DL- α -fenilhidracrílico, ácido fenilacético y 3-hidroxifenilacético tienen una 3-hidroxifenilacético hidroxilasa inducible. Ácido 3-hidroxifenilacético es hidroxilado a ácido homogentísico. La actividad para la fisión del anillo fue debida a una enzima, la homogentisato dioxigenasa, la cual es inducida durante el crecimiento en ácido DL- α -fenilhidracrílico, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido fenilacético pero no para una homoprotocatecuato dioxigenasa.

Flavobacterium JS-7 también degrada 4-hidroxifenilacético vía ácido homogentísico. El homogentisato es dividido por una dioxigenasa inducible a maleilacetoacetato (figura I.3.16) (van den Tweel y col., 1988).

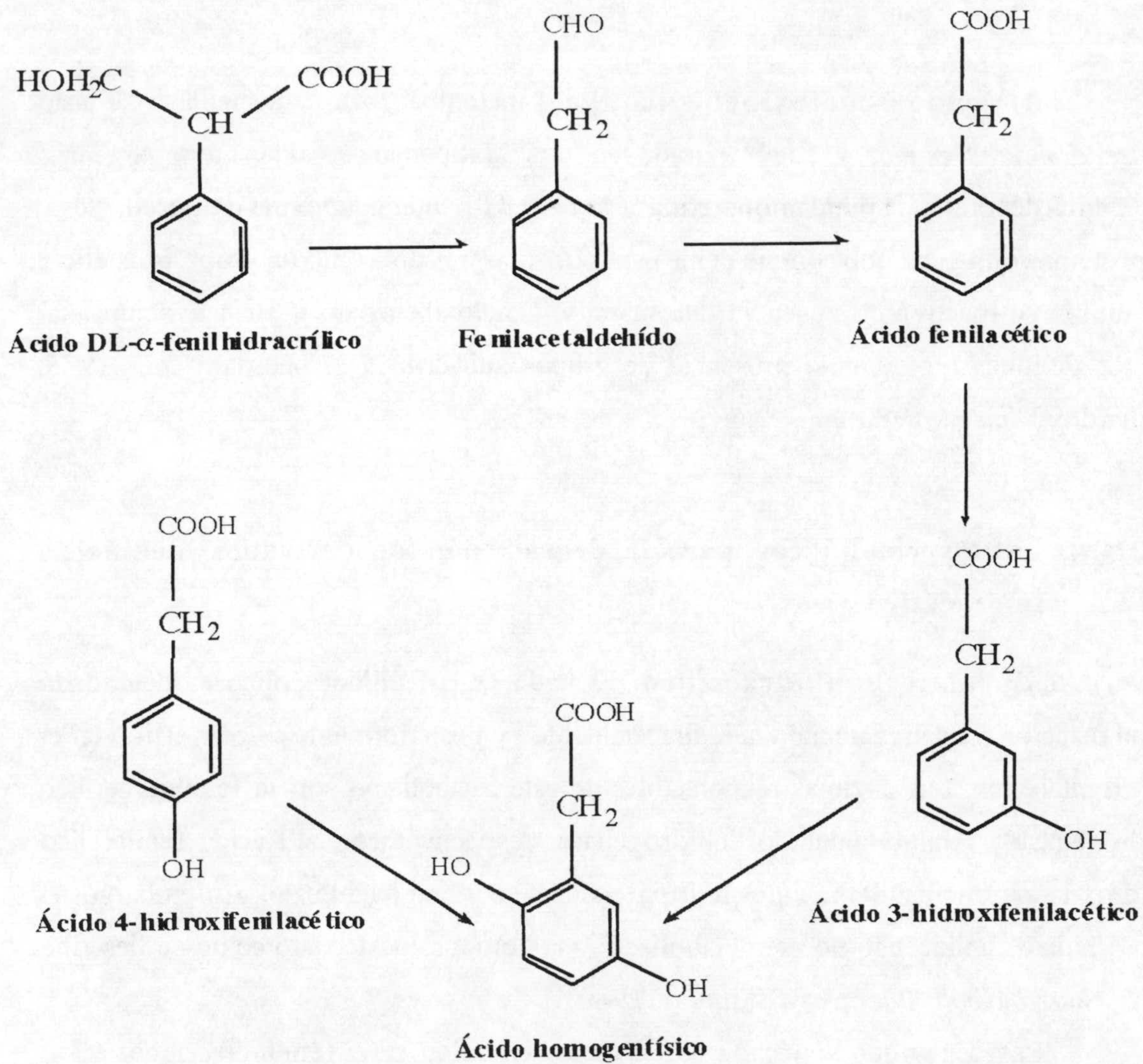


Figura I.3.16. Ruta propuesta para el metabolismo del ácido DL- α -fenilhidracrílico, ácido fenilacético y los ácidos 3- y 4-hidroxifenilacético en *Flavobacterium JS-7*.

b) **Ácidos 3-, 4-hidroxifenilacético:** Las rutas metabólicas que emplean los microorganismos para la degradación aeróbica del ácido 4-hidroxifenilacético son dos; la primera secuencia de reacciones es iniciada por una hidroxilación para dar ácido homogentísico, el cual es convertido en fumarato y acetoacetato. En la segunda ruta la hidroxilación del ácido 4-hidroxifenilacético da ácido 3,4-dihidroxifenilacético (ácido homoprotocatéquico), y entonces sufre oxidación catalizada por una dioxigenasa.

El ácido 4-hidroxifenilacético es catabolizado por la cepa *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* a dióxido de carbono, succinato y piruvato (figura I.3.17).

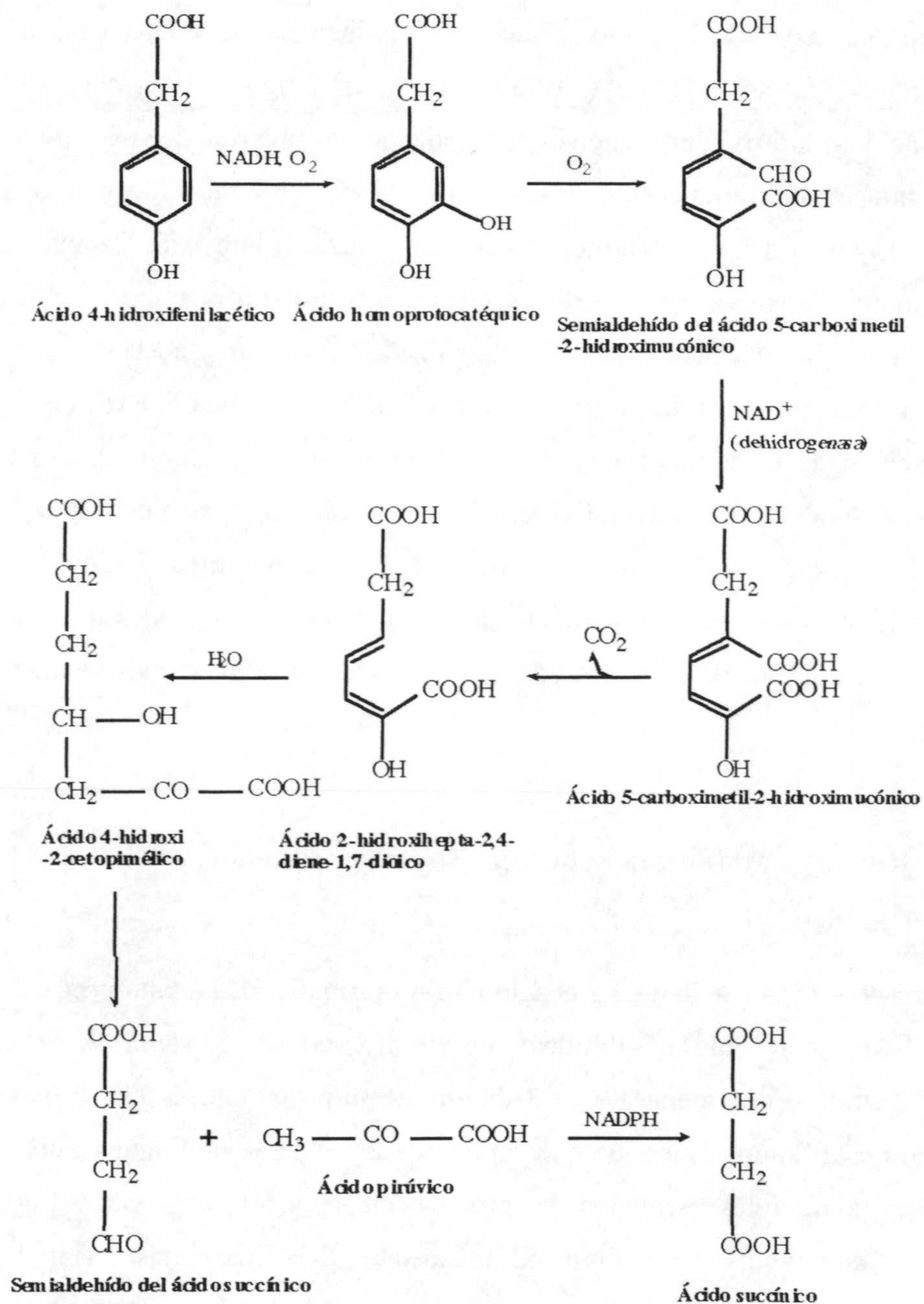


Figura I.3.17. Ruta catabólica de 4-hidroxifenilacético y homoglutámico por las cepas *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida*.

La homoglutamateo 2,3-dioxigenasa presenta un perfil de especificidad de sustrato restringido, con poco o ninguna actividad contra catecol y 4-metilcatecol y baja actividad contra ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico. Tampoco ataca al ácido 2,3,4-

trihidroxifenilacético y este compuesto inhibe la oxidación de homoprotocatecuato. Este comportamiento contrasta con la protocatecuato 4,5-oxigenasa, la cual oxida al ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico) (Nordlund y *col.*, 1990; Spornins y *col.*, 1974).

El ácido 4-hidroxifenilacético es catabolizado por una ruta de fisión *meta*, con 3,4-dihidroxifenilacetato como compuestos de la fisión del anillo idéntica a varias *Pseudomonas* y *Acinetobacter* sp. También puede catabolizar 3-hidroxifenilacético por la misma ruta, mientras que este compuesto es hidroxilado por otros microorganismos a través de 2,5-dihidroxifenilacético el cual es catabolizado a fumarato y acetato.

La ruta degradativa de 3- y 4-hidroxifenilacético implica 8 enzimas, siendo una de las secuencias catabólicas más largas descritas para *E. coli*. Las enzimas implicadas en la ruta de degradación de los ácidos 3- y 4-hidroxifenilacético son la 3- y 4-hidroxilasa, 3,4-dihidroxifenilacetato dioxigenasa, 5-carboximetil-2-hidroximónico semialdehído dehidrogenasa, y seguidamente una secuencia de reacciones que implican decarboxilación, hidratación y división aldólica y finalmente la succinato semialdehído dehidrogenasa.

I.3.2.4.5. Rutas catabólicas para la degradación del ácido 3-fenilpropiónico

E. coli es capaz de degradar el ácido 3-fenilpropiónico. La ruta procede vía la división extradiólica del ácido 2,3-dihidroxifenilpropiónico. El gen *mhpB* es el que expresa la enzima dioxigenasa (2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa) responsable para esta fisión, éste gen es dependiente de Fe^{2+} . Se distinguen subfamilias de dioxigenasas extradióles, tenemos la protocatecuato 4,5-dioxigenasa (LigB) de *Pseudomonas paucimobilis*, 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenasa (HpcB) de *Escherichia coli* y una enzima dioxigenasa, cuyo gen es *mpcI*, de *Alcaligenes eutrophus*.

Estas enzimas pueden catalizar o actuar sobre los substratos, 2,3-dihidroxifenilpropionato, 3-etilcatecol, 3-propilcatecol, 3-fenilcatecol. Tiene gran importancia la presencia de grupos hidroxilo catecólicos ya que ni el 2,3-dimetoxifenilpropiónico ni el 2-aminofenol fueron aceptados como substratos. También fue aceptado como substrato el ácido 2,3-dihidroxicinnámico (Emma L. Spence y *col.*, 1996).

I.3.2.4.6. Rutas catabólicas para la degradación de flavonoides presentes en el alpechín

Flavonoides son metabolizados por algunas especies mediante la fisión de anillo C de la molécula, manteniendo los anillos A y B en todos los metabolitos, mientras que hay otras especies en las que presentan un mecanismo inespecífico de degradación y presenta metabolitos en los que no se conservan los anillos A y B. Cuando los flavonoides están sustituidos con grupos hidroxilo en posiciones 5 y 7 puede dar lugar a floroglucinol por la cepa del género *Rhizobium* con anillo A conservado, mientras que con un solo grupo hidroxilo sustituido en posición 7 se obtiene resorcinol. Se ha descrito un amplio espectro de estructuras derivadas del anillo B, así tenemos los ácidos *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, fenilacético y cafeico. Quercetin es degradado por *Rhizobium leguminosarum* mediante división del anillo C dando floroglucinol y ácido protocatéquico como productos de degradación con el anillo A y B intactos. También es degradada por *Pseudomonas putida* mediante división del anillo A dando ácido oxaloacético y protocatéquico como productos de degradación. Luteolin es degradado por *Rhizobium meliloti* mediante ruptura del anillo C y produciendo como metabolitos floroglucinol, ácido floroglucinol carboxílico, ácido cafeico, ácido protocatéquico y ácido fenilacético. El genistein es degradado por *Rhizobium fredii* también mediante ruptura del anillo C dando ácido floroglucinol carboxílico, ácido *p*-cumárico y ácido *p*-hidroxibenzoico como metabolitos. Otros flavonoides degradados son naringenin, 7,4'-dihydroxiflavona y daidzein. En el mecanismo de degradación de estos compuestos el primer paso es normalmente la fisión del anillo C. Las cepas del género *Rhizobium* degradan un amplio espectro de flavonoides por una fisión primera localizada exclusivamente en los anillos C de los compuestos. Este tipo de catabolismo de flavonoides ocurre también en cepas de *Clostridium* y en algunas especies de *Eubacterium*. Otras cepas bacterianas capaces de degradar este tipo de compuestos como *Agrobacterium tumefaciens* siguen otro tipo de mecanismo diferente (Raghavendra-Rao y Cooper, 1994).

Hemos visto la gran capacidad de los microorganismos para eliminar sustituyentes de un anillo aromático. Las reacciones de dehidroxilación, demetoxilación y decarboxilación las cuales eliminan estos sustituyentes pueden tener lugar aeróbica o

anaeróbicamente. Sin embargo, se ve que un anillo con un grupo metoxilo en la posición 3 es más susceptible a la división que uno con un grupo metoxilo en la posición 4. Por ejemplo el ácido vanílico y el ácido ferúlico fueron más accesibles a la demetoxilación que sus isómeros; y parece que la presencia de un grupo carboxilo no es necesaria para la demetoxilación como se puede ver en el guaiacol que es demetoxilado a catecol. La eliminación de grupos metoxilos ocurre también en compuestos más complejos como flavonoides e isoflavonoides.

OBJETIVOS

O. OBJETIVOS

En la actualidad son cada vez más los compuestos producidos por la actividad industrial, agrícola y urbana del hombre. En el proceso de extracción del aceite de oliva se obtienen aguas residuales, conocidas como alpechín, que constituyen uno de los problemas más importantes de contaminación medioambiental en la cuenca del Mediterráneo. Su principal problema deriva de su composición química, en particular de su contenido en compuestos aromáticos de naturaleza polifenólica los cuales presentan una importante actividad antimicrobiana y efecto fitotóxico. Han sido muchas y variadas las soluciones propuestas a este problema de contaminación pero ninguna de ellas ha sido completamente eficaz respecto a rendimiento, consumo de energía y coste económico.

Dada la gran cantidad de microorganismos que existen en la naturaleza, y que muchos son capaces de metabolizar compuestos químicos producidos por el hombre, este trabajo se concibió como un primer paso hacia un tratamiento biológico del alpechín. El éxito de los tratamientos de descontaminación, requieren conocer específicamente la composición química de los residuos, así como disponer de una serie de microorganismos apropiados para la eliminación del (de los) contaminante (s) en cuestión. En este sentido los objetivos de este trabajo de investigación fueron:

- 1) Caracterización química del alpechín y otros derivados de la molturación de aceituna en la obtención de aceite de oliva.
- 2) Aislamiento de microorganismos adecuados que sean capaces de utilizar los compuestos presentes en el contaminante como fuente de carbono y energía.
- 3) Caracterización inicial de algunas de las rutas catabólicas seguidas en el proceso de biodegradación de ciertos compuestos presentes en el alpechín.
- 4) Estudio de la organización de los genes implicados en la ruta de degradación del ácido *p*-hidroxifenilacético por microorganismos aislados en este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. TÉCNICAS GENERALES

A.1. INSTRUMENTACIÓN Y TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

A.1.1. PUNTOS DE FUSIÓN

Fueron determinados en tubos capilares en un aparato electrotérmico de análisis de punto de fusión tipo TOTTOLI.

A.1.2. ESPECTROS DE IR

Se realizaron en espectrofotómetros PERKIN-ELMER, modelo 983G. Las muestras se disolvieron en CHCl_3 y se prepararon en película líquida.

A.1.3. ESPECTROS DE RMN- ^1H

Se realizaron en espectrómetros BRUKER AMX 300 (300 MHz), BRUKER ARX 400 (400 MHz) y BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando TMS como referencia interna, y CDCl_3 , CD_3OCD_3 , DMSO-d_6 , D_2O y D_3COD como disolventes. Los desplazamientos químicos (escala δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). La multiplicidad de las señales se indica con las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuadruplete; q, quintuplete; dd, doble doblete; ddd, doble doblete; dt, doble triplete; m, multiplete; empleando la letra "a" para indicar que la señal es ancha.

A.1.4. ESPECTROS DE RMN- ^{13}C

Se realizaron en espectrómetros BRUKER AMX 300 (75 MHz), BRUKER ARX 400 (100 MHz), BRUKER AMX 500 (125 MHz) utilizando TMS como referencia interna y CDCl_3 , CD_3OCD_3 , DMSO-d_6 , D_2O y D_3COD como disolventes. Los desplazamientos químicos (escala δ) se expresan en partes por millón (ppm). El grado de sustitución de los carbonos se estableció con la secuencia de pulsos DEPT 135°.

A.1.5. ESPECTROS BIDIMENSIONALES DE RMN (RMN-2D)

Se realizaron en un espectrómetro BRUKER ARX 400 (^1H 400MHz/ ^{13}C 100 MHz) y AMX 500 (^1H 500MHz/ ^{13}C 125 MHz) utilizando TMS como referencia interna, y como disolventes CDCl_3 , CD_3OCD_3 , DMSO-d_6 , D_2O y D_3COD . Los programas de secuencias de pulsos usados pertenecen a la librería BRUKER (1994).

Correlación homonuclear directa ^1H - ^1H (COSY). Se realizaron con la secuencias de pulsos COSY90, y COSYDQF.

Correlación homonuclear NOESY. Se realizaron con la secuencia de pulsos NOESYST.

HETCOR. Correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C . Se realizaron con las secuencias de pulsos HXCO, HXDEPT e INV4GS.

Correlación heteronuclear a larga distancia ^1H - ^{13}C (HMBC). Se realizaron con las secuencias de pulsos INV4LPLRND.

HOHAHA. Se realizaron con la secuencia de pulsos MLEVFP.

A.1.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo líquido HEWLETT-PACKARD 1050 equipado con un detector de diodo array HEWLETT-PACKARD. Se empleó una columna de 10 cm de largo, 0,46 cm de ancho, rellena con Hypersil-C18-ODS y tamaño de partícula 5 μm . La carga de inyección (20 μL) se obtuvo con un inyector automático HEWLETT-PACKARD 1050. Como fase móvil se utilizó un gradiente constituido por una solución acuosa 13,5 mM de ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo (ACN) de manera que la elución se inició con la solución de TFA 13,5 mM pasando a los 6 minutos a una mezcla constituida por 40% (v/v) de la solución 13,5 mM de TFA y 60% (v/v) de ACN, manteniéndose, esta mezcla constante durante 4 minutos más (el tiempo de análisis fue de 10 minutos). El flujo de la fase móvil fue de 1mL/min y los compuestos se detectaron a 230 nm y 254 nm.

A.1.7. CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Se realizó en un cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD 5890A, equipado con un detector de ionización de llama y con una columna capilar HP-1 de 25 m x 0,32 mm y 0,52 μm de espesor de película, con fase estacionaria ligada de metil silicona. Para el análisis de las muestras se utilizaron las siguientes condiciones: 15 Psi de presión en cabeza de columna; como gas portador y gas auxiliar se utilizó N_2 cuyos flujos fueron 1 mL/min y 24 ml/min, respectivamente; la temperatura del inyector fue de 200°C y la del detector de 250°C.

La rampa de temperatura utilizada fue la siguiente: La temperatura inicial del horno fue de 100°C, la cual se incrementó a razón de 5°C/min hasta alcanzar 250°C 30 minutos más tarde, que fue el tiempo de análisis de las muestras.

A.1.8. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EIMS)

Se realizaron en diversos espectrómetros de masas disponibles en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, en el Departamento de Química Orgánica de dicha Universidad y en este grupo de investigación. Cuando la inyección fue directa se utilizaron los espectrómetros de masas Platform II y AutoSpec de Micromass y Carlo Erba GC 8000, respectivamente.

Cuando las muestras se introdujeron a través de un cromatógrafo de gases se utilizó un cromatógrafo HEWLETT-PACKARD modelo 5890 ó 6890 equipados con columnas capilares de 25 m x 0,2 mm, HP-1 (la fase estacionaria ligada de metil silicona y 0,33 μm de espesor de película) ó una columna de 30 m x 0,25 mm, HP-5MS (la fase estacionaria 5% fenil metil siloxano y 0,25 μm de espesor de película). El gas portador fue He, y la ionización se realizó mediante impacto electrónico, empleando una energía de 70 eV (EMIE). Los espectrómetros de masas utilizados fueron un HEWLETT-PACKARD 5972A para el primer cromatógrafo de gases y un HEWLETT-PACKARD 6890 para el segundo cromatógrafo de gases.

Para el análisis de las muestras se utilizaron las siguientes condiciones: La presión de cabeza de columna fue 15 Psi; se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1 ml/min; la temperatura del inyector fue de 260°C y la del detector 280°C.

Se utilizaron dos tipos de rampas de temperatura (Tabla A.1) según que la muestra estuviese disuelta en éter dietílico (Programa A) o en acetona (Programa B).

Tabla A.1. Rampa de temperatura utilizada en cromatografía de gases-espectrometría de masas

PROGRAMA A			
Temperatura inicial (°C)	Gradiente de temperatura (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tiempo (minutos)
50	0	50	10
50	5	250	40
250	0	250	10

PROGRAMA B			
Temperatura inicial (°C)	Gradiente de temperatura (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tiempo (minutos)
50	5	250	40
250	0	250	10

A.1.9. DISOLVENTES

Como eluyentes se utilizaron hexano (H), cloruro de metileno (CM), cloroformo (C), *terc*-butilmetil éter y/o éter dietílico (E), acetato de etilo (A) y metanol (M). Cuando se utilizaron mezclas de estos disolventes se indica la proporción de cada uno de los componentes presentes en la mezcla.

A.1.10. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA CONVENCIONAL

Se utilizó sílica gel MERCK 60 con un tamaño de partícula de 0,063-0,200 mm (70-230 mallas ASTM), empleando de 40 a 100 g de SiO₂ por gramo de muestra a cromatografiar. La columna se empaquetó con una papilla formada por sílica gel y el disolvente que se utilizaría posteriormente en la elución. Si la elución se fuese a realizar con una mezcla de disolventes en el empaquetado se utilizó aquel de

menor polaridad. La muestra se introdujo disuelta en el eluyente, o bien adsorbida sobre una cantidad de sílica gel MERCK de tamaño de partícula 0,063-0,200 mm, doble de su peso. La elución se realizó en gradiente de polaridad creciente, y el curso de la separación se siguió mediante cromatografía en capa fina (CCF) y pesada de fracciones.

A.1.11. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA A PRESIÓN

Se utilizó sílica gel MERCK 60, con un tamaño de partícula de 0,040-0,060 mm (230-400 mallas ASTM) en una proporción de 10 a 20 g de sílice por gramo de muestra a cromatografiar. El empaquetado de la columna se llevó a cabo con ayuda del vacío proporcionado por un sistema de vacío EYELA A-3S y golpeando la columna con una goma de vacío de 3 cm de diámetro y 20 cm de longitud. El relleno de sílice en la columna no sobrepasó en ningún caso los 15 cm de altura. A continuación, el relleno de sílica gel se humectó con el disolvente de menor polaridad que se utilizaría en el caso de tratarse de una mezcla, y la muestra se introdujo en disolución en el mismo disolvente utilizado para humectar el relleno de la columna, o bien adsorbida en sílica gel MERCK 60, de tamaño de partícula 0,063-0,200 mm en una cantidad doble del peso de la muestra. La presión aplicada en la elución fue aproximadamente 3,0 Psi y se obtuvo con un compresor de aire, ésta se realizó en gradiente de polaridad creciente, siguiendo el curso de la separación mediante cromatografía en capa fina (CCF) y pesada de fracciones.

A.1.12. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

Se utilizaron placas de cromatografía en capa fina de MERCK de sílica gel 60 F₂₅₄. Tras la elución de los productos, la visualización de las manchas se realizó por exposición a vapores de I₂.

A.1.13. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA (CCFP)

Se utilizaron placas de cromatografía en capa fina preparativa de MERCK que se activaron por calor introduciéndolas en un horno a 120°C durante 3 horas. Tras

la elución y separación de los productos, la visualización de las bandas se llevó a cabo por exposición a luz ultravioleta (254 nm) en un transiluminador LKB C-61. La recuperación de la muestra se consiguió por filtrado en columna sobre sílica gel MERCK 60 (tamaño de partícula 0,063-0,200 mm) empleando como eluyente metanol.

A.2. REACCIONES GENERALES

A.2.1. ACETILACIÓN

Se disolvieron 100 mg del alcohol a acetilar en 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético (AcO_2). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente siguiéndose su curso por CCF. Una vez finalizada la reacción, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo picado, se dejó fundir y la mezcla final se extrajo con éter. La fase etérea se lavó sucesivamente con HCl 2 N, con disoluciones saturadas de NaHCO_3 y finalmente con H_2O hasta alcanzar la neutralidad. A continuación la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, y el disolvente se evaporó a vacío en un evaporador rotatorio BUCHI hasta sequedad, obteniéndose el producto acetilado.

A.2.2. ESTERIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS CON DIAZOMETANO

La esterificación se realizó con CH_2N_2 en éter generado por el tratamiento de N-metil-N-nitroso-4-toluénsulfonamida con KOH/Metanol (MeOH) al 10% (p/v). Las cantidades de los reactivos empleados para generar el diazometano necesario para metilar un gramo de ácido, fueron: 1,25 g de N-metil-N-nitroso-4-toluénsulfonamida en 7 mL de éter; 5 mL de disolución de KOH/MeOH al 10% (p/v). El procedimiento seguido fue el siguiente: en un matraz esférico de dos bocas, provisto de un embudo de adición y montaje para destilación, se colocó la N-metil-N-nitroso-4-toluénsulfonamida disuelta en el volumen adecuado de éter. Sobre esta disolución, sometida a agitación magnética, se adicionó gota a gota la solución de KOH/MeOH al 10% (p/v), siendo arrastrado el diazometano generado mediante el éter que destila; éste se recogió en el matraz que contenía la fracción ácida a metilar disuelta en éter. El flujo de diazometano se mantuvo uniforme regulando la temperatura del matraz generador.

A.2.3. REDUCCIÓN CON NaBH_4

La muestra a reducir se disolvió en metanol y se añadió BH_4Na en una proporción molar doble. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y la reacción se siguió por CCF. Cuando la reacción se dio por finalizada se evaporó el metanol del medio, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo o éter. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a vacío obteniéndose los correspondientes productos reducidos.

A.2.4. SAPONIFICACIÓN

La muestra a saponificar se trató con una disolución de KOH/MeOH 2 N a temperatura ambiente, empleando 20 mL de solución alcalina por gramo de sustrato. La reacción se siguió por CCF. Finalizada ésta se evaporó el metanol a vacío, se añadió agua y se extrajo varias veces con éter. La fase etérea se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a vacío recuperando así los productos neutros. La fase acuosa se aciduló con HCl 2 N hasta pH 3 y, a continuación se extrajo con éter repetidas veces. Esta fase etérea se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 y H_2O hasta neutralidad, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a vacío obteniéndose los correspondientes productos ácidos.

A.2.5. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE TRIMETILSILIL ÉSTERES

Se disolvió 1 mg de muestra a derivatizar en tetrahidrofurano (THF) y se añadieron 10 μL de *N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida*. La mezcla de reacción se mantuvo en un baño a 60°C durante 1 hora. La reacción se llevó a cabo bajo condiciones inertes con helio o nitrógeno.

A.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS DIFERENTES RESIDUOS QUE SE OBTIENEN EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

En el proceso de extracción del aceite de oliva se produce una gran cantidad de residuos tanto sólidos, líquidos como semisólidos, dependiendo del sistema de extracción utilizado. Si se utiliza el sistema continuo en tres fases se obtiene un residuo líquido que se conoce como alpechín y un residuo sólido conocido como orujo. En el caso de utilizar el sistema continuo de dos fases se obtiene un único residuo de una textura semisólida que se conoce con el nombre de "alpeorujo".

Se recogieron muestras de cada uno de estos residuos, y cada uno de ellos se analizó de forma similar, sometiéndolos a una serie de extracciones utilizando diferentes disolventes en orden creciente de polaridad previo tratamiento adecuado de los mismos.

A continuación se describen los diferentes tratamientos a los que se sometieron cada una de las muestras, y las condiciones de extracción de las mismas.

A.3.1. EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS PRESENTES EN ALPECHÍN EN DISTINTAS CONDICIONES DE pH

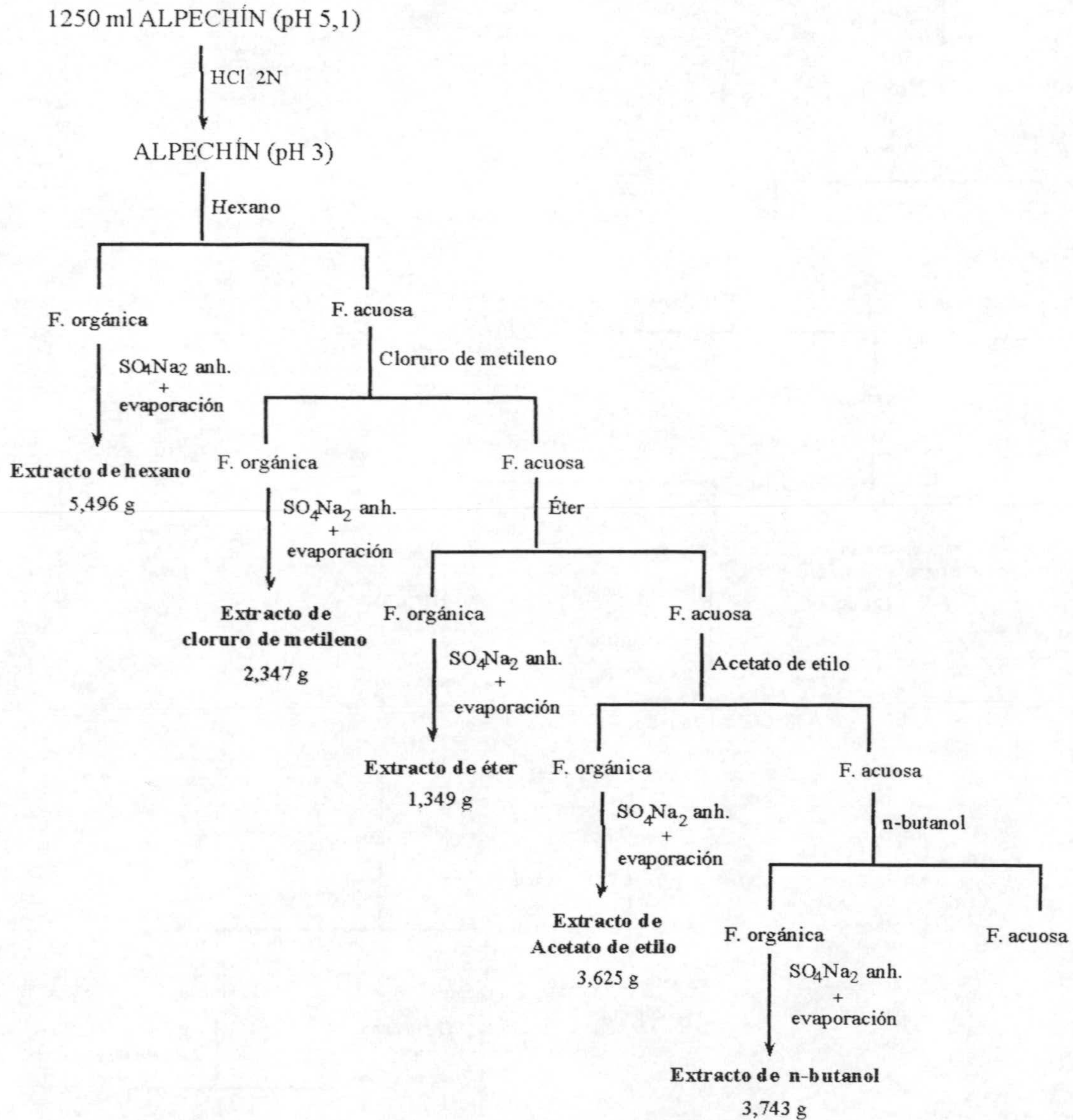
Las muestras de alpechín (pH 4,5 - 5,0) se recogieron frescas en la almazara Jimena S.A. en Pinos Puente, Granada (España) y se acidularon o no hasta pH 3,0 con una solución 2N de HCl. A continuación se sometieron a una serie de extracciones utilizando diferentes disolventes en orden creciente de polaridad, a saber, hexano, cloruro de metileno, éter dietílico, acetato de etilo y n-butanol.

En la primera extracción con hexano, siempre se formó una emulsión que se rompió por centrifugación a 1000 g durante 20 minutos en una centrífuga preparativa Sorvall RC5 y utilizando un rotor GSA prosiguiéndose posteriormente con el resto de las extracciones.

A continuación se citan los extractos obtenidos con los distintos disolventes y el peso de cada uno de ellos.

EXTRACCIÓN 1. (Esquema A.1) Mil doscientos cincuenta mililitros de alpechín con un pH inicial de 5,1 fueron acidificados hasta pH 3,0 y se procedió a su extracción

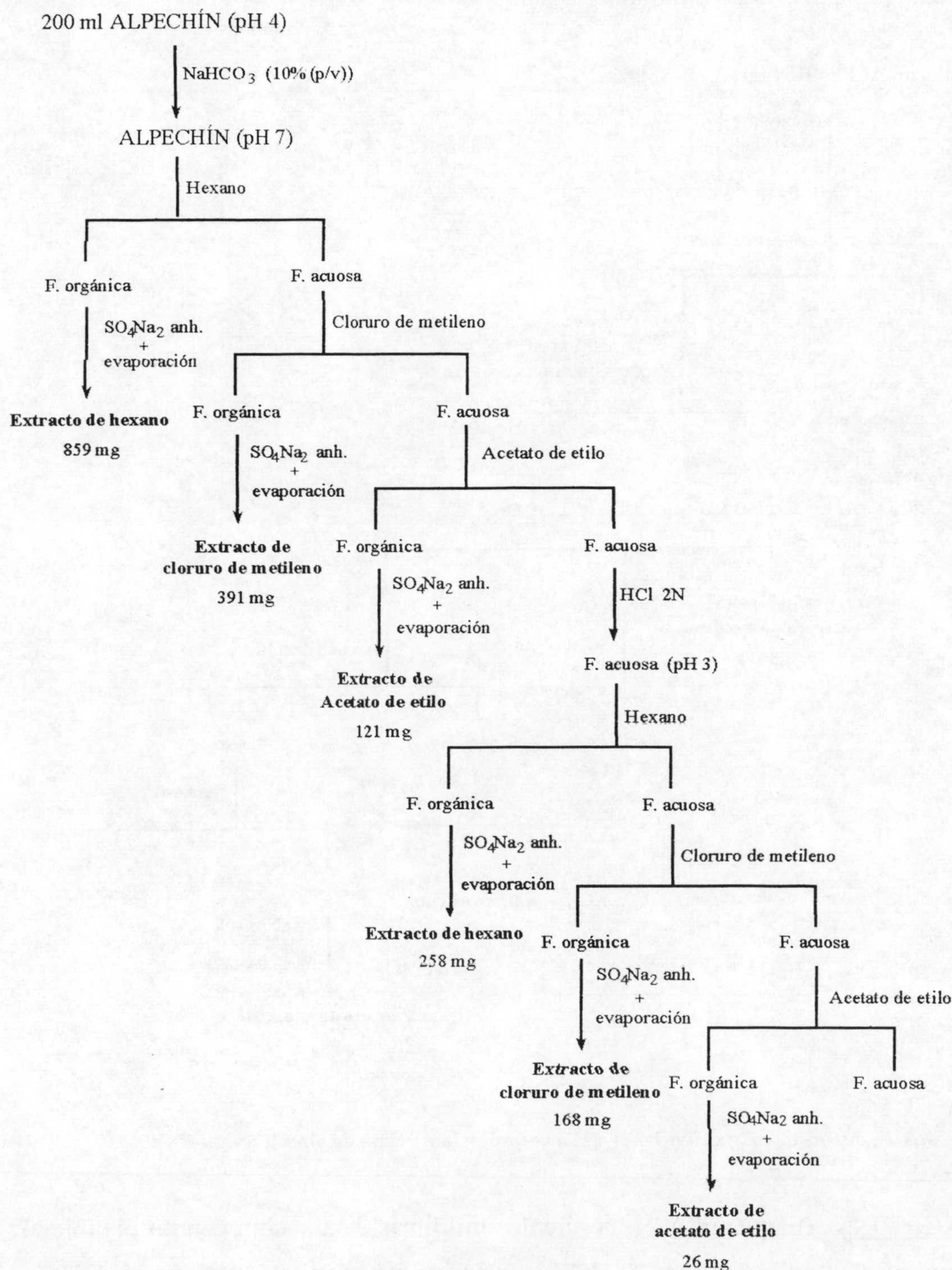
secuencial. Cada uno de los extractos obtenidos con los diferentes disolventes empleados se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporaron hasta sequedad a vacío en un evaporador rotatorio. Los extractos obtenidos fueron: extracto de hexano, 5,496 g; extracto de cloruro de metileno, 2,347 g; extracto de éter, 1,349 g; extracto de acetato de etilo, 3,625 g; y extracto de n-butanol, 3,743 g.



Esquema A.1. Esquema de extracción 1 llevado a cabo con la muestra de alpechín.

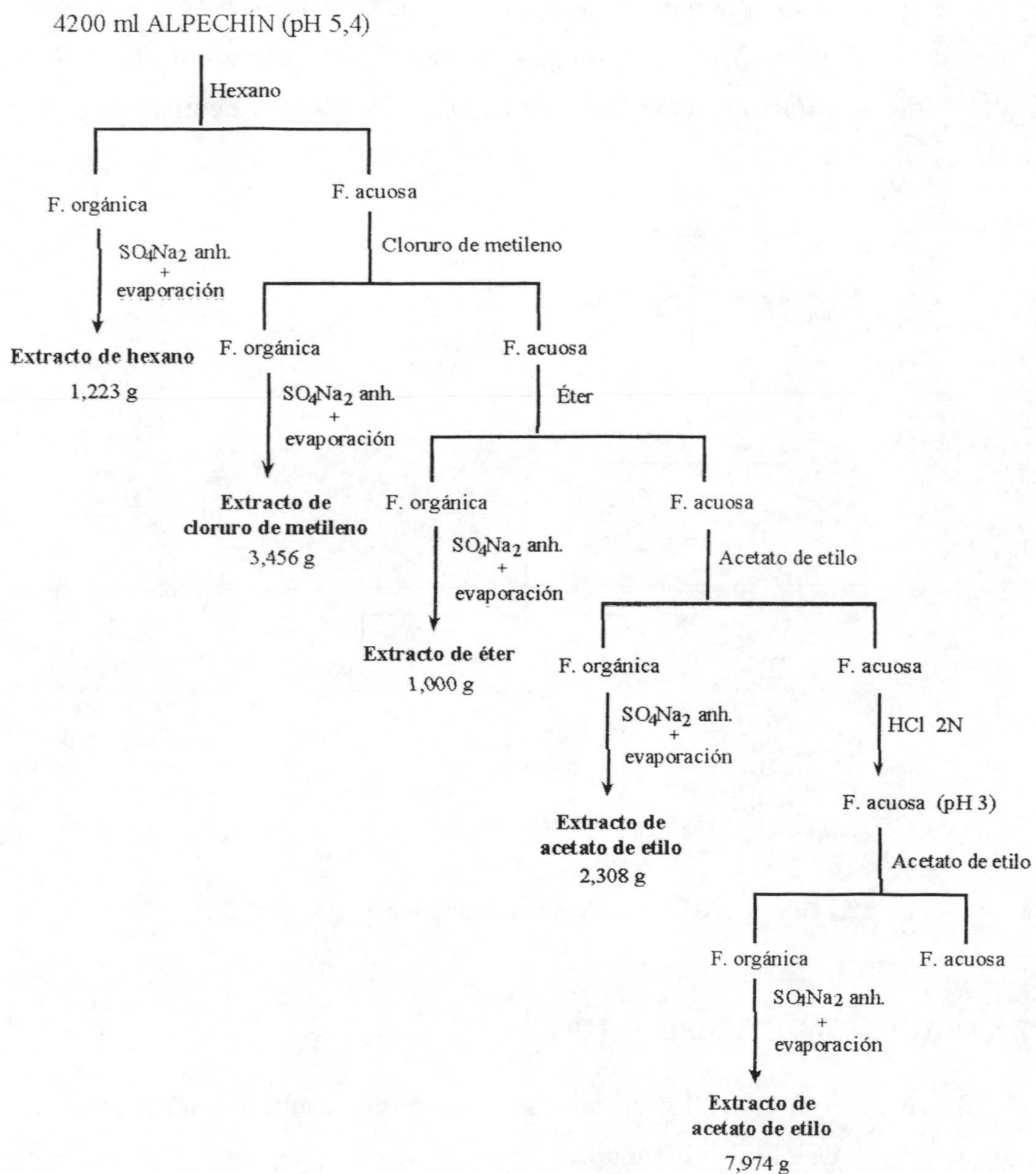
EXTRACCIÓN 2. (Esquema A.2) Doscientos mililitros de alpechín con un pH inicial de 4,0 fueron neutralizados con NaHCO_3 al 10% (p/v) hasta pH 7,0 y se realizó su extracción (extracción neutra) con hexano (859 mg), y a continuación con cloruro de

metileno y acetato de etilo obteniéndose 391 y 121 mg, respectivamente. A continuación la fase acuosa de la extracción neutra se acidificó con HCl 2 N hasta pH 3,0 (extracción ácida), y se reextrajo con hexano (258 mg), cloruro de metileno (168 mg) y acetato de etilo (26 mg).



Esquema A.2. Esquema de extracción 2 llevado a cabo con la muestra de alpechín.

EXTRACCIÓN 3. (Esquema A.3) Cuatro litros y doscientos mililitros de alpechín con un pH inicial de 5,4 se sometieron a una extracción a ese pH (extracción 3a). A continuación la fase acuosa resultante fue acidificada con HCl 2 N hasta pH 3,0 y se procedió a su extracción (extracción 3b). De la extracción 3a se obtuvieron del extracto de hexano, 1,223 g; del extracto de cloruro de metileno, 3,456 g; del extracto de éter, 1,000 g; y del extracto de acetato de etilo, 2,308 g. En la extracción 3b se llevó a cabo sólo la extracción con acetato de etilo y se obtuvieron 7,974 g.

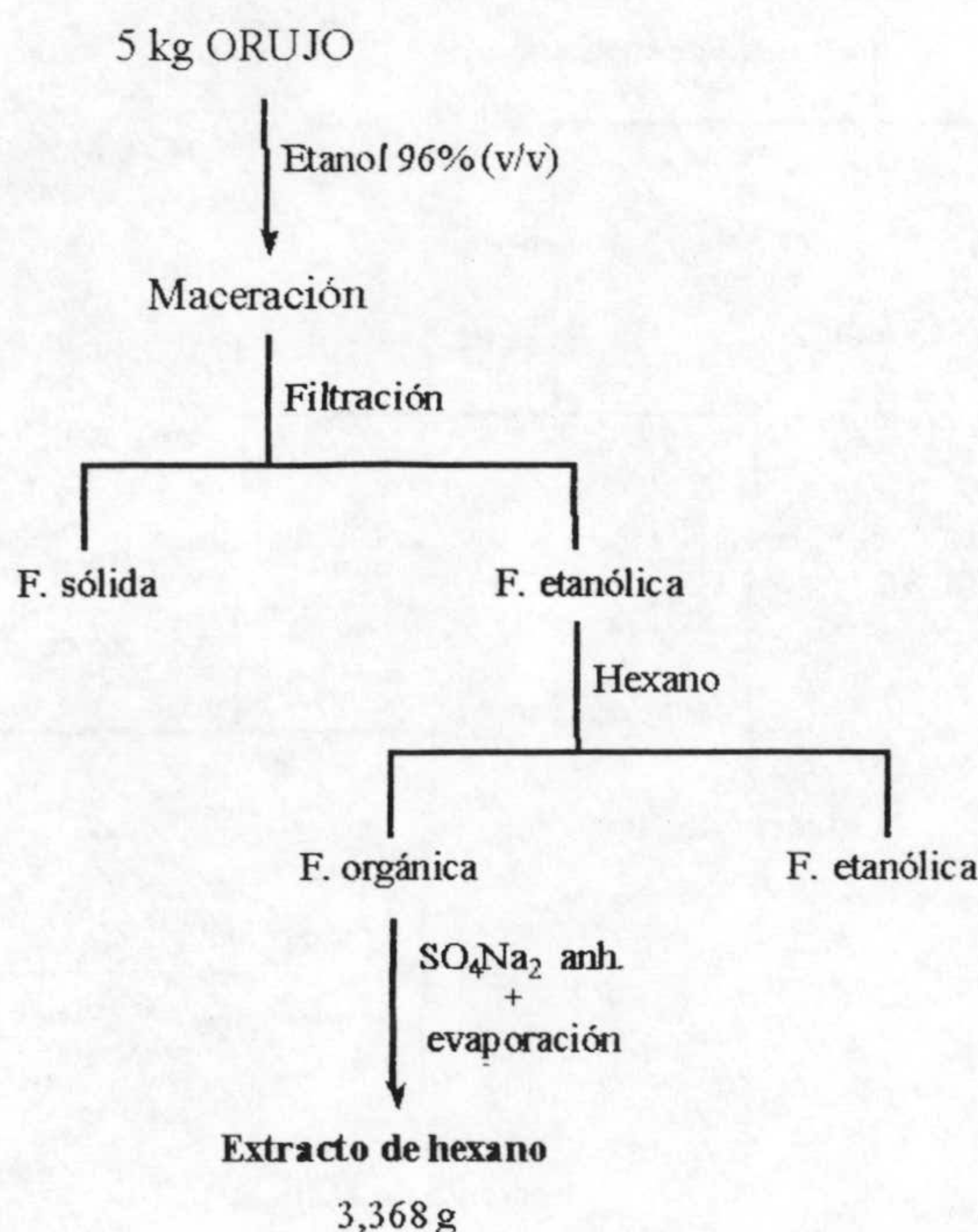


Esquema A.3. Esquema de extracción 3 llevado a cabo con la muestra de alpechín.

A.3.2. EXTRACCIÓN DE ORUJO

Diez kilogramos de orujo fueron recogidos de la almazara de Jimena S.A. en Pinos Puente, Granada. Cinco kilogramos de esta muestra fueron macerados en 10 l de etanol al 96% (v/v). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y se agitó ocasionalmente para facilitar la maceración. Transcurridas 48 horas la muestra se decantó y se filtró a través de un embudo de alambre.

La solución etanólica se extrajo con hexano varias veces. El extracto de hexano se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a vacío en un evaporador rotatorio hasta sequedad recogiendo 3,368 g de dicho extracto seco (esquema A.4). El análisis de RMN- ^1H de dicho extracto reveló señales de triglicéridos y señales correspondientes a triterpenoides.



Esquema A.4. Esquema del proceso seguido para la extracción de orujo.

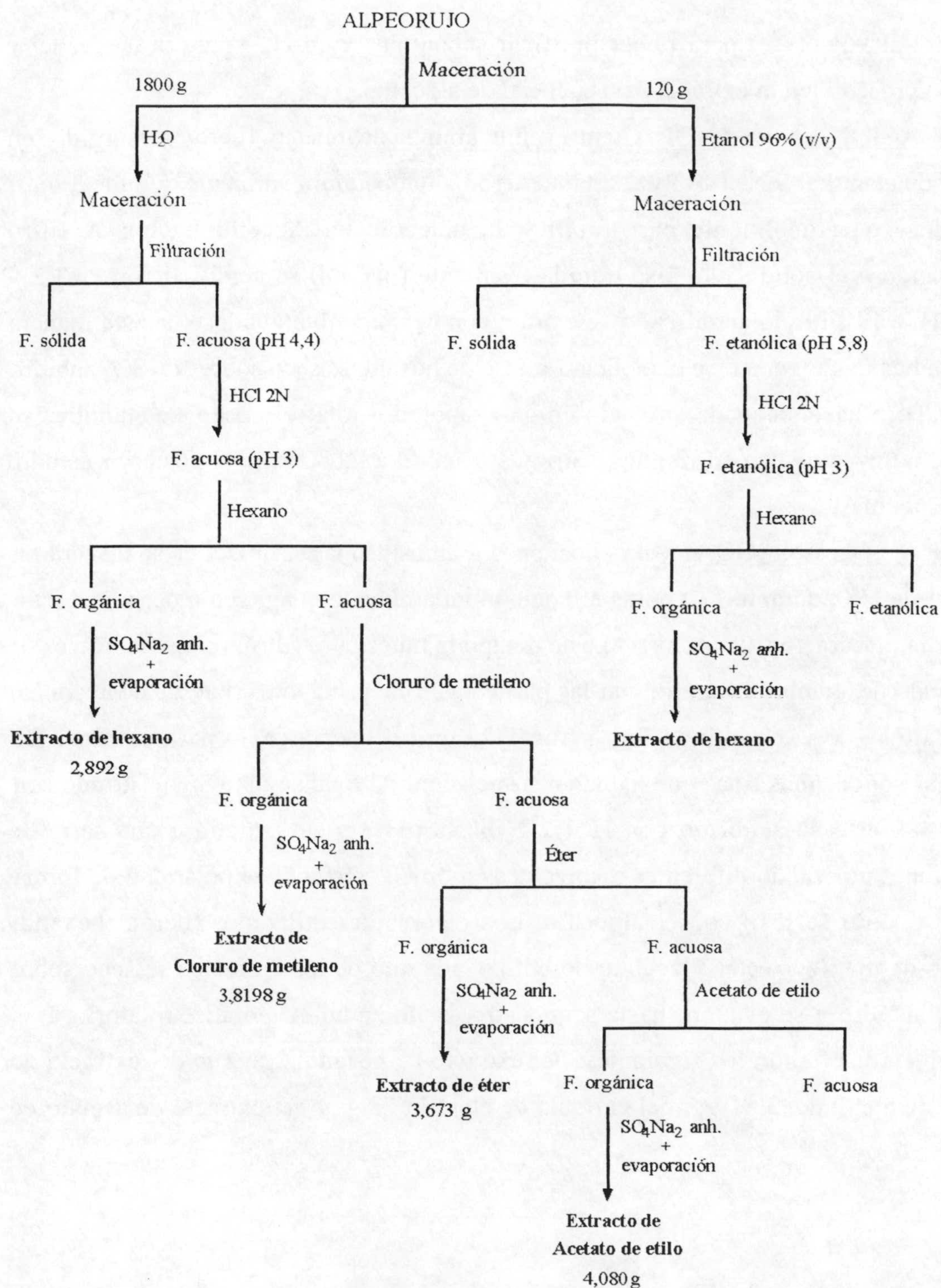
A.3.3. EXTRACCIÓN DE “ALPEORUJO”

Se recogieron 1,937 kg de residuo semisólido resultante del proceso de extracción de aceite de oliva utilizando el sistema en continuo en dos fases de la almazara Santo Cristo de la Vera Cruz de Villacarrillo, Jaén, (España). Para facilitar la extracción de los productos presentes en este residuo se procedió a macerar la muestra

en etanol al 96% (v/v) para poder purificar saponinas, y en H₂O para proceder tal y como se procedió en la extracción secuencial de alpechín.

MACERACIÓN EN ETANOL. Ciento veinte gramos de muestra fueron sumergidos en 400 ml de etanol al 96% (v/v) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 días, agitándose ocasionalmente para facilitar la maceración. A continuación se filtró descartándose el sólido y la fase líquida resultante (pH 5,8) se acidificó con HCl 2N hasta pH 3. El filtrado acidificado se extrajo con hexano, obteniéndose de esta manera una fase hexánica y una fase etanólica. La fase de hexano se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó hasta sequedad a vacío en un evaporador rotatorio. La fase etanólica se evaporó a través de una corriente de aire y se guardó a -20°C para el posterior estudio de las saponinas.

MACERACIÓN EN AGUA. Mil ochocientos gramos de masa semisólida se maceraron con 18 l de H₂O durante 120 horas a temperatura ambiente, y agitación ocasional para facilitar la maceración. Transcurrido este tiempo la muestra se filtró, primero a través de un embudo de alambre para eliminar las partículas sólidas mayores (huesos de aceituna, hojas, tallos ...), y a continuación a través de un buchner a vacío para eliminar las partículas sólidas más finas que había en suspensión. Al final se obtuvo un filtrado con un pH 4,4, éste se acidificó con HCl 2 N hasta pH 3 y se sometió a una serie de extracciones utilizando diferentes disolventes en orden creciente de polaridad de forma similar a cómo se hizo con el alpechín. Los disolventes utilizados fueron: hexano, cloruro de metileno, éter y acetato de etilo. Cada uno de los extractos se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó hasta sequedad a vacío en un evaporador rotatorio. Los pesos obtenidos fueron los siguientes: del extracto de hexano, 2,892 g; del extracto de cloruro de metileno, 3,819 g; del extracto de éter, 3,673 g; y del extracto de acetato de etilo, 4,080 g.



Esquema A.5. Esquema de las diferentes extracciones llevadas a cabo con la muestra de alpeorujó.

A.3.4. ANÁLISIS PRELIMINAR DE EXTRACTOS PROCEDENTES DE LA EXTRACCIÓN DE ALPECHÍN

Cada uno de los extractos obtenidos en los diferentes procedimientos y fraccionamientos de alpechín (Sección A.3.1.) fueron analizados por CCF utilizando como eluyente una mezcla de benceno:metanol:ácido acético (45:8:4) (v/v/v). En todos los extractos aparecieron manchas inespecíficas a diferentes valores de Rf, excepto en el extracto de acetato de etilo en el que, además de una mezcla de manchas inespecíficas, aparecieron manchas típicas de grupos ácido.

Los extractos anteriores también se analizaron por RMN-¹H. Estos análisis nos permitieron establecer el tipo de compuestos en cada muestra analizada. Así en el extracto de hexano (CDCl₃) se detectaron ácidos grasos esterificados con glicerol; en el extracto de cloruro de metileno (CDCl₃) aparecieron señales que correspondieron a compuestos aromáticos tipo flavonas, así como compuestos aromáticos sustituidos con grupos aldehído y metoxilos; en el extracto de éter (CD₃OCD₃) aparecieron señales que correspondieron a compuestos aromáticos con grupos aldehído, metoxilo, hidroxilo, y cadenas alquílicas con y sin dobles enlaces. En el extracto de acetato de etilo (CD₃OCD₃) se observaron señales de compuestos aromáticos con grupos hidroxilo, aldehído, ácido y, como el en caso anterior cadenas alquílicas con y sin dobles enlaces. En el extracto de n-butanol se observaron señales que correspondieron a azúcares y saponinas fundamentalmente.

A.3.5. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE HEXANO

El análisis por RMN-¹H de los extractos de hexano obtenidos para cada una de las muestras reveló la presencia de ácidos grasos esterificados con glicerol, así como otras señales que podrían corresponder a compuestos del tipo de los terpenos. En el extracto de hexano obtenido de la extracción de orujo estas señales aparecieron en mayor proporción que en el resto de extractos de hexano, por lo que el análisis de dicho extracto se llevó a cabo utilizando el extracto de hexano de orujo.

A.3.5.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE HEXANO

La reacción de esterificación con diazometano se realizó como se describió en la Sección A.2.2. Se esterificaron 3,368 g de extracto de hexano obteniéndose, tras el procedimiento usual del crudo de reacción, 3,100 g de extracto de hexano esterificado.

A.3.5.2. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA A PRESIÓN DEL EXTRACTO DE HEXANO METILADO (CROMATOGRAFÍA A)

Dos gramos de muestra fueron cromatografiados sobre sílica gel en columna a presión y se eluyeron con una mezcla de hexano:éter en diferentes proporciones. Se recogieron las siguientes fracciones: Fracción A1, resultante de eluir con hexano 100% (1,500 g); Fracción A2, resultante de eluir con hexano:éter (6:4) (v/v) (79 mg); Fracción A3, resultante de eluir con hexano:éter (2:8) (v/v) (173 mg).

La fracción A1 contenía principalmente triglicéridos. Y las fracciones A2 y A3 presentaban señales correspondientes a triterpenos.

A.3.5.3. SAPONIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN A1

La reacción se llevó a cabo como se indicó en la Sección A.2.4. Un gramo y medio de A1 se disolvió en metanol y se saponificó adicionando una solución de KOH/MeOH al 10%. Tras el procedimiento usual de recuperación del crudo de reacción se obtuvieron los ácidos grasos.

A.3.5.4. ESTERIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE A1

La reacción se realizó como se describió en la Sección A.2.2. Tras la esterificación de los ácidos grasos aislados se formaron los correspondientes ésteres metílicos de los mismos. Éstos se analizaron por CG-EIMS y los resultados obtenidos se muestran en la correspondiente Sección de resultados.

A.3.5.5. ACETILACIÓN DE LAS FRACCIONES A2 Y A3

La reacción se realizó como se describió en la Sección A.2.1. Las fracciones A2 y A3 (79 y 173 mg, respectivamente) fueron acetiladas disolviendo la muestra en piridina y adicionando anhídrido acético. Después del procedimiento usual de

recuperación del crudo de reacción, 250 mg de muestra acetilada (AA1) fue cromatografiada.

A.3.5.6. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA A PRESIÓN DE AAI (CROMATOGRAFÍA B)

Doscientos miligramos de la muestra anterior (A2 y A3 acetilados) fueron cromatografiados sobre sílica gel en columna a presión utilizando como eluyente una mezcla de cloruro de metileno:acetato de etilo en diferentes proporciones. Se recogieron fracciones de 50 ml. La Fracción B1 (14 mg) eluida con CH_2Cl_2 100% contenía un triterpeno puro (Compuesto 1). La Fracción B2 (17 mg) resultante de eluir con cloruro de metileno:acetato de etilo (9:1) (v/v) contenía otro triterpeno puro (Compuesto 2). La Fracción B3 (113 mg) eluida con cloruro de metileno:acetato de etilo (8:2), (7:3) y (6:4) (v/v) contenía una mezcla compleja de triterpenos.

A.3.6. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO

Para el análisis de los extractos de cloruro de metileno de cada una de las muestras se siguió el mismo procedimiento con cada uno de ellos. Los procesos llevados a cabo fueron los siguientes:

A.3.6.1. ELIMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO

Dos gramos de cada uno de los extractos de cloruro de metileno correspondientes a la extracción de alpechín y alpeorujó se disolvieron en metanol y a continuación se hizo una extracción con hexano. Al final del proceso se obtuvieron alrededor de 600 mg de cada uno de los extractos de cloruro de metileno libres de ácidos grasos.

A.3.6.2. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO LIBRE DE ÁCIDOS GRASOS

La reacción de esterificación con diazometano se realizó como se describió en la Sección A.2.2. Las muestras a metilar se colocaron en un baño de hielo

para evitar posibles adiciones a los dobles enlaces presentes en los compuestos contenidos en la muestra a esterificar, y evitar la formación de productos secundarios indeseables. Se esterificaron 0,630 g y 0,512 g de los extractos de cloruro de metileno libres de grasa procedentes de la extracción de alpechín y “alpeorujo”, y tras el procedimiento usual de recuperación del crudo de reacción se consiguieron 0,625 g y 0,545 g respectivamente de cada extracto de cloruro de metileno esterificado.

A.3.6.3. SILILACIÓN DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO SIN ESTERIFICAR

La reacción se realizó como se describió en la Sección A.2.5. Un miligramo de extracto de cloruro de metileno sin esterificar se disolvió en THF y a continuación añadió la cantidad adecuada de N,O *Bis*(trimetilsilil)trifluoroacetamida. La mezcla de reacción se incubó en un baño a 60°C durante 30 minutos. Todo el proceso se realizó bajo atmósfera de helio.

El extracto se analizó por CG-EIMS y los resultados obtenidos se muestran en la correspondiente Sección de resultados.

A.3.7. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ÉTER

Al igual que en el caso del extracto de cloruro de metileno, el análisis del extracto de éter obtenido en la extracción de cada una de las muestras se realizó siguiendo los mismos procedimientos. Éstos se describen a continuación.

A.3.7.1. ELIMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL EXTRACTO DE ÉTER

Un gramo y trescientos miligramos de extracto de éter de alpechín y 3,673 g de extracto de éter de la masa semisólida se disolvieron en metanol y a continuación se extrajeron con hexano. Se obtuvo 1,050 g de extracto de éter de alpechín libre de ácidos grasos y 3,145 g de extracto de éter de “alpeorujo” libre de ácidos grasos.

A.3.7.2. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ÉTER

La reacción se realizó con diazometano tal y como se describió en la Sección A.2.2. Las condiciones y metodología fueron las descritas en A.3.6.2. Se

esterificaron 1,050 g del extracto de éter procedente de la extracción de alpechín obteniéndose 1,000 g de extracto de éter esterificado.

A.3.7.3. DERIVATIZACIÓN DEL EXTRACTO DE ÉTER

La reacción se realizó como se describió en la Sección A.2.5. Un miligramo de extracto de éter de “alpeorujo” se derivatizó como se describió en A.3.6.3. excepto que en este caso la mezcla de reacción se incubó en un baño a 90°C durante 60 minutos. El extracto fue analizado por CG-EIMS y los resultados obtenidos se muestran en la correspondiente Sección de resultados.

A.3.8. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Los análisis por RMN-¹H de los extractos obtenidos con acetato de etilo revelaron que en todos ellos aparecían fundamentalmente compuestos aromáticos sustituidos con grupos metoxilo, aldehído, hidroxilo y ácidos y cadenas alquílicas con y sin dobles enlaces. Para el estudio de este extracto se procedió de la siguiente manera:

A.3.8.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

La reacción de esterificación con diazometano se realizó como se describió en la Sección A.2.2, y en las condiciones descritas en A.3.6.2. Se esterificaron 3,400 g del extracto de acetato de etilo de alpechín y 1,100 g del de “alpeorujo”, obteniéndose 3,395 g y 1,100 g de extracto de acetato de etilo esterificado, respectivamente.

A.3.8.2. ACETILACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN METILADO

La reacción de acetilación se realizó como se describió en la Sección A.2.1. Se acetilaron 3,395 g de extracto de acetato de etilo de alpechín previamente metilado. La muestra se disolvió en 34 ml de piridina y a continuación se añadieron 34 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 18 horas, y tras el procedimiento usual para recuperar el crudo de reacción -excepto que en este caso en lugar de utilizar NaHCO₃ para el lavado se utilizó H₂O, para evitar la

formación de las sales de los correspondientes ácidos que podrían escapar a la fase acuosa-, se obtuvieron 3,238 g del extracto de acetato de etilo previamente metilado.

A.3.8.3. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO METILADO Y ACETILADO DE ALPECHÍN (CROMATOGRAFÍA C)

Tres gramos de muestra preparada en papilla con sílica gel gruesa se introdujeron en una columna de sílica gel humectada con hexano y se eluyó con mezclas de hexano:éter en diferentes proporciones. Se recogieron 80 fracciones de 50 ml. Las fracciones se analizaron individualmente por CCF, por CG y CG-EIMS y algunas por RMN-¹H. Tras los análisis preliminares se realizaron las siguientes agrupaciones: Fracción C1, eluida con hexano:éter (10:0) (v/v), 1,150 g. Fracción C2, eluida con hexano:éter (8:2) (v/v), 1,737 g. Fracciones C3, 863 mg; C4, 69 mg; C5, 144 mg eluidas con hexano:éter (6:4) (v/v). Fracción C6, eluida con hexano:éter (4:6) (v/v), 289 mg. Fracción C7, eluida con hexano:éter (2:8)(v/v), 153 mg. Fracciones C8, 66 mg; C9, 98 mg; y C10, 130 mg eluidas con hexano:éter (0:10) (v/v).

La fracción C4 contenía un compuesto puro (Compuesto 3), Y el resto de las fracciones obtenidas se analizaron por CG y por CG-EIMS y los resultados obtenidos se muestran en la correspondiente sección de resultados.

A.3.8.4. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN C7

Cien miligramos de la fracción C7 se disolvieron en la mínima cantidad de acetato de etilo y se sometieron a una cromatografía en capa fina preparativa utilizando como eluyente una mezcla de hexano:éter en una proporción 1:9 (v/v). No se pudieron observar manchas claramente definidas pero sí tres zonas claramente diferenciadas que se recogieron por separado. Estas fueron: zona superior (10 mg), zona media (19 mg) y zona inferior (15 mg). Cada una de estas fracciones se analizaron por RMN-¹H y en la fracción correspondiente a la zona central se obtuvo un compuesto puro (Compuesto 4).

A.3.8.5. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN C3 (CROMATOGRAFÍA D)

Trescientos miligramos de muestra se cromatografiaron sobre sílica gel en columna utilizando como eluyente mezclas de hexano:acetato de etilo. La proporción de partida fue (3:7) (v/v) y la final (0:10) (v/v), de manera que se utilizaron mezclas progresivas de ambos. Las fracciones recogidas fueron las siguientes: Con hexano:acetato de etilo (3:7) (v/v), fracción D1, 17 mg; D2, 103 mg; D3, 155 mg; y D4, 140 mg. Con hexano:acetato de etilo (2:8), (1:9) y (0:10) (v/v), D5, 80 mg.

Estas fracciones se analizaron por CG-EIMS y los resultados obtenidos se muestran en la correspondiente sección de resultados.

A.3.8.6. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 2 [extracción neutra]) (CROMATOGRAFÍA E)

El extracto de acetato de etilo de alpechín correspondiente a la extracción 2, extracción neutra (121 mg), se cromatografiaron sobre sílica gel en columna a presión utilizando como eluyente una mezcla de acetato de etilo:metanol (1/1) (v/v). Las fracciones recogidas fueron las siguientes: E1, 26 mg; E2, 47 mg; E3, 37 mg.

En la fracción E2 aparecieron dos compuestos mayoritarios, (Compuesto 5 y Compuesto 6), cuyas señales fueron evidentes al recoger su espectro de RMN-¹H.

A.3.8.7. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 3 [extracción 3b]) (CROMATOGRAFÍA F)

Siete gramos y trescientos miligramos de extracto de acetato de etilo de alpechín fueron cromatografiados sobre sílica gel en columna a presión utilizando como eluyente una mezcla de acetato de etilo:metanol (1/1) (v/v). Se recogieron 16 fracciones de 25 ml, y tras su análisis por CCF se realizaron las siguientes agrupaciones: Fracción F1, 20 mg; fracción F2, 6,736 g; y fracción F3, 14 mg. En la fracción F1 apareció un producto puro (Compuesto 7).

A.3.8.8. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN F2 (CROMATOGRAFÍA G)

Seis gramos y setecientos miligramos de muestra se prepararon en papilla con sílica gel gruesa y se introdujeron en una columna con sílica gel. El eluyente utilizado fue una mezcla de cloruro de metileno:acetato de etilo:metanol (3:1:1) (v/v/v). Se recogieron 80 fracciones de 10 ml. Tras el análisis de las mismas por CCF se realizaron una serie de agrupaciones que fueron: Fracción G1, 6 mg; G2, 2400 mg; G3, 1546 mg; G4, 407 mg; G5, 71 mg; G6, 173 mg; G7, 508 mg; G8, 82 mg; G9, 52 mg; G10, 233 mg; G11, 565 mg; G12, 158 mg; G13, 236 mg; G14, 121 mg; G15, 61 mg; y G16, 95 mg.

El análisis por RMN-¹H reveló que todas las fracciones contenían una mezcla compleja de productos tipo aromáticos con grupos aldehído, metoxilo, ácido, cadenas lineales y posibles sustituyentes tipo azúcar. Algunas de estas agrupaciones se volvieron a cromatografiar, mientras que otras se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas, y los resultados de estas fracciones se muestran en la correspondiente sección de resultados.

A.3.8.9. ACETILACIÓN DE LAS FRACCIONES G2, G6, G8 Y G11

Se acetilaron las siguientes cantidades de cada una de las fracciones, de la fracción G2, 1,925 g; de la fracción G6, 168 mg; de G8, 39 mg; y de G11, 352 mg. La reacción se realizó como se describió en la Sección A.2.1. Cada una de las muestras se disolvió en piridina (19,25, 1,68, 0,39 y 3,52 ml, respectivamente), y a continuación se adicionó anhídrido acético (19,25, 1,68, 0,39 y 3,52 ml, respectivamente). Tras 12 horas de reacción a temperatura ambiente se llevó a cabo el procedimiento usual de recuperación del crudo de reacción obteniéndose 1,555 g de G2 acetilado, 100 mg de G6 acetilado, 35 mg de G8 acetilado y 146 mg de G11 acetilado.

Por CCF se observó que las fracciones G6, G8 y G11 contenían compuestos con grupos ácido, por lo que se procedió a la esterificación con diazometano de todas estas fracciones. Debido a la complejidad de las mezclas, éstas se analizaron por CG-EIMS. El análisis por RMN-¹H reveló la presencia en G2 de una mezcla de compuestos tipo aromáticos con señales típicas de grupos acetoxilo tanto alquílicos como

aromáticos en torno a 3 ppm, que se trató como se indica en la correspondiente sección de resultados.

A.3.8.10. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN G2 ACETILADA (CROMATOGRAFÍA H)

Un gramo y medio de la fracción G2 acetilados fueron cromatografiados sobre sílica gel en columna y eluidos con una mezcla de disolventes de cloruro de metileno:metanol (9:1) (v/v). Se fue variando la polaridad de la mezcla disminuyendo la cantidad de cloruro de metileno y aumentando la de metanol. Se recogieron 200 fracciones de 10 ml y tras el análisis por CCF se realizaron las siguientes agrupaciones: Las fracciones H1, 12 mg; H2, 40 mg; H3, 480 mg; H4, 77 mg; H5, 133 mg y H6, 110 mg, que resultaron de la elución con una mezcla 9:1 (v/v) de cloruro de metileno:metanol.

Con una mezcla de cloruro de metileno:metanol 85:15 (v/v) se recogió la fracción H7, 33 mg.

Y con cloruro de metileno:metanol desde 8:2 (v/v) hasta 0:10 (v/v) se agrupó el resto en H8, 142 mg.

La fracción H2 resultó contener un producto puro (Compuesto 8).

A.3.8.11. ESTERIFICACIÓN DE LAS AGRUPACIONES H3, H4, H5 Y H6

La reacción de esterificación con diazometano se realizó como se describió en la Sección A.2.2. Se metilaron de 480 mg de la agrupación H3, 77 mg de H4, 133 mg de H5 y 110 mg de H6 disolviendo cada una de las muestras en éter y añadiendo una disolución etérea de diazometano. Tras el proceso usual de recuperación del crudo de reacción se recuperaron 534 mg de H3 metilados, 117 mg de H4 metilados, 144 mg de H5 metilados y 95 mg de H6 metilados.

A.3.8.12. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA AGRUPACIÓN H3 METILADA (CROMATOGRAFÍA I)

Quinientos treinta y cuatro miligramos de la agrupación H3, procedente de la cromatografía H se cromatografiaron sobre sílica gel en columna eluyendo con una mezcla de hexano:acetato de etilo en una proporción inicial de 8:2 (v/v) y aumentando

progresivamente la polaridad de la mezcla hasta llegar a una proporción de 0:10 (v/v). Sólo en la fracción 1 se obtuvo un compuesto puro (Compuesto 9). El resto de las fracciones obtenidas en esta cromatografía se analizaron por CG-EIMS y los resultados se muestran en la correspondiente sección de resultados.

A.3.8.13. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN H4 METILADA (CROMATOGRAFÍA J)

La fracción H4 metilada (117 mg) fue cromatografiada sobre sílica gel en columna a presión utilizando como eluyente inicial una mezcla de hexano:acetato de etilo (1:1) (v/v). La polaridad de la mezcla se incrementó de forma progresiva hasta alcanzar una proporción de hexano:acetato de etilo (0:10) (v/v). Se recogieron fracciones de 25 ml y éstas se analizaron por CCF agrupándose de la siguiente manera: Fracción J1, 5 mg, resultante de la elución con hexano:acetato de etilo (1:1) (v/v), contenía un producto puro (Compuesto 10).

Las fracciones J2, J3, J4, J5, J6 y J7, también resultaron de la elución con hexano:acetato de etilo (1:1) (v/v), pero éstas contenían mezclas de productos y se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

La fracción J8 resultó de la agrupación de distintas fracciones resultantes de eluir con mezclas de hexano:acetato de etilo 6:4 (v/v) a 0:10 (v/v). Esta fracción presentó una mezcla muy compleja, y sólo se analizó por CG-EIMS.

A.3.8.14. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN H6 METILADA (CROMATOGRAFÍA K)

Ochenta y cuatro miligramos de la agrupación H6 fueron cromatografiados sobre sílica gel en columna utilizando como eluyente mezclas de hexano:acetato de etilo en diferentes proporciones desde 10:0 hasta 0:10 (v/v) de forma progresiva. Las fracciones de 25 ml recogidas se analizaron y agruparon como se indica a continuación: Fracción K1, ésta contenía una mezcla compleja de productos y se analizó por CG-EIMS.

Fracción K2 que contenía una mezcla de varios compuestos, entre ellos se identificó de nuevo el compuesto 10.

Las fracciones K3 y K4 contenían mezclas complejas de productos, y al igual que K1 se analizaron por CG-EIMS. Los análisis se muestran en la correspondiente sección de resultados.

A.3.8.15. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA A PRESIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE “ALPEORUJO” (CROMATOGRAFÍA L)

Se tomaron 1,100 g de muestra del extracto de acetato de etilo de “alpeorujo” previamente metilados (Sección A.3.8.1.) para su cromatografiado. La muestra se disolvió en la menor cantidad posible de hexano y se introdujo en una columna de sílica gel humectada con hexano. La columna se eluyó bajo presión con mezclas de hexano:acetato de etilo en diferente proporción partiendo de (6:4) (v/v) finalizando en proporción 0:10 (v/v). Se recogieron fracciones de 50 ml. La cromatografía se siguió por CCF, pesada de las fracciones y cromatografía de gases y se agruparon de la siguiente manera:

Con hexano:acetato de etilo (6:4) (v/v) se obtuvieron las fracciones L1, 14 mg; L2, 15 mg; L3, 17 mg; y L4, 400 mg.

Con hexano:acetato de etilo (5:5) (v/v) se obtuvieron las fracciones L5, 370 mg; L6, 71 mg; y L7, 72 mg.

Con hexano:acetato de etilo (4:6) (v/v) las fracciones quedaron agrupadas como L8, 108 mg; L9, 10 mg; L10, 9 mg; L11, 28 mg; y L12, 8 mg.

Con hexano:acetato de etilo (3:7), (2:8), (1:9) (v/v) las fracciones se agruparon bajo la denominación L13, 8 mg; L14, 7 mg; y L15, 108 mg.

Con hexano:acetato de etilo (0:10) (v/v) finalmente se obtuvieron las agrupaciones L16, 13 mg; L17, 10 mg; L18, 1035 mg; y L19, 143 mg.

La fracción L1 (14 mg) contenía el compuesto 11. La fracción L2 (15 mg) contenía una mezcla de dos productos, compuesto 11 y compuesto 12. La fracción L3 (17 mg) contenía un producto puro identificado como compuesto 12. La fracción L9 (10 mg) contenía una mezcla de los compuestos 13 y 14. La fracción L11 (28 mg) contenía el compuesto 15.

A.3.8.15.1. Saponificación de la fracción L3

La reacción de saponificación se realizó como se describió en la Sección A.2.4. Catorce miligramos fueron disueltos en 1 ml de metanol y se adicionaron 0,28 mL de una solución de KOH/MeOH 2 N. La reacción se siguió por CCF. Tras 7 horas de reacción se evaporó el metanol y tras el procedimiento usual de recuperación del crudo de reacción se recuperaron 13 mg de la lactona derivada (Compuesto 16).

A.3.8.15.2. Esterificación del Compuesto 16

La reacción con diazometano se realizó como se describió en la Sección A.2.2. Trece miligramos se disolvieron en éter, y a la disolución se añadió una solución de diazometano en éter. Tras recuperación del crudo de reacción se obtuvo el compuesto 11 metilado (Compuesto 17).

A.3.8.15.3. Reducción de la fracción L1

Nueve miligramos de la fracción L1 fueron disueltos en metanol, y a esta solución se le adicionó una punta de espátula de NaBH_4 . La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente. La reacción se siguió por CCF y se adicionaron cantidades suplementarias de NaBH_4 para completar la reducción del grupo aldehído hasta alcohol. Una vez terminada la reacción se evaporó el metanol del medio y tras extraer 3 veces con éter y secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro la muestra se evaporó al vacío en un evaporador rotatorio Finalmente se obtuvieron 11 mg de una mezcla de L1 reducido (Compuesto 12) y la lactona derivada (Compuesto 16) resultante de la saponificación de los ésteres de los grupos ácido. El análisis por RMN- ^1H reveló las mismas señales que aparecían para el compuesto 12 (Compuesto 12') presente en L3 y para el compuesto 16 (Compuesto 16').

B. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

B.1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas utilizadas en este trabajo se aislaron de diferentes sustratos: suelo de jardín de la Estación Experimental del Zaidín (Granada), aguas de la depuradora de la ciudad de Granada, aguas residuales de una industria de fertilizantes de Huelva, tierra regada con alpechín y alpechín seco. La descripción de dichas bacterias y sus capacidades metabólicas se presentan en el correspondiente apartado de la Sección de Resultados. Las cepas bacterianas más utilizadas en este trabajo se relacionan en la Tabla B.1 junto con su procedencia. Las dos primeras cepas *Arthrobacter oxydans* DOT-200 y *Pantoea agglomerans* DOT-201 utilizan *o*-anísico como fuente de carbono, el resto utiliza ácido *p*-hidroxifenilacético como fuente de carbono.

Tabla B.1. Estirpes bacterianas más utilizadas en este trabajo.

Organismo	Sustrato del que procede
<i>Arthrobacter oxydans</i> DOT-200	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pantoea agglomerans</i> DOT-201	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Acinetobacter</i> sp. DOT-202	Alpechín seco
<i>Bacillus circulans</i> DOT-203	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Enterobacter agglomerans</i> DOT-204	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Enterobacter agglomerans</i> DOT-205	Agua de depuradora
<i>Enterobacter</i> sp. DOT-206	Agua de depuradora
<i>Erwinia</i> sp. DOT-207	Agua de depuradora
<i>Escherichia coli</i> DOT-208	Agua de depuradora
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> DOT-209	Agua de depuradora
<i>Klebsiella oxytoca</i> DOT-210	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Klebsiella oxytoca</i> DOT-211	Agua de puradora

Cont.

Continuación de Tabla B.1.

<i>Nocardia asteroides</i> GC DOT-212 (subgrupo B)	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DOT-213	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-214 (biotipo A)	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-215 (biotipo A)	Alpechín seco
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-216	Agua de depuradora
<i>Pseudomonas</i> sp. DOT-217	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas</i> sp. DOT-218	Alpechín seco
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DOT-219	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> DOT-220	Agua de depuradora

B.2. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 115°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración utilizando filtros estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 µm de diámetro de poro. Los medios de cultivo ocuparon un volumen aproximado del 10 al 20% del volumen del matraz.

B.2.1. MEDIOS RICOS

Como medio habitual de crecimiento se utilizó el medio de Luria Bertani (LB) (Maniatis et al., 1982), cuya composición es la siguiente: bacto triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g; H₂O, hasta 1 L. Para la preparación de medios sólidos se añadió bactoagar 1,5% (p/v). Este medio se esterilizó en el autoclave.

B.2.2. MEDIOS MÍNIMOS

Para el cultivo de bacterias en medios mínimos se utilizó una modificación del medio M9 (Maniatis y col., 1982), cuya composición por litro fue la siguiente: 10 x

M9, 100 mL; solución A9 ("goodies"), 2,5 mL; MgSO_4 (1M), 1,0 mL; citrato férrico amónico (6‰ [p/v]), 1,0 mL; H_2O hasta 1 L. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon y esterilizaron por separado en el autoclave. Para la preparación de medios sólidos se añadió bactoagar 2‰ (p/v).

La composición de la solución de 10 x M9 fue: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 70 g; K_2HPO_4 , 30 g; NH_4Cl , 10 g; ClNa , 5 g; H_2O hasta 1 L.

La composición de la solución A9 ("goodies") fue: HBO_3 , 300 mg; ZnCl_2 , 50 mg; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 30 mg; CoCl_2 , 200 mg; $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 20 mg; $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 30 mg; H_2O hasta 1 L.

Como fuentes de carbono se utilizaron las que se detallan a continuación a las concentraciones finales que se indican:

Glucosa: se preparó como solución madre al 20‰ (p/v), se esterilizó en el autoclave, se almacenó a 4°C y se añadió al medio para alcanzar una concentración final de 0,5‰ (p/v).

Los compuestos aromáticos se prepararon como solución acuosa madre equimoleculares en NaOH, para facilitar su disolución, a concentración de 0,25-0,5 M y pH 7. Se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 μm de diámetro de poro, se almacenaron a 4°C y se utilizaron, generalmente, a una concentración final en el medio de cultivo de 5 mM. Los compuestos químicos utilizados fueron: ácido *o*-anísico; ácido *p*-anísico; ácido benzoico; ácido cafeico; ácido *p*-cumárico; ácido ferúlico; ácido *p*-hidroxifenilacético; *p*-hidroxifeniletanol (tirosol); ácido 2,6-dihidroxibenzoico; 1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol); 3,4,5-trimetoxigalato de metilo; ácido siríngico; ácido vanílico; ácido verátrico; ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico.

B.3. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentrados. La ampicilina se preparó en H_2O destilada y se esterilizó por filtración a través de filtros estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 μm de diámetro de poro y se almacenó a -20°C. El cloranfenicol se preparó en etanol absoluto. Las concentraciones finales en

los medios de cultivo fueron: ampicilina (Ap), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol (Cm), 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

B.4. ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE DIFERENTES SUSTRATOS

Diez g de suelo ó 10 mL de agua residual de distinto origen se añadieron a 90 mL de medio 1 x M9 con 5 mM de la fuente de carbono en la cual se deseaba seleccionar el microorganismo de interés. Tras mantener la suspensión en agitación durante una semana a 30°C, el cultivo se diluyó 100 veces y se mantuvo en agitación a 30°C durante otra semana. El proceso se repitió al menos otras dos veces. Finalmente se realizaron diluciones seriadas (hasta 10^7) que se sembraron en placas de medio selectivo utilizando la fuente de carbono adecuada y en placas de LB. Las colonias que aparecieron en las placas con diferente morfología, color, apariencia, etc se purificaron en medio sólido mediante sucesivas estrías utilizando como fuente de carbono la inicialmente usada en el enriquecimiento de estos microorganismos. Una vez que los microorganismos aparecían como "aparentes" cultivos puros en placa de medio mínimo se sembraron en cultivos líquidos selectivos, utilizando como fuente de carbono el compuesto químico inicialmente utilizado, y así comprobar su fenotipo. El crecimiento bacteriano se siguió espectrofotométricamente determinando la turbidez de cada cultivo líquido a 660 nm durante 96 horas. Si la absorbancia del cultivo fue igual o superior a 0,5, se consideró que el microorganismo fue capaz de crecer utilizando como fuente de carbono el compuesto bajo ensayo. Una muestra del cultivo puro se mantuvo a -20°C para su posterior estudio.

B.5. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Las bacterias aisladas de las diferentes muestras ambientales y capaces de utilizar las diferentes fuentes de carbono, se caracterizaron mediante tinción de Gram que se realizó utilizando el sistema "Accustain Gram Stain" de la casa comercial Sigma (referencia nº HT90).

Para la identificación de las bacterias Gram negativas se realizaron una serie de ensayos fisiológicos utilizando los sistemas de identificación "Api Systems", de la casa comercial Biomérieux para bacterias no entéricas "API 20 NE" (referencia n° 2005) y para enterobacterias y otros bacilos gram-negativos "API 20 E" (referencia n° 2010). Estos paquetes comerciales permitieron la realización de distintas pruebas metabólicas a partir de suspensiones bacterianas, constituyendo un sistema satisfactorio para la identificación de bacterias. Algunas de las bacterias aisladas se sometieron a ensayos de perfil de fosfolípidos mediante análisis de gases-masas realizados por la compañía "Microbial Identification Systems", los cuales confirmaron la identificación anterior.

Las bacterias Gram positivas fueron identificadas mediante análisis de perfil de fosfolípidos por dicha compañía.

B.6. CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS

La conservación de bacterias a corto y medio plazo se realizó a 4°C en cultivos en estría en placas del correspondiente medio sólido selectivo suplementado con los antibióticos adecuados. A largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos suplementados con glicerol 40% (v/v) a -20°C y -70°C. El glicerol se preparó como solución madre al 80% (v/v), se esterilizó en el autoclave y se almacenó a 4°C.

B.7. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes se describen a continuación.

pAJ221: Es un plásmido de 6,70 Kb que codifica resistencia a cloranfenicol y porta el origen de replicación P15A (Prieto et al., 1993). El fragmento *Hind*III-*Eco*RV de 1,6 Kb porta el gen que codifica para la enzima *p*-hidroxifenilacético hidroxilasa de la ruta catabólica de degradación de este compuesto en *E. coli* (Figura 1).

pHCB1: Es un plásmido de 8,70 Kb que codifica resistencia a ampicilina y porta el origen de replicación *colE1* (Prieto et al., 1996). El fragmento *Bam*HI de 6 Kb

porta el gen que codifica para la enzima 3,4-dihidroxifenilacético-2,3-dioxigenasa de la ruta catabólica de degradación de este compuesto en *E. coli* (Figura 2).

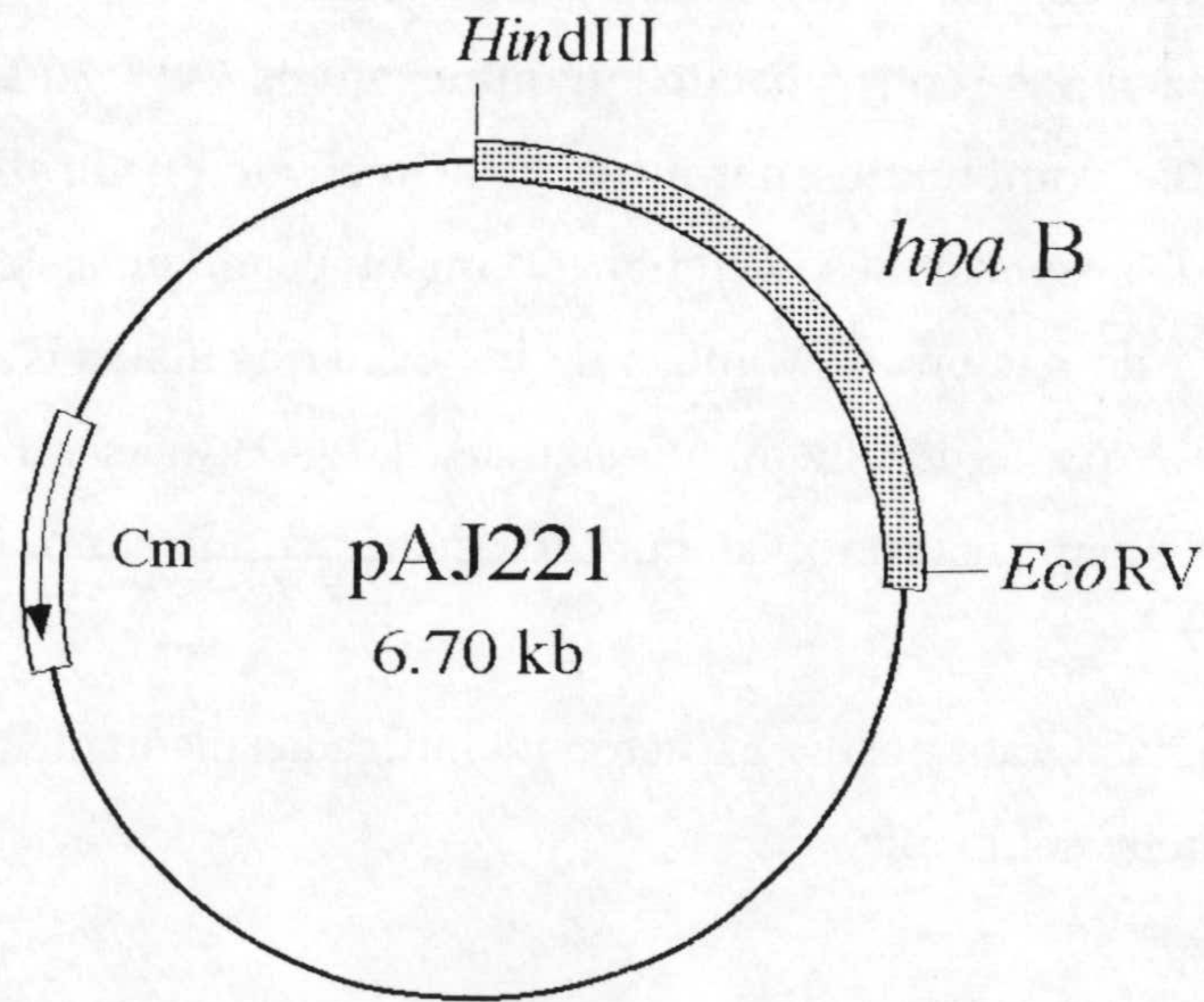


Figura 1: Esquema del plásmido pAJ221. Se indican los sitios de restricción relevantes para la preparación de la sonda *hpaB*, así como el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm).

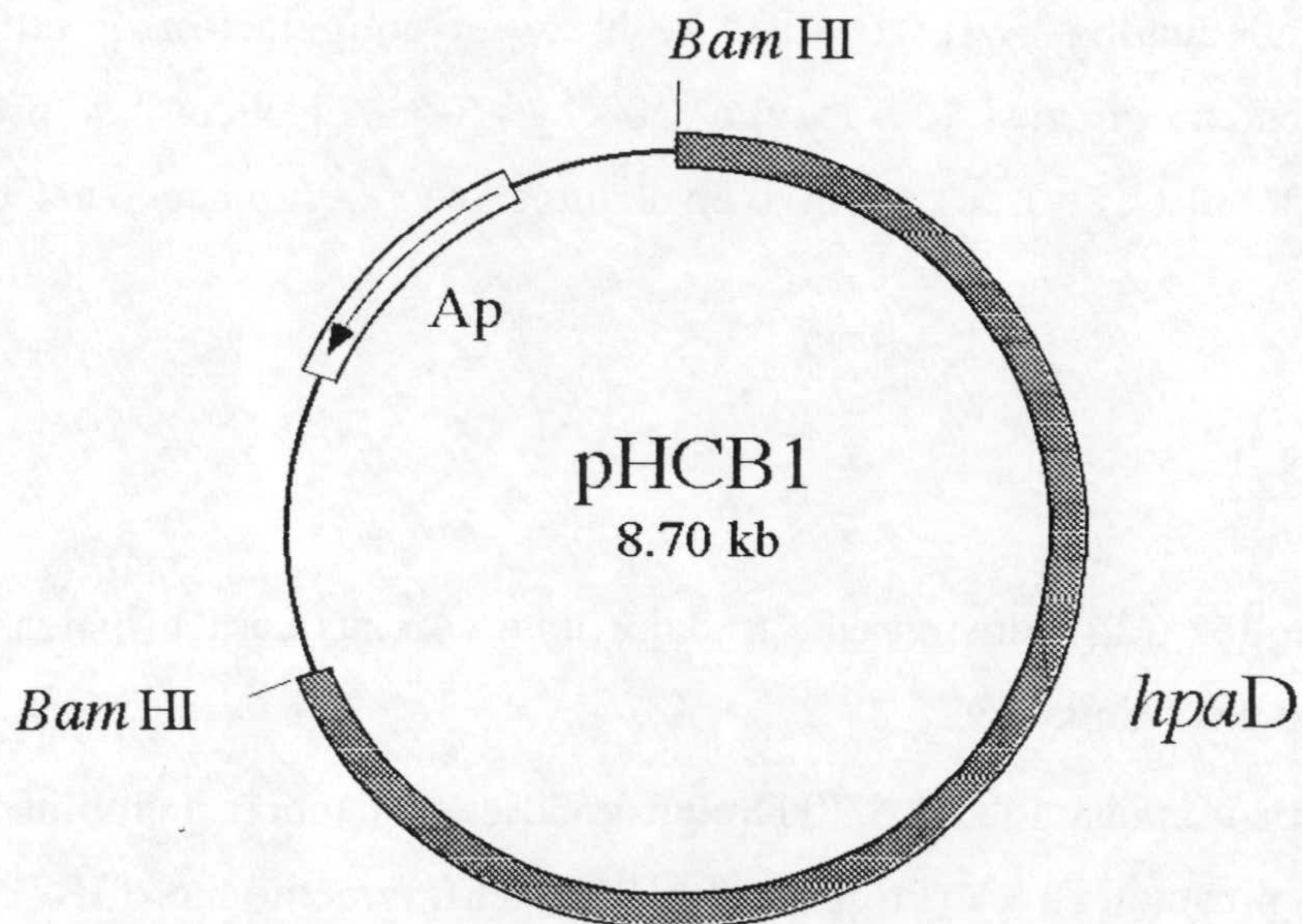


Figura 2: Esquema del plásmido pHCB1. Se indican los sitios de restricción relevantes para la preparación de la sonda *hpaC*, así como el gen de resistencia a ampicilina.

B.8. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los métodos que se describen a continuación. La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación a 30°C durante 12 a 14 horas en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

B.8.1. AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA

B.8.1.1. MÉTODO "MAGIC-MINIPREP"

Este método se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN. El procedimiento se realizó partiendo de un volumen de cultivo de 3 ml, y siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega "Magic Miniprep" referencia n° A7100).

B.8.1.2. MÉTODO "QIAPREPS"

El sistema "Qiapreps spin plasmid kit" se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN, partiendo de un volumen de 3 mL de cultivo, y siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen n° referencia 27104).

B.8.2. AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA Y PURIFICACIÓN EN GRADIENTE DE CsCl

Para la preparación de plásmidos a gran escala se utilizó el procedimiento de Jouain y col., (1981) modificado conforme al protocolo descrito por Ausubel y col. (1990).

Se partió de un preinóculo de 10 ml de la cepa portadora del plásmido a aislar cultivada durante 12-16 horas. El cultivo se diluyó 100 veces en 500 mL de LB suplementado con los antibióticos adecuados, y se incubó a 30°C con agitación durante 12-16 horas. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en 30 mL de GTE. A continuación se lisaron mediante la adición de 60 mL de una solución de SDS/NaOH recién preparada, y se mezcló suavemente por

inversión. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 5 minutos y el lisado obtenido se neutralizó añadiendo 45 mL de KAcF (acetato potásico, 3 M y ácido fórmico, 1,8 M). Después de incubar 15 minutos en hielo, las proteínas y gran parte del ADN cromosómico, precipitados por la neutralización, se retiraron por centrifugación 5000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 80 mL de isopropanol mantenido a -20°C ; el ADN se precipitó centrifugando a 12000 g durante 15 minutos. El sedimento se drenó y se resuspendió en 10 mL de TE.

Posteriormente se realizó la purificación del ADN plasmídico mediante centrifugación en gradiente isopícnico de cloruro de cesio. A la solución de ADN en 10 mL de TE se añadieron 11 g de CsCl y 0,5 mL de una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL). Los restos de proteína se eliminaron por centrifugación a 4000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente para evitar la precipitación del CsCl. El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga con ayuda de una pipeta Pasteur y, una vez equilibrados, se sellaron por calor. El gradiente de CsCl se obtuvo por ultracentrifugación a 145000 g en un rotor Beckman 50Ti durante 48 horas a 15°C . Las bandas de ADN plasmídico y cromosómico se visualizaron exponiendo los tubos a luz ultravioleta de 360 nm, y la banda inferior correspondiente al ADN plasmídico se extrajo mediante succión con una jeringa.

El bromuro de etidio de la preparación se eliminó por extracción con solventes orgánicos. Se adicionó 1 volumen de isopropanol 90% (v/v), se mezcló y se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos. La fase superior con el bromuro de etidio se descartó, y la operación se repitió hasta que la fase acuosa apareció incolora. El ADN se precipitó añadiendo 2 volúmenes de H_2O y 6 volúmenes de etanol absoluto, y tras incubar a -20°C durante 2 horas, se recogió por centrifugación a 12000 g durante 10 minutos. El ADN precipitado se secó al vacío y se resuspendió en $100\mu\text{L}$ de TE.

B.9. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO

Para el aislamiento de ADN cromosómico se utilizaron los siguientes métodos:

B.9.1. MINIPREPARACIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO

Para el aislamiento de ADN cromosómico se utilizó el método descrito por Ausubel y col. (1990).

Un mililitro y medio de células se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 450 μ L de TE. A continuación se añadió 50 μ L de una disolución de lisozima (4 mg/mL) en GTE y tras agitar suavemente el tubo por inversión la muestra se incubó durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se añadieron 6 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y 30 μ L de SDS al 10% (p/v). La mezcla se homogenizó invirtiendo el tubo y se incubó durante 1 hora a 37°C. A continuación se añadieron 100 μ L de NaCl 5 M, se mezcló por inversión, y seguidamente se añadieron 80 μ L de CTAB/NaCl, y se volvió a agitar el tubo suavemente por inversión. La muestra se incubó a 65°C durante 10 minutos. A continuación se adicionaron 750 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló por inversión y las fases se separaron por centrifugación a 12000 g durante 5 minutos. En esta extracción se eliminaron los complejos formados por el CTAB, las proteínas desnaturalizadas, polisacáridos y restos de pared celular; los ácidos nucleicos permanecieron en disolución en la fase acuosa. Ésta se transfirió a un tubo limpio y se repitió la operación utilizando fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Finalmente, para precipitar el ADN en la fase acuosa se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol frío y la muestra se incubó en un baño de hielo durante 30 minutos. Se centrifugó la muestra a 12000 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante con cuidado y el sedimento que contenía el ADN se lavó con 1 mL de etanol frío al 70% (v/v). La muestra se volvió a centrifugar a 12000 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento de ADN se secó a vacío primero y a 37°C después. Una vez seco el ADN se resuspendió en 50 μ L de TE.

La composición de las soluciones empleadas en este método fue la siguiente:

GTE: Glucosa, 50 mM; Tris-HCl, 25 mM; EDTA-Na₂, 10 mM. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

Lisozima: 4 mg/mL, en solución GTE, se añadió en el momento de su uso.

Solución de lisis: SDS, 10% (p/v).

Solución de NaCl (5 M).

Solución TE: Tris-HCl pH 8, 10 mM; EDTA-Na₂, 1 mM.

Solución de CTAB/NaCl: NaCl, 4,1 g; CTAB, 10 g; H₂O hasta 100 mL. Esta solución se preparó mezclando volúmenes adecuados de H₂O estéril y soluciones madre de CTAB 10% (p/v) y NaCl 0,7 M.

Cloroformo-alcohol isoamílico: se preparó una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v).

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: los cristales de fenol se fundieron a 55°C y se mezclaron con cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v). La solución se saturó con Tris-HCl 1 M, pH 8 hasta que la fase acuosa mantuvo este pH. Posteriormente se retiró el Tris-HCl y se sustituyó por TE. La solución se conservó a 4°C.

B.9.2. MÉTODO "RAPID PREP MICRO"

El método de "Rapid Prep Micro" es un kit para el aislamiento de ADN genómico de células y tejidos. Este sistema se utilizó para el aislamiento de ADN cromosómico partiendo de 1,5 mL de cultivo y siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia Biotech "Rapid Prep Micro" n° 27-5225-01).

B.10. MANIPULACIÓN DE ADN

B.10.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

Para estimar la concentración de ADN o ARN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Maniatis y col. (1982). Se determinó la absorbancia de la solución de ADN a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de H₂O o TE, dependiendo del medio utilizado para la disolución del ADN. La concentración de ADN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260} = 1$ para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

B.10.2.RESTRICCIÓN DE ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 μg de ADN, 0,1 volumen del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial, (diez veces concentrado), y 0,5-1 unidad del enzima de restricción, en volúmenes finales de 20-40 μl completados con H_2O bidestilada. Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2-12 horas a la temperatura indicada por el fabricante.

B.10.3.SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN Y PLÁSMIDOS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La separación y visualización tanto de plásmidos completos como de fragmentos de ADN originados por la digestión con enzimas de restricción, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon al 0,8% (p/v) en TAE y los geles se sumergieron en este tampón. Por cada 5 μL de muestra a analizar se añadió 1 μl de tampón de carga, y la mezcla se depositó en un pocillo del gel. La separación de fragmentos de ADN se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Para la visualización del ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 15 minutos y, después de lavar en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm) en un transiluminador LKB C-61. Los geles se fotografiaron con una cámara POLAROID provista con películas instantáneas 667, empleando un filtro Kenko R-1.

El tamaño de los fragmentos se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos del fago Lambda (λ) cortado con el enzima de restricción *Hind* III.

La composición de los tampones y soluciones utilizados en este proceso fue la siguiente:

Tampón TAE: Tris-Base, 4,48 g; ácido acético glacial, 1,14 mL; EDTA-Na₂ 0,5 M, pH 8, 2 ml; H₂O hasta 1 L. El tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

Tampón de carga: Glicerol, 30% (v/v); azul de bromofenol, 0,3% (p/v).

Solución de bromuro de etidio: Contení 0,1 mg de bromuro de etidio en 100 ml de agua desionizada. Se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente.

El marcador de peso molecular se preparó de la siguiente forma: Se cortaron 80 μ L de ADN de fago λ (250 μ g/ml) con 1,5 unidades/ μ g ADN del enzima *Hind*III. Una vez digerido el ADN, se calentó a 80°C para separar las regiones *cos* de λ . A la reacción se añadieron 80 μ l de tampón de carga y se completó el volumen hasta 400 μ l con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50 μ g/ml.

B.10.4. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE LOS GELES DE AGAROSA

Una vez identificado el fragmento de ADN que se quería recuperar como se ha descrito en el apartado anterior, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí, y se extrajo del mismo. El ADN se recuperó utilizando métodos basados en la solubilización de la agarosa con ioduro sódico y adsorción de los fragmentos de ADN a perlas de vidrio. En este caso se utilizaron los métodos "GeneClean" (BIO101 Inc.) y "Prep-A-Gene" (Bio-Rad referencia n° 732-6010), según las instrucciones de los fabricantes.

B.11. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA DE NYLON E HIBRIDACIÓN

B.11.1. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA DE NYLON

Los fragmentos de ADN procedentes de la restricción de 1-5 μ g de ADN cromosómico o plasmídico se separaron por electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (0,45 μ m de diámetro de poro) siguiendo uno de los dos protocolos alternativos que se describen a continuación:

B.11.1.1. TRANSFERENCIA DE ADN POR CAPILARIDAD

Se siguió el protocolo de transferencia alcalina descrito por Reed y Mann (1985). El gel se sumergió en HCl 0,25 M durante aproximadamente 15 minutos, tiempo necesario para que el color azul del azul de bromofenol virase a amarillo. Este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilita su posterior transferencia. Posteriormente el ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M durante 15 minutos. La transferencia por capilaridad del ADN desnaturalizado se realizó en esta misma solución. Se colocó una tira de papel Whatman 3MM sobre un cristal de ancho similar al del gel y con los extremos sumergidos en un reservorio inferior con solución de transferencia. Sobre ella se colocó el gel en posición invertida, sobre éste la membrana y, por último, se colocó abundante papel absorbente y 0,25-0,5 kg de peso distribuido uniformemente. La transferencia se realizó durante 15-20 horas y una vez finalizada, la membrana se lavó en 2 x SSC durante 5 minutos. El ADN se fijó a la membrana mediante incubación a 80°C durante 60 minutos y posteriormente, se guardó en bolsas de plástico hasta su utilización.

La solución empleada fue la denominada SSC. La solución madre se preparó 20 veces concentrada siendo la concentración final de NaCl 3 M y la de Na-citrato 0,3 M y pH 7.

B.11.1.2. TRANSFERENCIA DE ADN AL VACÍO

El segundo procedimiento fue el método de transferencia a vacío. Tiene el mismo fundamento que el anterior excepto que la transferencia de ADN del gel a la membrana de nylon se realizó por aplicación de vacío. El procedimiento es el descrito en "VacuGene XL Vacuum blotting System" (Farmacia nº 56-1130-80). Para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante.

B.11.2. MARCADO DE LA SONDA CON NUCLEÓTIDOS SUSTITUIDOS CON DIOXIGENINA

El marcaje de la sonda con dioxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se llevó a cabo utilizando el paquete comercial de Boehringer Mannheim (ref. 1093657). Las sondas de ADN se marcaron con dioxigenina-dUTP, mediante extensión

con el fragmento Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli* y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos. El marcaje de la sonda y su recuperación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

B.11.3. HIBRIDACIÓN

Tras una hora de prehibridación a 42°C con la solución de hibridación adecuada se retiró parcialmente esta solución, manteniendo 2,5 ml/100 cm². Entonces se añadieron 20-200 ng de sonda marcada y desnaturalizada, y posteriormente se realizó la hibridación durante 6-15 horas a 42°C. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura.

Lavado de membrana para hibridación en condiciones estrictas: Se realizaron tres lavados a temperatura ambiente, los dos primeros con una solución de 2 x SSC durante 5 minutos cada uno, y el tercero con una solución de 1 x SSC durante 10 minutos. Finalmente se realizó un lavado con una solución de 0,1 x SSC a 68°C durante 10 minutos.

Lavado de membrana para hibridación en condiciones relajadas: Todos los lavados se realizaron a temperatura ambiente. Primero se realizaron dos lavados con una solución de 2 x SSC durante 5 minutos cada uno, y a continuación otros dos lavados con una solución de 1 x SSC durante 10 minutos.

Las soluciones utilizadas en este proceso fueron las siguientes:

Solución de prehibridación (hibridación en condiciones estrictas): Tampón 20 x SSC, 5 ml; SDS (10%) (p/v), 40 µl; reactivo bloqueante, 1 g; solución de formamida, 10 mL; ADN (esperma de sardina desnaturalizado, 10 mg/mL), 0.1 ml; H₂O destilada hasta 20 ml.

Solución de prehibridación (hibridación en condiciones relajadas): Se utilizaron las mismas soluciones que en el caso de hibridación en condiciones estrictas excepto que se añadieron 6 mL de formamida, para que su concentración final fuese del 30% (v/v).

En ambas soluciones el reactivo bloqueante estaba incluido en el *kit* de marcaje y detección suministrado por Boehringer Mannheim (ref. 1093657).

B.11.4. DETECCIÓN DE HÍBRIDOS DE ADN

Se realizó inmunológicamente, para ello la membrana se lavó con solución de tampón-1, y se incubó en 100 mL de una solución de tampón-2 durante 30 minutos. A continuación se lavó con tampón-1 durante 1 minuto, y seguidamente se incubó con 20 mL de solución de anticuerpo diluida en tampón-1 durante 30 minutos. Seguidamente se lavó dos veces con 100 mL de tampón-1 durante 15 minutos para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación la membrana se equilibró con 20 ml de solución de tampón-3 durante 2 minutos, y a continuación se incubó con 10 ml de la solución coloreada durante 24 horas en oscuridad. Es importante no mover el recipiente donde está contenida la membrana para evitar manchas en la misma. La reacción se detuvo lavando con 50 ml de TE durante 5 minutos.

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

Tampón-1 (pH 7,0): Tris-HCl, 100 mmol/l; NaCl, 150 mmol/l.

Tampón-2: Bloqueante en tampón-1 0,5% (p/v). Esta solución se preparó una hora antes, disolviendo el bloqueante a 60°C.

Tampón-3 (pH 9,5): Tris-HCl, 100 mmol/l; ClNa, 100 mmol/l; MgCl₂, 50 mmol/l.

Solución colorante: A 10 ml de tampón-3 se añadieron 45 µl de solución de NBT y 35 ml de solución X-fosfato. Esta solución se preparó en el momento de su utilización. La solución de NBT y de X-fosfato se ofrecían preparadas en el *kit*.

Solución de anticuerpo (150 mU/ml): Anticuerpo, 4 µL; Tampón-1, 20 ml.

B.12. MÉTODOS ANALÍTICOS

Con objeto de analizar los metabolitos intermedios de las rutas catabólicas bajo estudio en este trabajo, se realizaron las siguientes determinaciones:

B.12.1. ANÁLISIS DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC)

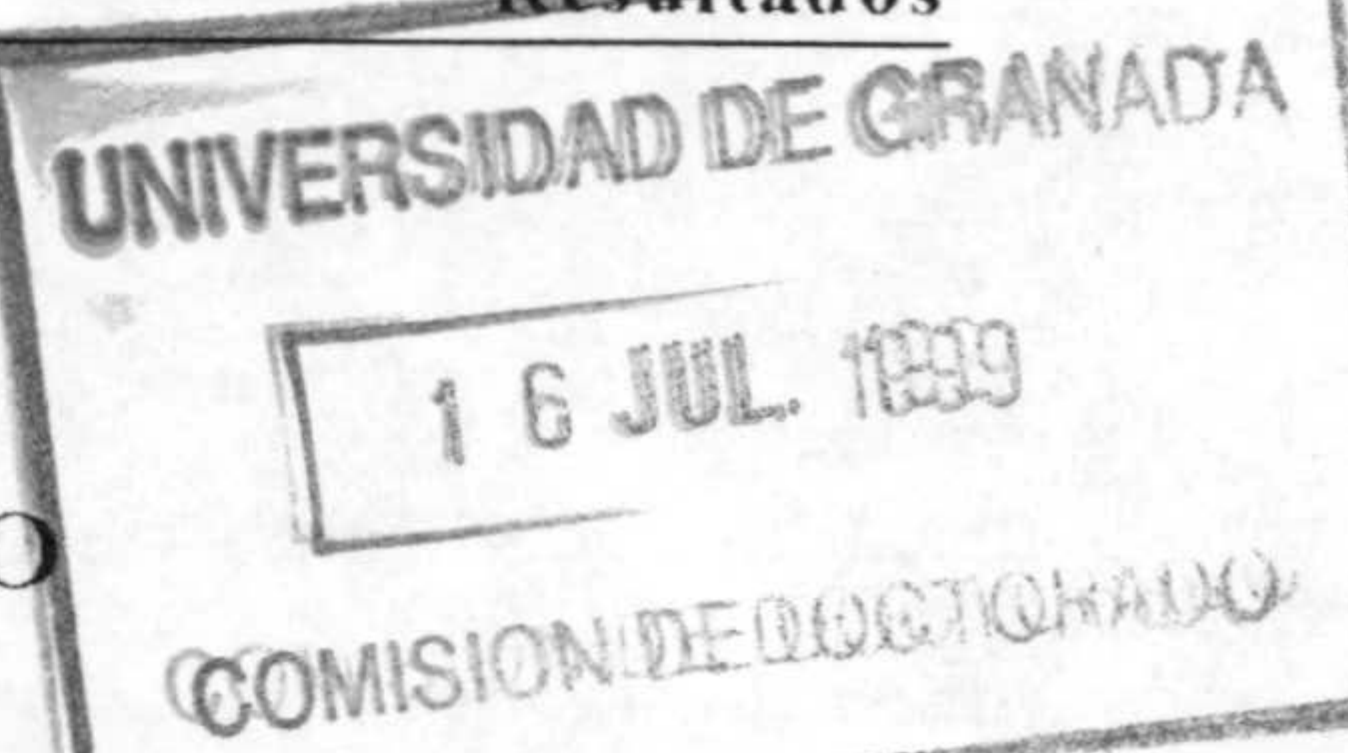
Las bacterias se cultivaron en medios mínimos selectivos con la fuente de carbono adecuada y a intervalos de tiempos indicados en cada experiencia se tomó 1

mL de cultivo. Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 12000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante libre de células se inyectó en un HPLC (Ver Sección A.1.6.).

B.12.2. ANÁLISIS DE METABOLITOS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN-¹H)

Las bacterias se cultivaron en medios mínimos líquidos selectivos de la misma forma que se describió anteriormente, excepto que se utilizaron 100 mL de medio de cultivo. El sobrenadante libre de células se recogió como se describe en la sección anterior y se realizaron una serie de extracciones primero al pH que se encontraba la muestra (pH 7), y a continuación la fase acuosa se acidificó con HCl 2N hasta pH 3 y se volvió a extraer. En ambas ocasiones el disolvente utilizado fue acetato de etilo. Las fases orgánicas de cada extracción se agruparon, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron hasta sequedad en un evaporador rotatorio a 35°C. A continuación se disolvieron en 0,5 ml de acetona deuterada (CD₃COCD₃) y se recogió su espectro de RMN-¹H.

RESULTADOS



R.1. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE HEXANO

El proceso de extracción del aceite de oliva produce grandes cantidades de residuos tanto sólidos como líquidos, éstos constituyen el principal problema de contaminación en las zonas agrícolas del sur de España y de la cuenca del Mediterráneo (Hamdi, M., 1993). Con objeto de analizar la composición química de estos residuos, se tomaron muestras de los mismos de la planta de producción de aceite de oliva de Jimena S. A., en Pinos Puente (Granada), y de la almazara del Santísimo Cristo en Villacarrillo (Jaén), y se sometieron a una serie de extracciones seriadas encaminadas al aislamiento de los compuestos presentes en los mismos.

El primero de los extractos obtenidos en la extracción seriada de alpechín fue el de hexano (Secciones A.3.1., A.3.2. y A.3.3. de Materiales y Métodos). Este extracto se obtuvo de cada uno de los tipos de residuos que se producen actualmente en el proceso de extracción del aceite de oliva, alpechín y orujo en el sistema de tres fases y alpeorujo en el de dos fases.

El análisis por RMN-¹H de cada uno de los extractos de hexano obtenidos reveló la presencia de triglicéridos y ácidos grasos como productos principales y una serie de señales típicas de triterpenoides. El extracto hexánico correspondiente a la muestra de orujo fue el que presentó más nítidamente las señales típicas de triterpenoides, a saber, siete señales de metilos singletes con un δ comprendido entre 0,8 ppm y 1,2 ppm, por esta razón centramos nuestros estudios en el extracto de hexano de orujo.

R.1.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE HEXANO DE ORUJO

Los análisis por CCF del extracto de hexano mostraron manchas típicas de grupos ácido. Con objeto de facilitar la identificación del mayor número posible de compuestos presentes en dicho extracto, se procedió a su esterificación con una solución etérea de diazometano como se describió en la correspondiente sección de Materiales y Métodos A.3.4.1. La muestra esterificada se sometió a una cromatografía sobre sílica gel en columna a presión (Cromatografía A), como se describió en la Sección A.3.4.2. de Materiales y Métodos. En esta cromatografía se recogieron tres fracciones: La primera (A1) contenía principalmente triglicéridos, mientras que las otras dos (A2 y A3)

mostraron cada una de ellas la presencia de un compuesto principal junto con otros minoritarios.

R.1.2. ESTUDIO DE LAS FRACCIONES ANTERIORES

R.1.2.1. ESTUDIO DE LA FRACCIÓN A1 ENRIQUECIDA EN TRIGLICÉRIDOS

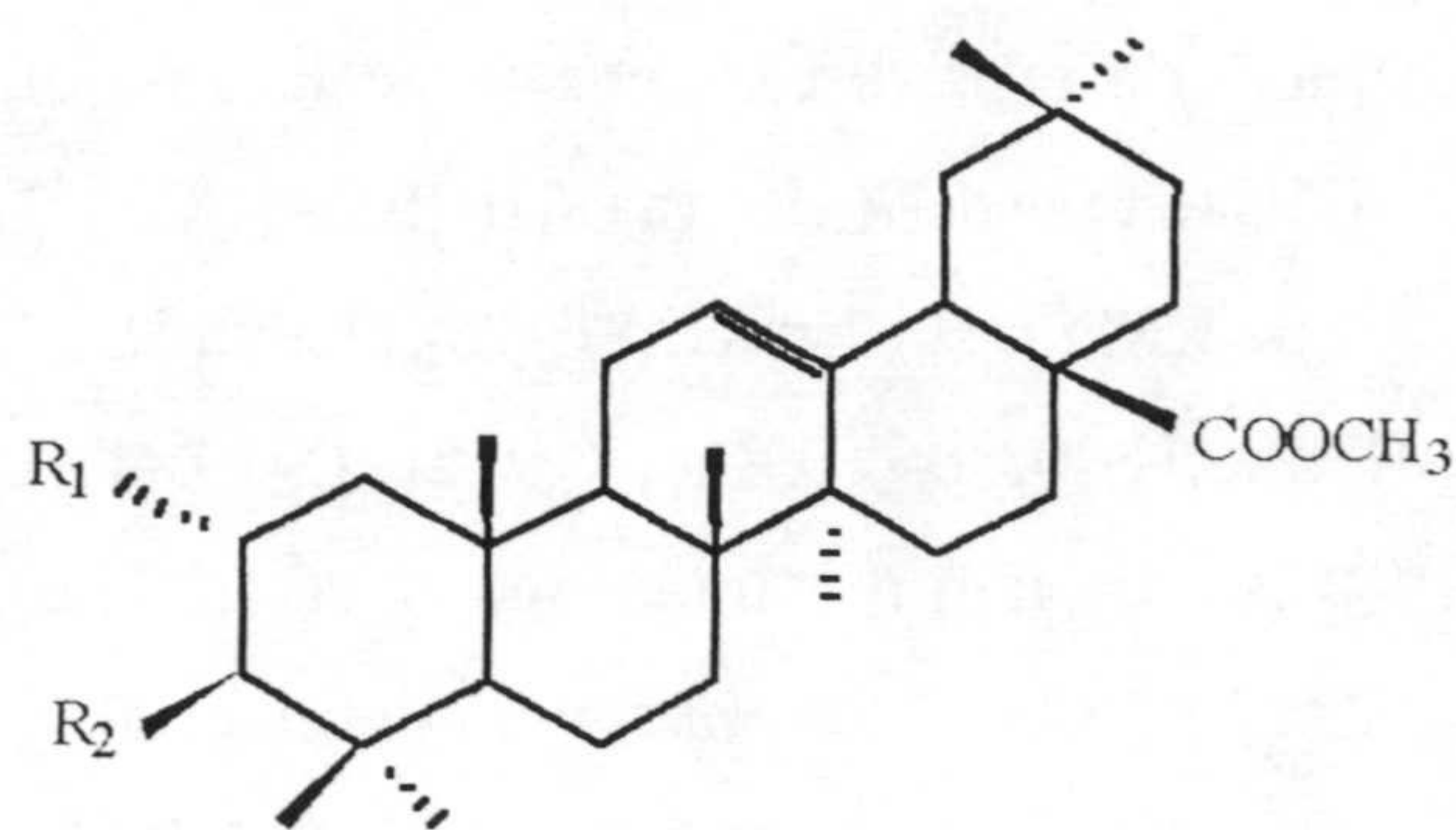
Con objeto de romper los enlaces éster típicos de los triglicéridos presentes en el aceite de oliva y liberar los ácidos grasos presentes en esta fracción, ésta, previamente disuelta en una pequeña cantidad de cloroformo, dada su escasa solubilidad en metanol, se saponificó utilizando una solución 2 N de KOH en MeOH como se indica en la correspondiente Sección de Materiales y Métodos A.3.4.3. El análisis por CCF de la fracción ácida obtenida reveló la presencia de grupos ácidos, lo cual se confirmó por IR.

Una vez aislados los ácidos grasos se procedió a su esterificación con una disolución de diazometano en éter (ver Sección A.3.4.4. de Materiales y Métodos) y, a continuación, se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EIMS). En estos análisis los ácidos grasos se identificaron por comparación con muestras auténticas y revelaron que eran los típicos del aceite de oliva. A continuación se expresan éstos junto con la proporción en la que se encontraron: ácido oleico (C18:1; 76,5% del total), ácido linoleico (C18:2; 17,6% del total), ácido palmítico (C16:0; 3,8% del total), ácido esteárico (C18:0; 0,9% del total) y ácido palmitoleico (C16:1; 0,8% del total).

R.1.2.2. ESTUDIO DE LAS FRACCIONES A2 Y A3

Con objeto de disminuir la polaridad de las muestras, y facilitar la purificación de los productos mayoritarios presentes en ambas fracciones se agruparon y se acetilaron con piridina y anhídrido acético (ver Sección A.3.4.5. de Materiales y Métodos). El producto de la reacción obtenido se denominó AA1.

La muestra acetilada se recromatografió sobre sílica gel en columna a presión como se indica en la correspondiente Sección de Materiales y Métodos A.6.8. Se aislaron dos compuestos puros que fueron posteriormente identificados como 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo (Compuesto 1) y 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo (Compuesto 2). La estructura de ambos compuestos se presenta en la figura R.1.1.



	R ₁	R ₂
Compuesto 1	H	OAc
Compuesto 2	OAc	OAc

Figura R.1.1. Estructura química de los compuestos **1** (3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo) y compuesto **2** (2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo)

La estructura de estos compuestos fue determinada por RMN-¹H, RMN-¹³C, COSY 90°, COSY DQF, HETCOR, HMBC, NOESY, ROESY y HOHAHA.

R.1.2.2.1. Evidencias de la estructura de oleanano en los compuestos **1** y **2**. Asignación de protones y carbonos de los compuestos **1** (3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo) y **2** (2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo) y su configuración

En el espectro de masas (espectro E-1a) (Tabla R.1.1.) aparece el ion molecular a m/z 512 lo que unido a los datos del espectro de RMN-¹³C (espectro E-1d) (Tabla R.1.2) permite deducir una fórmula molecular $C_{31}H_xO_y$ compatible con estructura de triterpeno. La naturaleza de las funciones oxigenadas se establece con ayuda del espectro de RMN-¹³C (espectro E-1d) donde aparecen las señales de acetato (171,23 y 21,41 ppm) y de metoxicarbonilo (178,4 y 51,62 ppm), que se confirman en el espectro de IR (espectro E-1b), donde se observa una banda intensa a 1725 y 1235 cm^{-1} .

[En el trabajo las referencias a los espectros se hacen como E (espectro), el número del compuesto o una letra mayúscula que se corresponde con la cromatografía en cuestión y un número que se corresponde con la fracción de la cromatografía o una letra minúscula que corresponde a un extracto concreto [a: extracto de hexano; b: extracto de

cloruro de metileno; c: extracto de éter; d: extracto de acetato de etilo] y una letra que define el tipo de espectro, bien sea EIMS (a), IR(b), RMN-¹H(c), RMN-¹³C(d), COSY(e)...]. En el espectro de RMN-¹H (espectro E-1c) (Tabla R.1.2.) se aprecian siete metilos angulares a δ 0,701, 0,841, 0,865, 0,866, 0,912, 0,917, 1,103 ppm; además los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, han mostrado una señal triplete de un doble enlace trisustituido (δ 5,27 ppm) y (122,35, 143,88 ppm) y un doble doblete a δ 4,48 y δ 81,01 ppm de un protón geminal acetato. Estos datos junto con el RMN-¹³C y el esquema (esquema R.1.1) (Budzikiewicz y col., 1963; Budzikiewicz y col., 1964; Biessels y col., 1974; Ali y col., 1990; Razdan y col., 1983) que representa las fragmentaciones del espectro de masas (espectro E-1a) (Tabla R.1.1.), establecen un esqueleto de oleanano para este compuesto.

Tabla R.1.1. Datos de EIMS e IR del compuesto **1**, 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo (P. f.: 190-192°C)

COMPUESTO 1, 3β-acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	512 [M] ⁺ (C ₃₃ H ₅₂ O ₄), 470 [M ⁺ - COCH ₃](2.12), 455 (10.21), 454 (18.95), 453 (82.81), 439 (2.94), 437 (11.77), 411 (18.75), 410 [M ⁺ - COCH ₃ - 4 CH ₃] (1.41), [M ⁺ - COCH ₃] retro Diels-Alder: 262 C ₁₇ H ₂₆ O ₂ (34.70), 207 C ₁₄ H ₂₃ O (4.69), 203 C ₁₇ H ₂₆ O ₂ - COOCH ₃ (100), 189 C ₁₇ H ₂₆ O ₂ - CH ₂ COOCH ₃ (28.36), 189 C ₁₄ H ₂₃ O - OH ₂ ⁺ (28.36), 248 [M ⁺ - COCH ₃ - 7 CH ₃ - COOCH ₃](2.45), 175 C ₁₄ H ₂₃ O - OH ₂ ⁺ - CH ₂ (12.69), 149 C ₁₄ H ₂₃ O - OH ₂ ⁺ - 2 CH(10.26), 133 C ₁₄ H ₂₃ O - OH ₂ ⁺ - 3 CH ₂ (31.72), 119 C ₁₄ H ₂₃ O - OH ₂ ⁺ - 4 CH ₂ (27.24), 105 C ₁₄ H ₂₃ O - OH ₂ ⁺ - 5 CH ₂ (22.48), 49 C ₁₄ H ₂₃ O - OH ₂ ⁺ - 9 CH ₂ (63.06), 43 COCH ₃ (90.67).
ESPECTRO DE IR ν_{\max} cm⁻¹	3378, 2945, 2863, 2357, 2330, 2298, 1725 (CO), 1652, 1460, 1385, 1362, 1303, 1262, 1235, 1201, 1190, 1162, 1125, 1094, 1034 (C=C), 996, 815, 789, 756, 656.

Tabla R.1.2. Datos de ¹H, ¹³C y HMBC del compuesto **1**, 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo

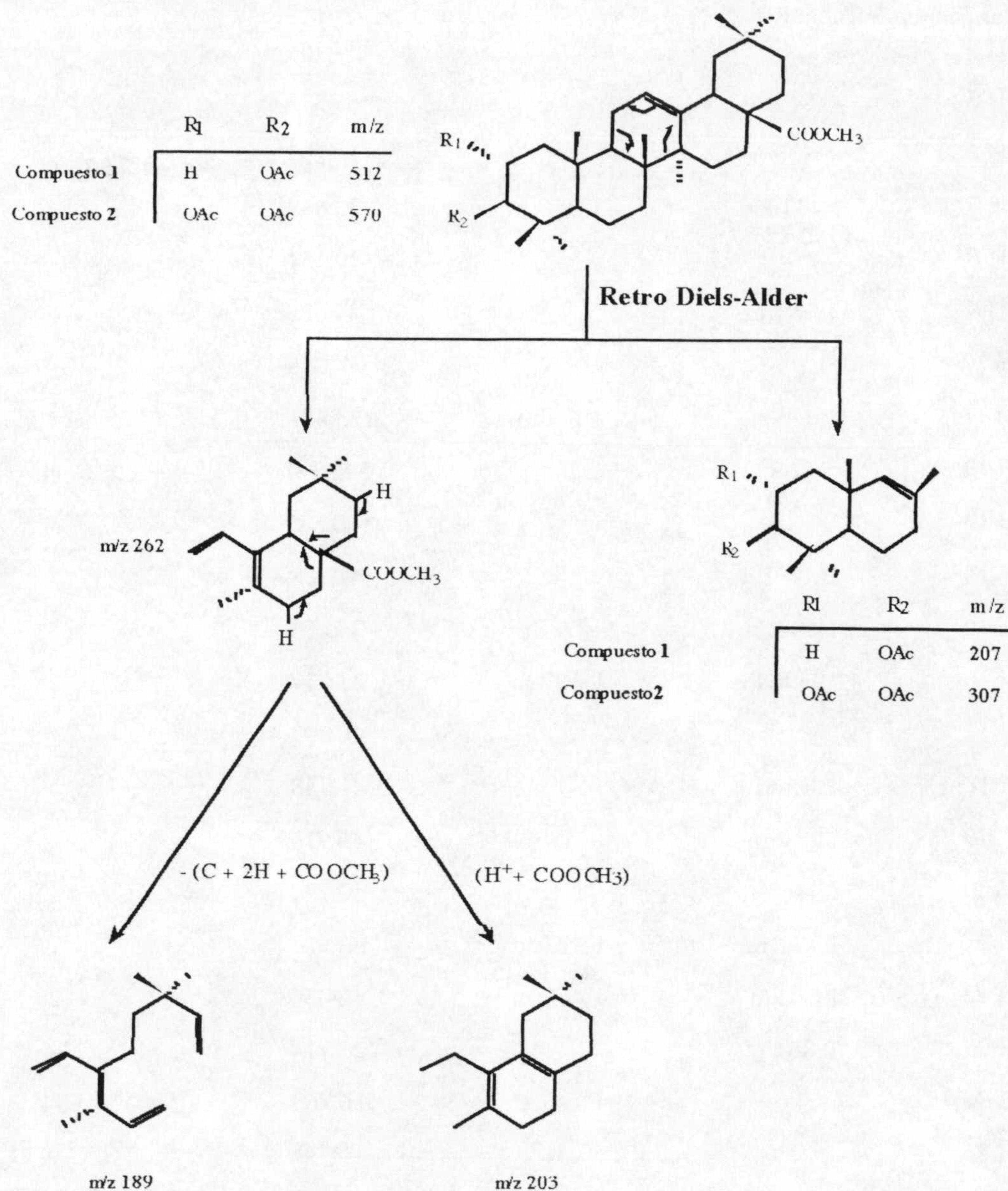
	α	β	Correlación de átomos de Carbono	
			¹³ C (HETCOR)	HMBC
H-1	1,602 m	1,037 m	38,18	C-10
H-2	1,612 m	1,032	27,754	
H-3	4,48 dd (6,2; 9,8)	-	81,013	C-2; C-4; C-26; OAc (3)

Cont.

Continuación de Tabla R.1.2.

H-4	-	-	37,765	
H-5	0,812 m	-	55,373	C-4; C-10
H-6	1,509 m	1,382ddd (2,9; 10,8)	18,294	
H-7	1,434ddd (3,2; 12,2)	1,278 m	32,668	
H-8	-	-	39,354	
H-9	1,553 dd (7; 10,4)	-	47,626	C-4; C-8; C-10
H-10	-	-	37,005	
H-11	1,866 m	1,866 m	23,481	C-12
H-12	5,268 t (3,5)	-	122,351	C-9; C-11; C-14
H-13	-	-	143,883	
H-14	-	-	41,708	
H-15	1,604 m	1,604 m	23,603	
H-16	1,959ddd (4,1; 13,38)	1,607 m	23,137	C-28
H-17	-	-	46,803	
H-18	2,85 dd (4,05; 14,0)	-	41,358	
H-19	1,132 m	1,59 m	45,914	
H-20	-	-	30,778	
H-21	1,171 m	1,328 dd (3,45; 13,1)	33,927	
H-22	1,68ddd (4,35; 13,4)	1,467 m	32,456	C-28
H-23	0,851 s	-	28,114	C-4
H-24	-	0,841 s	16,763	C-4
H-25	-	0,917	15,448	C-8; C-9; C-10
H-26	-	0,701 s	16,909	C-8; C-9; C-14
H-27	1,113 s	-	25,974	C-8; C-11; C-13; C-14
H-28	-	-	178,406	
H-29	0,866 s	-	33,189	C-20
H-30	-	0,912 s	23,721	C-20
COCH ₃ (3)	-	2,033 s	21,415	COCH ₃ (3)
COCH ₃ (3)	-	-	171,135	
OCOCH ₃	-	3,611 s	51,621	C-28

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.



Esquema R.1.1. Esquema de fragmentación retro Diels-Alder de compuestos de la familia de olean-12-en-28-oico.

Con la ayuda de los espectros bidimensionales COSY DQF, NOESY Y HOHAHA hemos podido asignar todos los protones de la molécula y la correlación bidimensional heteronuclear ha permitido asignar todos los carbonos del esqueleto (Tabla R.1.3.), estableciendo las uniones a través de los carbonos cuaternarios con HMBC.

Hemos actualizado la asignación de los carbonos C-7 y C-11 que aparecían mal atribuidos en la literatura (Chang y col., 1979; Seo y col., 1975; Tori y col., 1974).

Los anteriores datos son compatibles con una estructura de 3-acetoxiolean-12-en-28-oato de metilo (compuesto 1) (Akasbi y col., 1993; Cheung y col., 1992).

Tabla R.1.3. Correlación escalar y dipolar de los protones del compuesto 1, 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo

H	COSY	NOESY
1 α		H-3, H-5, H-9, H-23
1 β		
2 α		H-3, H-5
2 β		H-1 α , H-2 α
3	H-2 α , H-2 β	H-5
4	-	-
5	H-6 α , H-6 β	H-6 α , H-9, H-23
6 α	H-6 β , H-7 α , H-7 β	
6 β		
7 α		
7 β	H-6 α , H-6 β , H-7 α	
8	-	-
9	H-11 α , H-11 β	
10	-	-
11 α	H-9	
11 β	H-9	
12	H-11 α , H-11 β	H-11 α , H-11 β , H-18, H-19 α
13	-	-
14	-	-
15 α		
15 β		
16 α	H-15 α , H-15 β , H-16 α	H-7 β , H-27
16 β		
17	-	-
18	H-19 α , H-19 β	H-19 α , H-19 β , H-27, H-29
19 α	H-18, H-19 β	
19 β	H-18, H-19 α	
20	-	-
21 α	H-21 β , H-22 α , H-22 β	
21 β	H-21 α , H-22 α , H-22 β	H-30
22 α	H-21 α , H-21 β , H-22 β	H-21 α , H-29
22 β	H-21 α , H-21 β , H-22 α	

Cont.

Continuación de Tabla R.1.3.

23	
24	
25	H-26
26	H-6 β , H-11 β , H-25
27	H-16 α
28	-
29	
30	H-19 α , -19 β , H-21 α , H-21 β
COOCH ₃	H-26
OCOCH ₃	H-24

El espectro de RMN-¹H (espectro E-2c) (Tabla R.1.4.) del compuesto 2 guarda una gran similitud con el del compuesto 1, apareciendo un acetilo de más, que se confirma por los datos del espectro de masas (espectro E-2a) (Tabla R.1.5.) y RMN-¹³C (espectro E-2d) (Tabla R.1.4.). Por el patrón de acoplamiento de los dos protones geminales a los dos acetilos, se comprueba que ambos son vecinales, lo cual se confirma por la correlación bidimensional homonuclear COSY DQF, colocando el segundo acetilo en la posición C-2.

Tabla R.1.4. Datos de ¹H, ¹³C y HMBC del compuesto 2, 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo

	α	β	Correlación de átomos de carbono	
			¹³ C (HETCOR)	HMBC
H-1	1,998dd (4,5; 11,91)	1,043 t (11,91)	43,95	C-2; C-3; C-5; C-10; C-25
H-2		5,08ddd (4,55; 11,91)	70,11	C-1; C-3; OAc(2)
H-3	4,73 d (10,5)		80,70	C-1; C-2; C-4; C-23; C-24; OAc(3)
H-4	-	-	39,39*	
H-5	0,952dd (3; 11,5)		54,96	C-4; C-6; C-10; C-24; C-25
H-6	1,529dq (3; 13,7)	1,410dddd (3; 12,4)	18,30	
H-7	1,448ddd (3,5; 12,4)	1,291 m	32,43	C-5; C-8; C-9
H-8	-	-	39,42*	
H-9	1,593dd (6,6; 11,4)		47,62	

Cont.

Continuación de Tabla R. 1.4.

H-10	-	-	38,22	
H-11	1,826ddd (3,8; 6,6; 11,3)	1,907ddd (3,8; 10,7; 11,3)	23,71	
H-12	5,25 t (3,6)		122,02	C-9; C-11; C-14; C-18;
H-13	-	-	143,97	
H-14	-	-	41,73	
H-15	1,580 m	1,030 m	27,67	C-13
H-16	1,953ddd (4,2; 13,4)	1,600 m	23,01	
H-17	-	-	46,76	
H-18	2,843 dd (4,3; 13,7)	-	41,31	C-12; C-13; C-14; C-16; C-17; C-19; C-28
H-19	1,604 t (13,7)	1,124 dd (4,7; 13,7)	45,90	
H-20	-	-	30,78	
H-21	1,171 dq (2,5; 13,5)	1,345ddd (4; 13,7)	33,91	C-20; C-30
H-22	1,672ddd (4,4; 17,7)	1,501 dt (3; 13,7)	32,50	C-16; C-17; C-20; C-21;
H-23	0,879 s		28,50	C-4; C-5
H-24		0,890 s	17,71	C-4; C-5; C-23
H-25		1,035 s	16,50	C-1; C-5; C-9; C-10
H-26		0,702 s	16,87	C-7; C-8; C-9; C-14
H-27	1,104 s		25,96	C-8; C-13; C-14; C-15
H-28	-	-	178,34	
H-29	0,909 s		33,19	C-19; C-20; C-21; C-30
H-30		0,984 s	23,71	C-19; C-20; C-21; C-29
$\underline{\text{COCH}}_3(2)$		2,039 s	21,01	$\underline{\text{COCH}}_3(2)$
$\underline{\text{COCH}}_3(3)$	1,964 s		21,25	$\underline{\text{COCH}}_3(3)$
$\underline{\text{COCH}}_3(2)$			170,65	
$\underline{\text{COCH}}_3(3)$			170,96	
$\text{OCO}\underline{\text{CH}}_3$		3,65 s	51,65	C-28

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

*: datos intercambiables

Tabla R.1.5. Datos de EIMS e IR del compuesto **2**, 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo (P. f. 112-115°C)

COMPUESTO 2 , 2 α , 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	570 [M] ⁺ (C ₃₅ O ₆ H ₅₄), 569 [M-1] ⁺ (3.86), 571 [M+1] ⁺ (4.40), 555 [M ⁺ - CH ₃] (2.44), 511 [(M+1) ⁺ - 4 CH ₃] 6 [M ⁺ - OCOCH ₃](12.55), 495 [M ⁺ - 5 CH ₃](1.67), 481 [(M+1) ⁺ - 6 CH ₃](1.31), 466 [(M+1) ⁺ - 7 CH ₃](1.41), 465 [M ⁺ - 7 CH ₃](3.78), 451 [(M-1) ⁺ 2 OCOCH ₃ 6 [(M+1) ⁺ 2 HOCOCH ₃] 6 [(M+1) ⁺ - 8 CH ₃](69.96), 436 [(M+1) ⁺ - 8 CH ₃](1.58), 435 [(M+1) ⁺ - 7 CH ₃ - OCH ₃](4.55), 407 [(M+1) ⁺ - 7 CH ₃ - OCOCH ₃](1.53), 393 [(M+1) ⁺ - 9 CH ₃ - COCH ₃](2.47), 391 M ⁺ - 7 CH ₃ - OCH ₃ - COCH ₃](9.36), M ⁺ retro Diels-Alder: 262 C ₁₇ H ₂₆ O ₂ (34.16), 307 C ₁₈ H ₂₆ O ₄ (1.32), 203 C ₁₇ H ₂₆ O ₂ - COOCH ₃ (32.92), 189 C ₁₇ H ₂₆ O ₂ - CH ₂ COOCH ₃ (26.34), 249 C ₁₈ H ₂₇ O ₄ - OCOCH ₃ (14.40), 206 C ₁₈ H ₂₇ O ₄ - OCOCH ₃ - COCH ₃ (1.55), 190 C ₁₈ H ₂₇ O ₄ - 2 OCOCH ₃ (4.99), 177 (7.61), 167 (7.20), 149 (23.35), 113 (11.21), 97 (10.29), 85 (10.70), 83 (15.33), 71 (25.10), 69 (18.00), 61 (86.83), 59 (12.04), 57 (41.98), 55 (19.44), 45 (19.96), 43 COCH ₃ (100).
ESPECTRO DE IR ν_{\max} cm ⁻¹	3422, 2946, 1741 (CO), 1460, 1432, 1368, 1253, 1162, 1127, 1042, 918, 823, 755, 664.

De igual manera que en el compuesto **1**, los datos de las correlaciones bidimensionales homonucleares COSY DQF, NOESY (Tabla R.1.6.) y HOHAHA y heteronucleares HETCOR y HMBC, han permitido asignar todas las señales de los espectros de RMN-¹H y ¹³C, actualizando las señales atribuidas a C-7 y C-11 aparecidas en la literatura (Chang y col., 1979; Seo y col., 1975; Tori y col., 1974) identificando este compuesto como , 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo.

Tabla R.1.6. Correlación escalar y dipolar de los protones del compuesto **2**, 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo

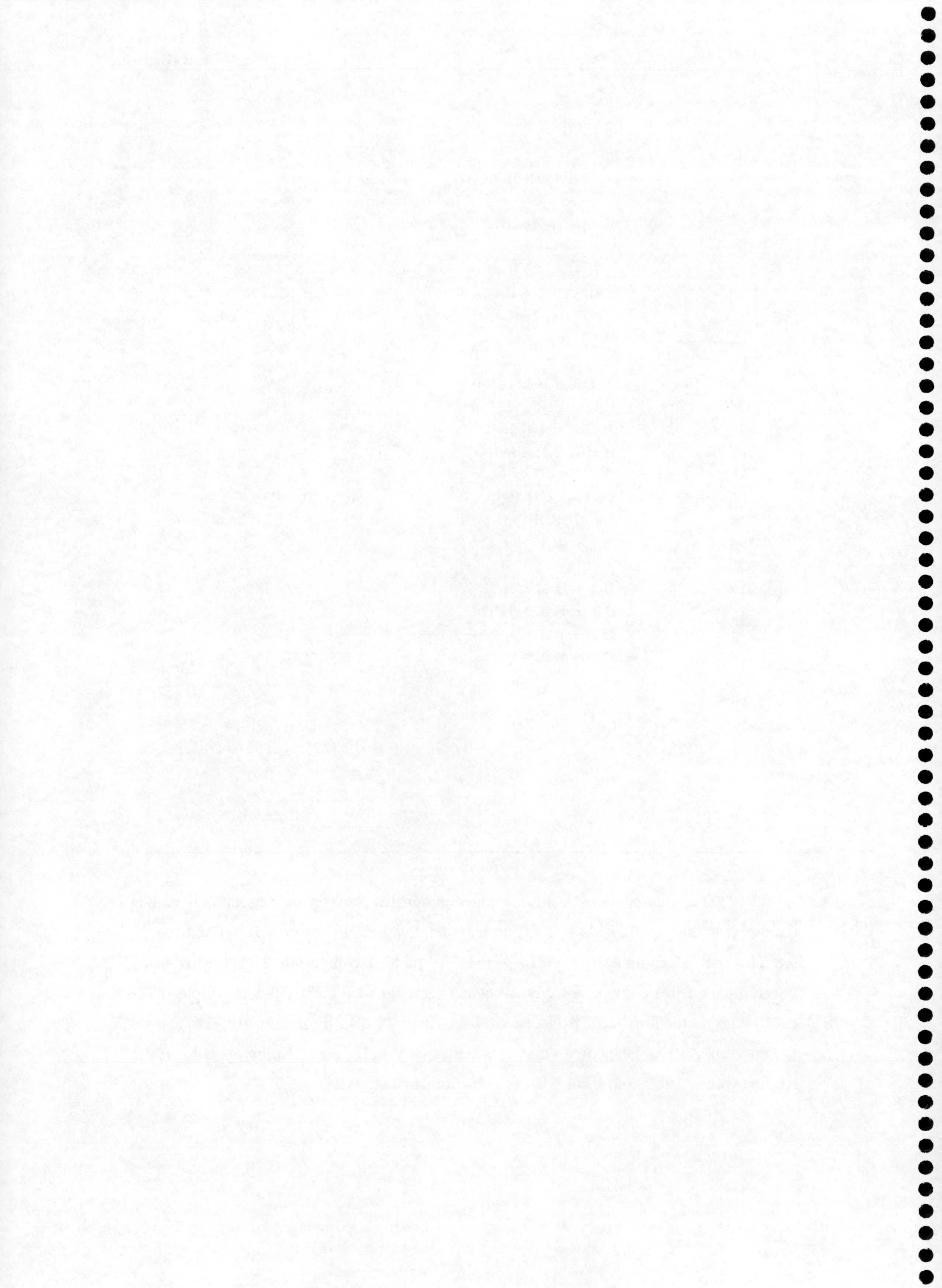
H	COSY	NOESY
1 α	H-1 β	H-2, H-3
1 β	H-1 α	H-2, H-3
2	H-1 α , H-1 β , H-3	H-1, H-24, H-25
3	H-2	H-1 α , H-5, H-23
4	-	-
5	H-6 β	H-9, H-7 α , H-23
6 α	H-6 β , H-7 α	
6 β	H-6 α , H-7 β	H-23, H-24, H-25 H-26
7 α	H-6 α , H-7 β	H-27

Cont.

Continuación de Tabla R:1.6.

7 β	H-6 α , H-6 β , H-7 α	
8	-	-
9	H-11 α , H-11 β	
10	-	-
11 α	H-9, H-11 β , H-12	
11 β	H-9, H-11 α , H-12	H-12, H-25
12	H-11 α , H-11 β	H-11 α , H-11 β , H-18, H-27
13	-	-
14	-	-
15 α	H-15 β , H-16 α , H-16 β	
15 β	H-15 α , H-16 α , H-16 β	H-26
16 α	H-15 α , H-15 β , H-16 β	
16 β	H-15 α , H-15 β , H-16 α	
17	-	-
18	H-19 α , H-19 β	H-19 α , H-29, H-22 α , H-12, H-27
19 α	H-18, H-19 β	
19 β	H-18, H-19 α	
20	-	-
21 α	H-21 β , H-22 α , H-22 β	H-19 α , H-29
21 β	H-21 α , H-22 α , H-22 β	
22 α	H-21 α , H-21 β , H-22 β	
22 β	H-21 α , H-21 β , H-22 α	H-18, H-29
23		H-6 α , H-5
24		H-6 β , H-25
25		H-6 β , H-26, H-24
26		H-11 β , H-25, H-6 β , H-7 β , H-15 β
27		H-7 α
28	-	-
29		H-22 α
30	-	-

La multiplicidad de los protones geminales a los grupos acetato en ambos compuestos, han establecido la configuración relativa de estos centros H3- α (dd, 6,2 y 9,8 Hz) para el compuesto 1 y H2- β y H3- α para el compuesto 2. De estos datos concluimos que los compuestos 1 y 2 pueden ser asignados como 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo y 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo, respectivamente (Alam y col., 1996; Bianchi y col., 1994; Furuya y col., 1987; Kojima y col., 1986; Kojima y col., 1989; Seo y col., 1981; Tchivounda y col. 1991).



R.2. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO Y ÉTER

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el análisis de los extractos de cloruro de metileno, y éter obtenidos en cada una de las extracciones realizadas en diferentes condiciones tanto de alpechín como de "alpeorujo".

Se realizó un análisis previo de cada uno de estos extractos. La primera fase de estos estudios fue un análisis preliminar de los mismos mediante RMN-¹H. El espectro de RMN-¹H (espectro E-b-c) de los distintos extractos de cloruro de metileno mostraron el mismo tipo de señales. Estas se adscribieron a productos con cadenas alquílicas, vecinales o no a grupos éter ó alcohol, cadenas olefínicas y, en menor proporción que en el caso del extracto de acetato de etilo, productos aromáticos.

En el caso de los extractos de éter los espectros de RMN-¹H (espectro E-c-c) revelaron la presencia de compuestos aromáticos, grupos aldehídos de diferente naturaleza, cadenas alquílicas vecinales o no a grupos éter o alcohol, cadenas olefínicas, grupos metoxilo y grupos hidroxilo. En este caso, el tipo de compuestos fue similar a los presentes en los extractos de acetato de etilo.

Los extractos anteriores se derivatizaron con objeto de analizarlos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas.

R.2.1. ELIMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO

El extracto de cloruro de metileno contenía una cantidad considerable de ácidos grasos (espectro E-b-c). La presencia de éstos dificultó el análisis del mismo ya que en algunos casos enmascararon y dificultaron el aislamiento e identificación de otros compuestos presentes en la muestra. La eliminación de los ácidos grasos de cada uno de estos extractos de cloruro de metileno (extracto de alpechín y extracto de "alpeorujo") se llevó a cabo tal y como se describió en la Sección de Materiales y Métodos A.3.6.1.

R.2.2. SILILACIÓN DEL EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO LIBRE DE ÁCIDOS GRASOS

Los extractos de cloruro de metileno se derivatizaron como se indicó en la Sección A.3.6.3. de Materiales y Métodos, y se analizaron por CG-EIMS. La tabla R.2.1 presenta los resultados obtenidos. En esta tabla sólo se recogen aquellos compuestos cuyo porcentaje de similitud al comparar con una librería comercial fue igual o superior al 90 %.

Tabla R.2.1. Resultados obtenidos en el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de diferentes extractos de cloruro de metileno.

Probable compuesto presente en el extracto	% Similitud con la librería
1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol)	100
ácido diisooctil-1,2-bencenodicarboxílico	99
tetradecametil heptasiloxano	96
metil éster del ácido hexadecanoico	96
ácido 2,3-bis(trimetilsilil)-2-butenedioico	92
ácido 2-(trimetilsililoxi)-2-propenoico	92
ácido 2,3-dihidroxisuccínico	92
ácido 1-propen-1,2,3-tricarboxílico	91
ácido trimetilsililoxi propanodioico	90

El análisis de los espectros de masas -por peso molecular y tipo de fragmentaciones- revelaron en este extracto la presencia de: siringaldehído, ácido 3,5-dimetoxibenzoico, ácido verátrico, 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol), ácido protocatéquico, 3,4-dihidroxibenzoico, 3,4,5-trimetoxibenzoico, 3,4,5-trimetoxibenzaldehído. La asignación inequívoca de estos compuestos pudo ser confirmada con soluciones patrón.

R.2.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ÉTER DE ALPECHÍN Y “ALPEORUJO”

El mismo proceso que se siguió para el caso de los extractos de cloruro de metileno de alpechín y “alpeorujo” se siguió para el caso de los extractos de éter obtenidos.

En esta ocasión también aparecieron ácidos grasos, los cuales se eliminaron (espectro E-c-c) para facilitar el estudio de éste extracto como se describió en la Sección de Materiales y Métodos A.3.7.1.

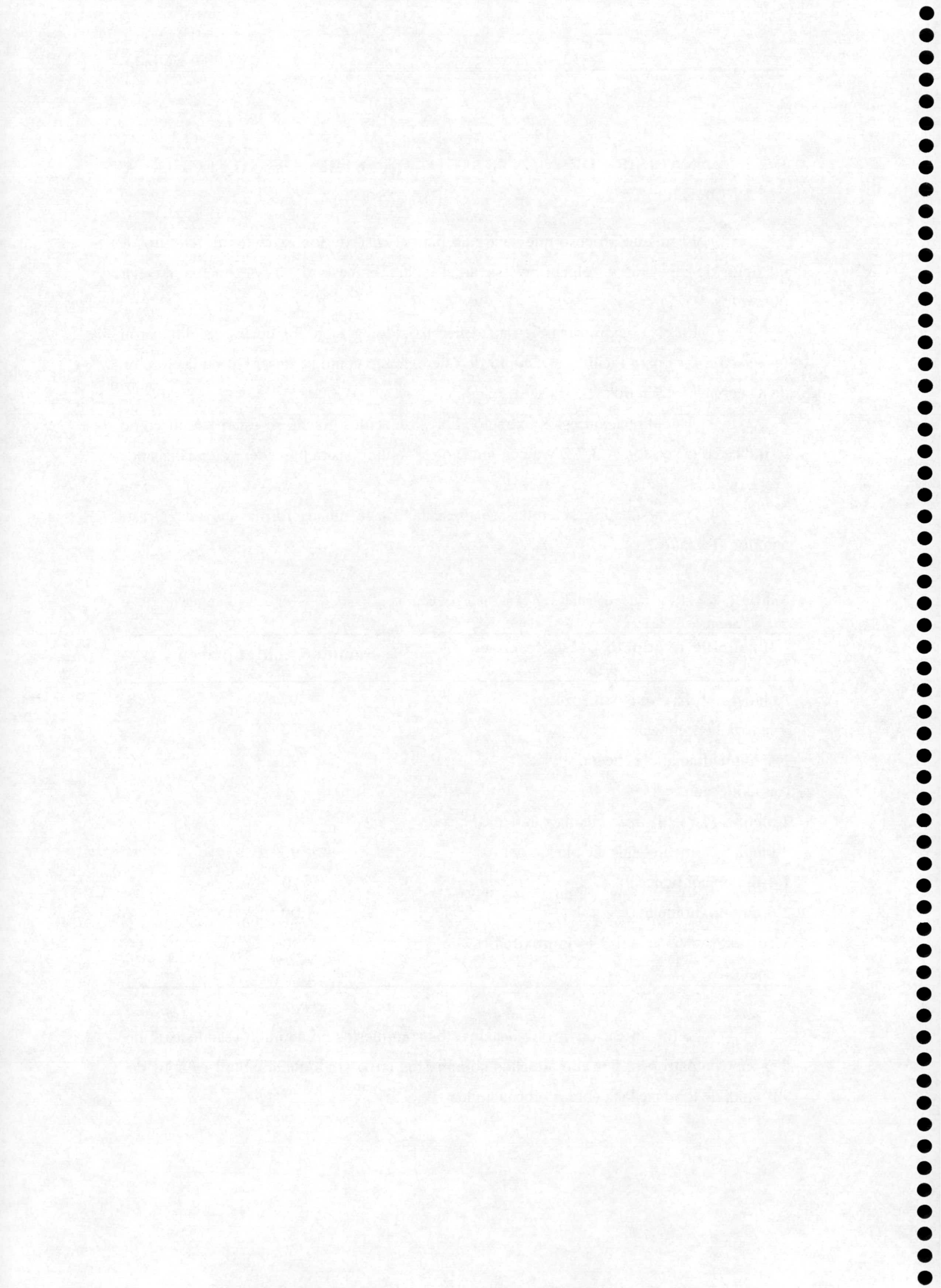
A continuación estos extractos libres de ácidos grasos se esterificaron como se indica en la sección A.3.7.2 y a continuación se sililaron para proceder a su análisis por CG-EIMS.

Los resultados obtenidos se presentan de la misma forma que en el caso anterior (Tabla R.2.2).

Tabla R.2.2. Resultados obtenidos en el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de diferentes extractos de éter.

Probable producto presente en el extracto	% Similitud con el patrón
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	97
4-hidroxibencenoetanol	94
1,4- dimetilmetanol benceno	90
ciclododecano	90
2-metil-5-(1-metil)- <i>trans</i> ciclohexanona	90
2-metil-5-(1-metiletetil)-ciclohexanona	90
1,4-dimetanol benceno	90
2,6-dimetoxitolueno	90
Metil éster del ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico	90

La identificación inequívoca de estos compuestos no se pudo establecer al no disponer de patrones, por ello aquellos compuestos cuyo grado de similitud es sólo del 90% han de tomarse las debidas precauciones.



R.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

En este capítulo se describe el análisis de los extractos de acetato de etilo obtenidos a distintos pHs y realizados sobre los residuos resultantes del proceso de extracción del aceite de oliva (alpechín y "alpeorujo"). En este trabajo de Tesis Doctoral estos extractos se analizaron exhaustivamente ya que se había descrito, y así lo confirmaron nuestros estudios, que esta fracción contenía la mayoría de los compuestos aromáticos, los cuales parecían presentar mayor problema para su biodegradación.

El análisis de los extractos de acetato de etilo (sin purificar) de alpechín y alpeorujo por RMN-¹H reveló la presencia de compuestos aromáticos sustituidos con grupos metoxilo, aldehído, hidroxilo, ácidos y cadenas alquílicas con y sin dobles enlaces.

Este extracto se derivatizó y se sometió a diferentes y progresivas cromatografías sobre sílica gel en columna y, en algunos casos, seguidas de cromatografía en capa fina preparativa con objeto de aislar algún(os) de los compuesto(s) presente(s) en el mismo y de esta manera proceder a su identificación y caracterización química. Así, se avanzaría en el conocimiento sobre los compuestos presentes en este extracto, ya que los estudios previos se habían basado fundamentalmente en comparación con soluciones patrón y tiempos de retención en análisis de cromatografía de gases y cromatografía líquida.

En algunos casos las fracciones aisladas de estas cromatografías sobre sílica gel en columna contenían mezclas complejas de compuestos, y la cantidad de muestra no era suficiente para someter dicha fracción a otro tipo de cromatografía. Por tanto este tipo de fracciones se analizaron por cromatografía de gases y cromatografía de gases-espectrometría de masas (Sección A.1.7. y A.1.8. de Materiales y Métodos) con objeto de estudiar su pureza así como intentar identificar el mayor número posible de compuestos presentes en las mismas. Basados en estudios previos y con objeto de optimizar el análisis de los productos mediante estas técnicas se prepararon una serie de soluciones patrón (Tabla R.3.1.) que se inyectaron en las condiciones descritas en la Sección A.1.7. y A.1.8. de Materiales y Métodos.

Tabla R.3.1. Soluciones patrón inyectadas en cromatografía gaseosa

Soluciones patrón: Ácido cinámico, ácido verátrico, ácido *p*-metilbenzoico, ácido *m*-anísico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, ácido *o*-metilbenzoico, ácido *o*-anísico, ácido 3,5-dimetilbenzoico, ácido 2,5-dimetilbenzoico, ácido 2,4-dimetilbenzoico, ácido 3,5-dimetilbenzoico, ácido *p*-anísico, ácido 2,3-dimetilbenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido *p*-hidroxifenilacético y tirosol

R.3.1. DERIVATIZACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

R.3.1.1. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Con objeto de disminuir la polaridad del extracto de acetato de etilo, y facilitar así el análisis cromatográfico de los mismos, se procedió a la esterificación de algunos de los extractos obtenidos, tal y como se describió en la correspondiente Sección de Materiales y Métodos A.3.8.1. Las muestras metiladas se analizaron por RMN-¹H y se comprobó la aparición de señales típicas de ésteres metílicos (3,6-3,7 ppm) lo cual, junto con la espectroscopía IR confirmó la naturaleza ácida de algunos de los compuestos presentes en este extracto.

R.3.1.2. ACETILACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

La reacción de acetilación se llevó a cabo sólo sobre el extracto de acetato de etilo metilado procedente de la extracción de alpechín, tal y como se describió en la Sección A.3.8.2. de Materiales y Métodos. El objeto de llevar a cabo diferentes derivatizaciones sobre el mismo tipo de extracto es facilitar el aislamiento de diferentes compuestos químicos en cada uno de ellos. El crudo de reacción se analizó por CCF utilizándose como mezcla eluyente hexano:acetato de etilo (3:7) (v/v), revelando un perfil bastante complejo.

R.3.2. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO METILADO Y ACETILADO DE ALPECHÍN (CROMATOGRAFÍA C)

Tres gramos de extracto de acetato de etilo de alpechín metilado y acetilado se prepararon en papilla con sílica gel gruesa y se cromatografiaron sobre sílica gel en columna como se indica en la correspondiente Sección A.3.8.3 de Materiales y Métodos. Se aislaron dos compuestos puros, uno de ellos en la fracción C4 (Compuesto 3) y otro en la fracción C7 (Compuesto 4), el cual fue aislado tras someter dicha fracción C7 a una cromatografía en capa fina preparativa (ver Sección A.3.8.4. de Materiales y Métodos). Ambos compuestos fueron identificados posteriormente como 3,5-dihidroxifeniletanol (Compuesto 3) y β -D-glucopiranosido-*o*-tiroso (Compuesto 4). La estructura de ambos compuestos se presenta en la figura R.3.1.

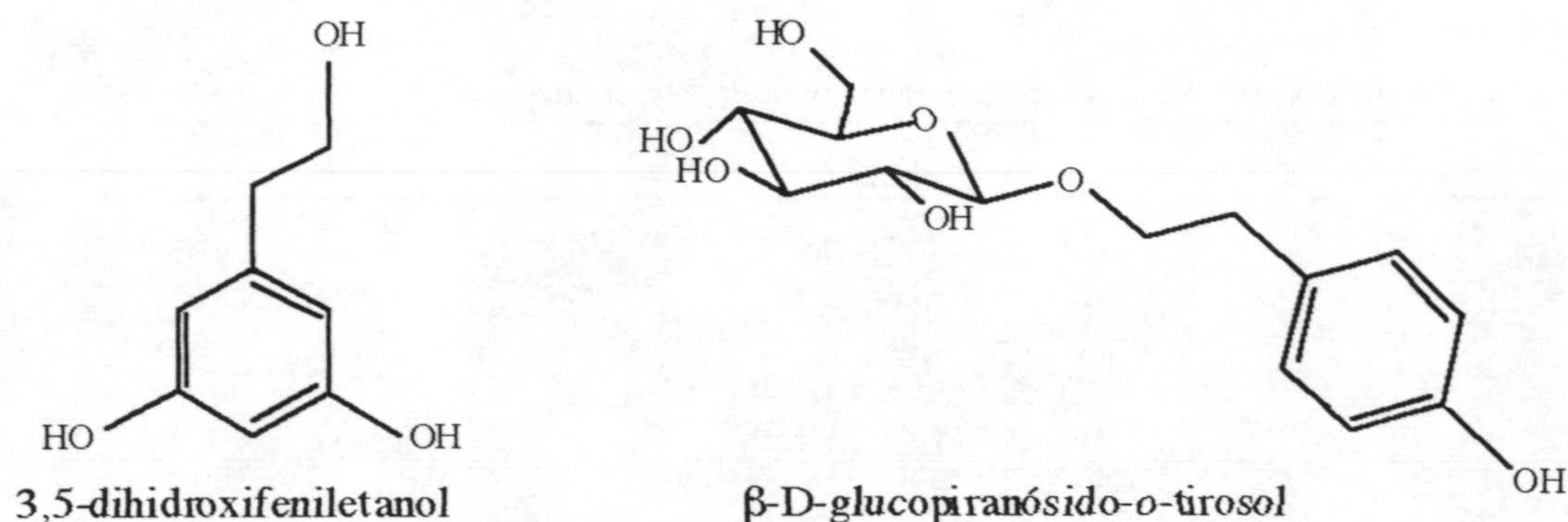


Figura R.3.1. Estructura química del compuesto 3 (3,5-dihidroxifeniletanol) y compuesto 4 (β -D-glucopiranosido-*o*-tiroso)

Las fracciones proceden de una cromatografía en la que la muestra cromatografiada fue acetilada previamente, por tanto los espectros presentados tanto del compuesto 3 como del 4 corresponden a estos compuestos acetilados, que denominamos compuesto 3' y 4'.

R.3.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO 3'

Para determinar la estructura del compuesto 3' se llevaron a cabo análisis de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HETCOR y COSY 90°.

La estructura química del compuesto **3'** fue asignada en base a los datos de RMN-¹H y ¹³C (Tabla R.3.2.) (espectros E-3'c y E-3'd) y corroborada por la información obtenida en los ensayos COSY y HETCOR (espectros E-3'e y E-3'g). El espectro de RMN-¹H mostró claramente dos señales singletes correspondientes a grupos acetato, una a δ 2,03 ppm que correspondía al grupo acetato alifático y otra a δ 2,27 ppm correspondiente a los dos grupos acetato aromáticos (Tabla R.3.2) (espectro E-3'c). Además aparecieron dos sistemas triplete correspondientes a cada uno de los dos metilenos de la cadena alifática, (δ 2,92 ppm, t, J = 6,95 Hz, grupo metileno bencílico; δ 4,26 ppm, t, J = 6,95 Hz, grupo metileno vecinal al grupo acetato) (Tabla R.3.2) (espectro E-3'c). Las señales correspondientes a los 3 protones aromáticos aparecieron como tres singletes intercambiables (Tabla R.3.2) (espectro E-3'c). La experiencia HETCOR (espectro E-3'g) junto con los datos extraídos de los análisis RMN-¹³C, permitió la asignación completa de cada uno de los carbonos (Tabla R.3.2).

Tabla R.3.2. Datos de ¹H y ¹³C del 3,5-diacetoxifeniletanoacetoxi, compuesto **3'**

	¹ H	¹³ C
1	-	136,81
2*	7,1 s	123,42
3 [#]	-	140,74
4	7,04	123,91
5 [#]	-	141,97
6*	7,09 s	127,07
7	2,92 t (6,95)	34,44
8	4,26 d (6,95)	64,41
OCOCH ₃ (8)	2,03 s	21,03
OCOCH ₃ (3 y 5)	2,27 s	20,73
OCOCH ₃ (8)	-	171,10
OCOCH ₃ (3 y 5)	-	168,38/168,40

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

*, #: Datos intercambiables entre sí.

R.3.2.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO 4'

Para determinar la estructura del compuesto 4' se realizaron experiencias de RMN-¹H, RMN-¹³C, HETCOR, COSY 90°, IR y EIMS.

El espectro de RMN-¹H (Tabla R.3.4.) (espectro E-4'c) reveló la presencia de un sistema AB en la región de los protones aromáticos típico de una sustitución en *para*, que se atribuyeron a los protones 2', 6' y a los protones 3' y 5'. Además aparecen también señales características de grupos acetato tanto aromáticos como no aromáticos. Los protones de los grupos metilenos 7' y 8' aparecen como dos tripletes intercambiables a 2,85 y 2,86 ppm ($J = 6,60$ Hz). Para los protones de la unidad de glucosa acetilada, el anomérico H-1 aparece como doblete a δ 4,46 ppm ($J = 7,93$ Hz), acoplamiento característico de una disposición β . La experiencia Cosy 90° permitió la localización de las demás señales de la unidad, apareciendo H-2 como doblete a δ 4,98 ppm ($J_1 = 7,97$ y $J_2 = 9,58$ Hz) y H-3 y H-4 como dos tripletes a δ 5,16 y 5,07 ppm respectivamente, con una constante de acoplamiento similar de 9,58 Hz. H-5 aparece como multiplete a δ 3,65 ppm y los protones diastereotópicos en la posición 6, aparecen como un doblete de dobletes a δ 4,18 ppm ($J_1 = 2,49$, $J_2 = 4,71$, $J_3 = 12,31$ Hz) típico de la parte AB de un sistema de acoplamiento ABX. El desapantallamiento de los protones H-2, H-3, H-4 y H-6, pone en evidencia su acetilación, dejando la posición 1 para establecer la unión glicosídica.

Las asignaciones realizadas en el espectro de RMN-¹³C se presentan en la tabla R.3.4 (espectro E-4'd) y se basaron en los estudios previos de Klaus Bock y Christian Pedersen (Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry) vol. 41, y (Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides) de los mismos autores, sobre la glucosa acetilada, que confirmaron la estructura de β -D-glucopiranososa del azúcar. Además se confirma la unión glicosídica en el carbonoanomérico.

El espectro de masas (espectro E-4'a) (Tabla R.3.3) del compuesto 4' reveló un fragmento de masa m/z 509, correspondiente a $[M-1]^+$ por transferencia de un hidruro a otro fragmento ion radical positivo. Se detectaron fragmentos típicos del grupo azúcar acetilado (m/z 331, $[M - C_{10}H_{11}O_3]^+$) y fragmentos correspondientes a la pérdida sucesiva de grupos acetato (Tabla R.3.3). Como pico base aparece el fragmento de m/z 120 que corresponde al grupo fenoxietanol (C_8H_8O)⁺ que vienen de la pérdida de acetato del fragmento de la ruptura en α del glicósido (Tabla R.3.3). Su espectro de IR (Tabla R.3.3.) (espectro E-4'b) reveló bandas de absorción a 1751, 1369 y 1222 cm^{-1}

Resultados

característicos de grupos acetato (C=O y C-O-C), también se observaron bandas a 2853 cm^{-1} correspondiente a un grupo éter alifático y a 1041 cm^{-1} típicos de éter cíclico, además de bandas características de anillo aromático (1629, 1507, 910, 834 y 757 cm^{-1}).

Tabla R.3.3. Datos de EIMS e IR del compuesto **4'**, tetraacetoxi β -D-glucopiranosido-*o*-(*p*-acetoxifeniletanol)

COMPUESTO 4' , tetraacetoxi β -D-glucopiranosido- <i>o</i> -(<i>p</i> -acetoxifeniletanol)	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	510 ($\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$), 509 [$\text{M}-1$] ⁺ (0,12), 468 [$\text{M}^+ - \text{COCH}_2$] (1,11), 331 [$\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$] (2,60), 229 [$\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3 - \text{COCH}_3$] (0,57), 170 [$\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3 - 2 \text{COCH}_3$] (1,48), 169 [$\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3 - 2 \text{COCH}_3$] (18,59), 163 [$\text{M}^+ - \text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$] (14,50), 162 [$\text{M}^+ - \text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$] (19,01), 127 [$\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3 - 3 \text{COCH}_3$] (4,80), 121 [$\text{M}^+ - \text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$] (87,14), 120 [$\text{M}^+ - \text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$] (100), 103 [$\text{M}^+ - \text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{12}$] (7,12), 43 [COCH_3] ⁺ (58,27)
ESPECTRO DE IR ν_{max} cm^{-1}	2925 (CH); 2853 (C-O-C); 1751 (C=O); 1222 (C-O); 1041 (éter cíclico) 1629, 1507 (arC-C); 910, 834, 757 (arC-H)

Tabla R.3.4. Datos de ^1H y ^{13}C del compuesto **4'**, tetraacetoxi β -D-glucopiranosido-*o*-(*p*-acetoxifeniletanol)

	^1H	^{13}C
1	4,46 d (7,93)	100,83
2	4,98 dd (7,97; 9,58)	71,94
3	5,16 t (9,54)	71,23
4	5,07 t (9,54)	72,90
5	3,65 m	68,57
6	4,18ddd (2,49; 4,71; 12,31)	70,50
OCOCH ₃ (2)	2,07 s	21,17
OCOCH ₃ (3)	1,98 s	20,81
OCOCH ₃ (4)	2,0 s	30,96
OCOCH ₃ (5)	1,89 s	20,66
OCOCH ₃ (2)	-	169,62
OCOCH ₃ (3)	-	170,03
OCOCH ₃ (4)	-	170,78
OCOCH ₃ (5)	-	169,50
1'	-	136,15

Cont.

Continuación Tabla R.3.4.

2', 6'	7,18 d, sistema AB (8,4; 7,48)	130,01
3', 5'	7,18 d, sistema AB (8,4; 7,48)	121,47
4'	-	149,30
7*	2,85 t (6,60)	35,41
8*	2,86 t (6,60)	62,06
OCOCH ₃ (4')	2,30 s	20,81
O ₂ COCH ₃ (4')	-	169,42

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

*: datos intercambiables

La fracción C3 se recromatografió sobre sílica gel en columna (ver Sección A.3.8.5. de Materiales y Métodos) (CROMATOGRAFÍA D). De esta cromatografía no se obtuvo ningún compuesto puro pero en el espectro de RMN-¹H de una de las fracciones recogidas, a pesar de la presencia de una mezcla de compuestos, se detectaron señales típicas de grupos aldehído, un anillo aromático disustituido en posición *para* y un grupo acetato (espectro A-D1-c).

Dada la complejidad de la mezcla de compuestos y la relativa poca cantidad de los productos se decidió analizar esta fracción mediante CG-EIMS, con objeto de obtener información relativa a dicha fracción. En la Tabla R.3.5. se recogen los resultados del análisis indicando el nombre de los compuestos probables y el porcentaje de similitud encontrado con los espectros de masas del compuesto patrón almacenado en la librería NBS75k Wiley.

Tabla R.3.5. Resultados obtenidos en cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Probable compuesto presente en el extrato	% Similitud con el patrón
hidroxitolueno butilado	98
alcohol oleico	95
octadeciléster del ácido acético	91
1,13-tetradecadieno	91
decano	90
ácido 1,2-dicarboxílico benzoico	90

Cont.

Continuación Tabla R.3.5.

1,2-dimetilbenceno	90
eicosano	90
metil éster del ácido 3-(3-hidroxifenil)-2-propenoico ó metil éster del ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico	90
2,3,4,5,6-pentaacetato D-glucosa	90

R.3.3. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 2 [EXTRACCIÓN NEUTRA]) (CROMATOGRAFÍA E)

Este extracto fue cromatografiado sobre sílica gel en columna a presión como se describió en la correspondiente Sección de Materiales y Métodos A.3.8.6. y se aislaron dos compuestos mayoritarios contenidos en una de las tres fracciones que se recogieron (Compuestos 5 y 6). Posteriormente estos compuestos fueron identificados como *p*-hidroxifenil propanol (Compuesto 5) que aparecía como producto mayoritario en esta mezcla de dos compuestos y 3,4-dihidroxifenil etanol (hidroxitirosol) (Compuesto 6).

Las estructuras de ambos compuestos se presentan en la figura R.3.2.

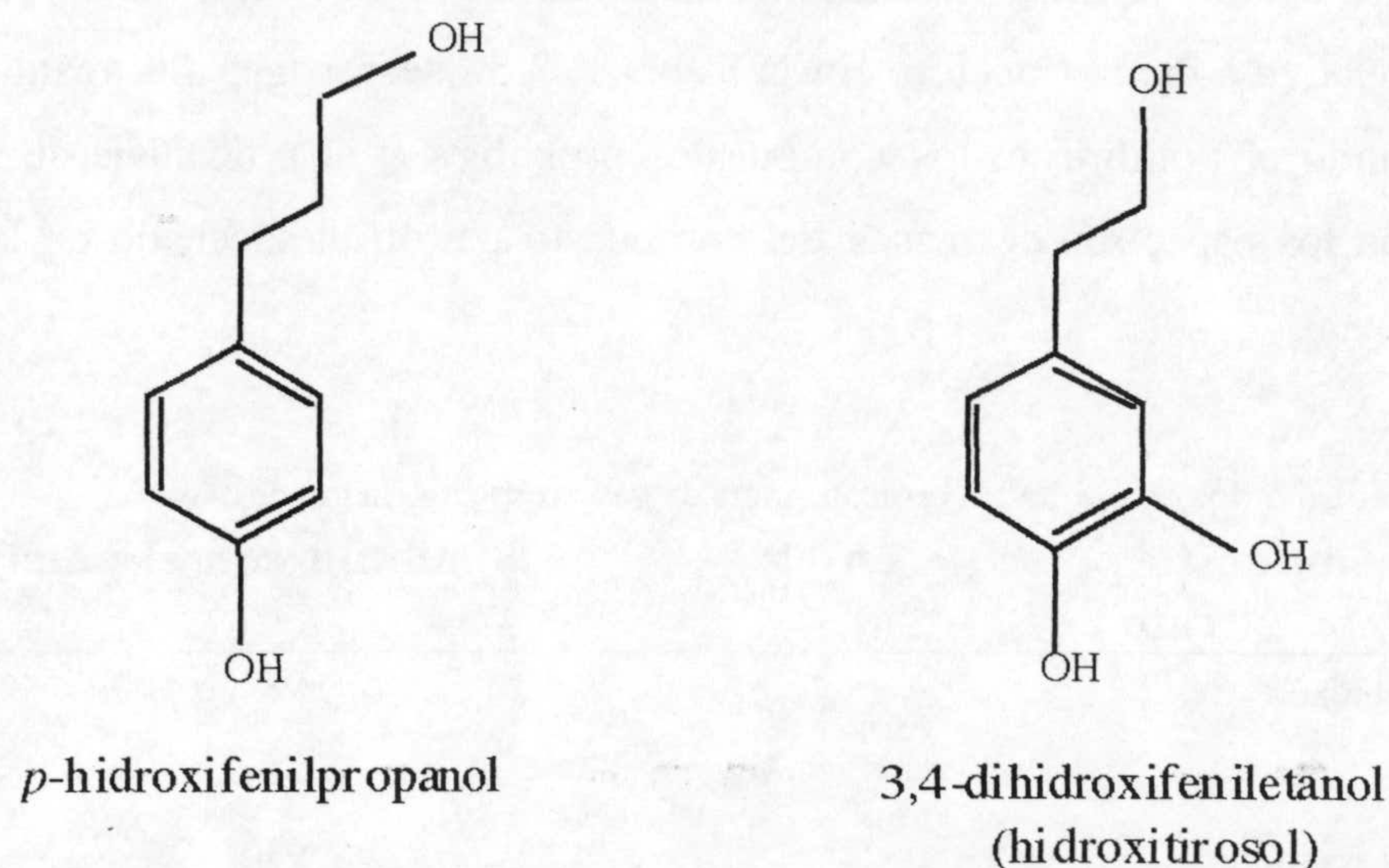


Figura R.3.2. Estructura química del compuesto 5 (*p*-hidroxifenilpropanol) y compuesto 6 (3,4-dihidroxifeniletanol ó hidroxitirosol)

R.3.3.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS 5 Y 6

La estructura de los compuestos **5** y **6** se determinó en base a las experiencias de RMN-¹H, RMN-¹³C, IR y EIMS-Cromatografía de gases.

El espectro de IR (Tabla R.3.6) (espectro E-5,6b) de la mezcla de ambos compuestos presentó bandas típicas de grupos hidroxilo a 3352 cm⁻¹, un anillo aromático (1617, 1513 cm⁻¹) y grupo alcohol a 1237, 1043 cm⁻¹. Además en el espectro de masas correspondiente al compuesto **6** (Tabla R.3.6) (espectro E-6a) apareció un fragmento de m/z 154 que correspondía al pico M⁺. También aparecieron fragmentaciones correspondientes a pérdida de H₂O (m/z 136 [M - H₂O]⁺).

Respecto al compuesto **5** el fragmento más representativo fue el pico base a m/z 107 [M - CH₂ - CH₂OH]⁺.

Tabla R.3.6. Datos de EIMS e IR de los compuestos **5**, *p*-hidroxifenilpropanol y **6**, 3,5-dihidroxifeniletanol ó hidroxitirosol.

COMPUESTO 5, <i>p</i> -hidroxifenilpropanol	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	(C ₉ H ₁₂ O ₂) 152, 107 [M ⁺ - CH ₂ CH ₂ OH] (100), 89 [M ⁺ - CH ₂ CH ₂ OH H ₂ O] (0,9), 77 [C ₆ H ₅] ⁺ (16)
COMPUESTO 6, 3,5-dihidroxifeniletanol ó hidroxitirosol	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	(C ₈ H ₁₀ O ₃), 154 [M] ⁺ (2), 136 [M - H ₂ O] ⁺ (1), 122 [M - CH ₂ OH] ⁺ (9,5), 109 [M - CH ₂ CH ₂ OH] ⁺ (8), 96 (58), 72 (12), 71 (48).
COMPUESTO 5, <i>p</i> -hidroxifenilpropanol y COMPUESTO 6, 3,5-dihidroxifeniletanol ó hidroxitirosol	
ESPECTRO DE IR ν _{max} cm ⁻¹	3352 (OH); 2929, 1448 (CH ₂ -), 1617,1513 (arC-C), 1237 (arC-OH), 1043 (CH ₂ OH), 821 (arC-H)

Los datos de RMN-¹H y ¹³C (Tablas R.3.7 y R.3.8) (espectros E-5, 6c y E-5,6d) presentan señales correspondientes a ambos compuestos, que se asignaron en base a la proporción mayoritaria del compuesto **5** frente al compuesto **6** junto con el patrón de acoplamiento en protones para ambas sustancias, así como el número de carbonos que presenta cada uno. Estos datos se recogen en las tablas R.3.7. y R.3.8.

Como se puede comprobar en estas tablas, las señales de los protones de los metilenos geminales a hidróxido en ambas sustancias están muy próximos en el desplazamiento químico (Δδ = 0,01), lo mismo para los metilenos bencílicos (Δδ = 0,06), y debajo de estos últimos se vislumbra el quinteto del CH₂- 8. Para comprobar la

existencia de este quinteto y su localización se irradió en la zona de los metilenos hidroxílicos, lo que originó que los grupos metilenos bencénicos aparecieran como dos singletes y entre ambos sobresalía el triplete en este caso del CH₂- 8, ya que ahora se acoplaba solamente con su metileno bencénico correspondiente.

Las asignaciones del espectro de RMN-¹³C se presenta en las Tablas R.3.7 y R.3.8 (espectro E-5, 6-d).

Tabla R.3.7. Datos de ¹H y ¹³C del *p*-hidroxifenilpropanol, compuesto 5

	¹ H	¹³ C
1	-	130,92
2, 6	6,88 d, sistema AB (8,44; 14,54)	130,64
3, 5	6,88 d, sistema AB (8,44; 14,54)	115,85
4	-	156,48
7	2,64 t (7,12)	39,65
8	2,7 q (7,12)	39,39
9	3,68 t (7,12)	64,21

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

Tabla R.3.8. Datos de ¹H y ¹³C del 3,5-dihidroxifeniletanol ó hidroxitirosol, compuesto 6

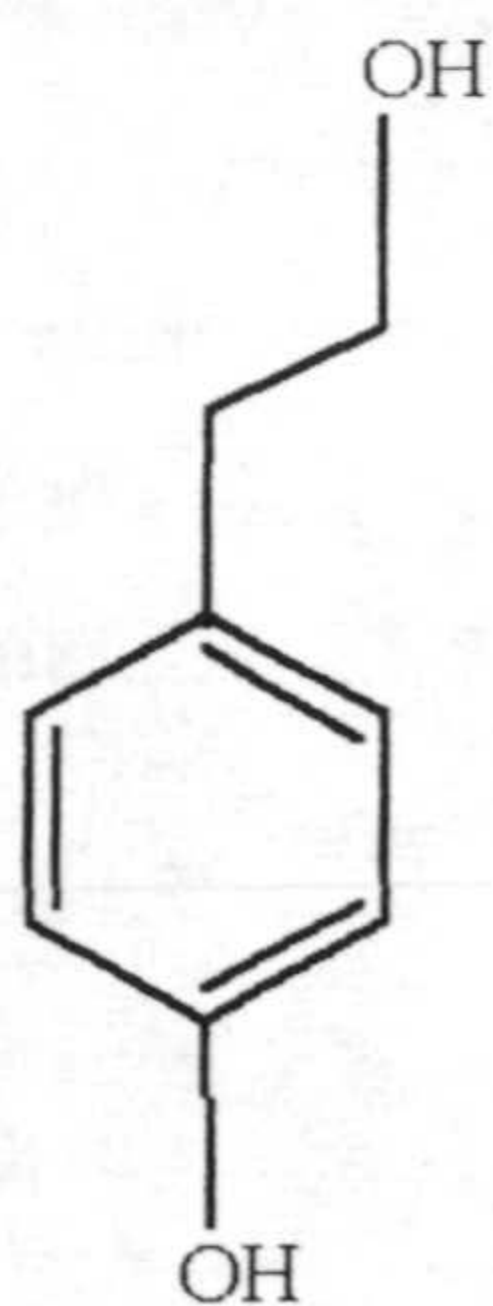
	¹ H	¹³ C
1	-	131,86
2	6,704 d (2,1)	116,83
3	-	145,64
4	-	144,08
5	6,703 d (8)	118,51
6	6,53 dd (2,1; 8)	120,98
7	2,70 t (7,14)	4,096
8	3,66 t (7,14)	64,48

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

R.3.4. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ALPECHÍN (EXTRACCIÓN 3 [EXTRACCIÓN 3b]) (CROMATOGRAFÍA F)

Este extracto sin derivatizar se cromatografió sobre sílica gel en columna a presión como se describió en la Sección de Materiales y Métodos A.3.7.7. Después de su estudio por CCF se realizaron 3 agrupaciones principales. En la agrupación F1 se aisló un producto puro (Compuesto 7) que fue identificado como *p*-hidroxifeniletanol (tirosol).

La estructura química de dicho compuesto se muestra en la figura R.3.3 y fue determinada por RMN-¹H y RMN-¹³C.



p-hidroxifeniletanol
(tirosol)

Figura R.3.3. Estructura química del compuesto 7 (*p*-hidroxifeniletanol ó tirosol)

En su espectro de RMN-¹H (Tabla R.3.9) (espectro E-7c) se observaron dos tripletes a 2,627 ppm ($J = 7,44$ Hz) y 3,575 ppm ($J = 7,44$ Hz) correspondientes a dos grupos metilenos acoplados entre sí, uno de ellos soportando el grupo alcohol y otro vecinal al anillo aromático. En la zona de los protones aromáticos se observaron dos dobletes que forma un sistema AB lo cual sugiere una disustitución en *para*. Cada uno de estos dobletes se correspondía a los protones H-2 y H-6 por un lado, y a los protones H-3 y H-5 por otro. En su espectro de RMN-¹³C (espectro E-7d) (Tabla R.3.9) se encontraron las señales características de cada uno de los carbonos correspondientes a los protones asignados en el espectro de RMN-¹H.

Tabla R.3.9. Datos de ^1H y ^{13}C del *p*-hidroxifeniletanol (tirosol) compuesto 7

	^1H	^{13}C
1	-	130,972
2, 6	6,81 d, sistema AB (8,38; 14,24)	130,663
3, 5	6,81 d, sistema AB (8,38; 14,24)	115,816
4	-	154,200
7	2,627 t (7,44)	39,462
8	3,575 t (7,44)	64,230

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

En las fracciones F2 y F3 aparecieron mezcla de compuestos. La fracción F3 se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas y sólo se pudo establecer la posible presencia de un compuesto cuyo porcentaje de similitud con los patrones en la base de datos fue igual ó superior al 90 %. Este compuesto se podría tratar del ácido 4-hidroxibencenopropanoico. La fracción F2 pesó 6,736 g así que se recromatografó sobre sílica gel en columna (CROMATOGRAFÍA G).

R.3.4.1. CROMATOGRAFÍA G

En esta cromatografía se realizaron una serie de agrupaciones y en ninguna de ellas se obtuvieron productos puros, solo mezclas complejas de productos tipo aromático con sustituyentes grupos aldehído, metoxilo, ácido y cadenas alquílicas, así como productos con sustituyentes del tipo azúcar (Espectro E-G12-c). Se realizaron 16 agrupaciones. Las fracciones G2, G6, G8 y G11 fueron acetiladas con piridina y anhídrido acético tal y como se describió en la Sección de Materiales y Métodos A.3.8.9.

El análisis por RMN- ^1H de la fracción G2 acetilada mostró la presencia de grupos acetoxilo aromáticos por encima de 2 ppm. Esta fracción se volvió a cromatografiar sobre sílica gel en columna (Cromatografía H) (Ver Sección R.3.4.2.)

Las fracciones G6, G8 y G11 acetiladas se metilaron con diazometano, ya que el análisis por IR mostró la presencia de absorciones típicas de grupos ácido. Dada la polaridad similar de los productos presentes, estas fracciones sólo se analizaron por CG-EIMS. El análisis solo permitió asignar un compuesto como ácido etanedioico (90% de similitud con la solución patrón).

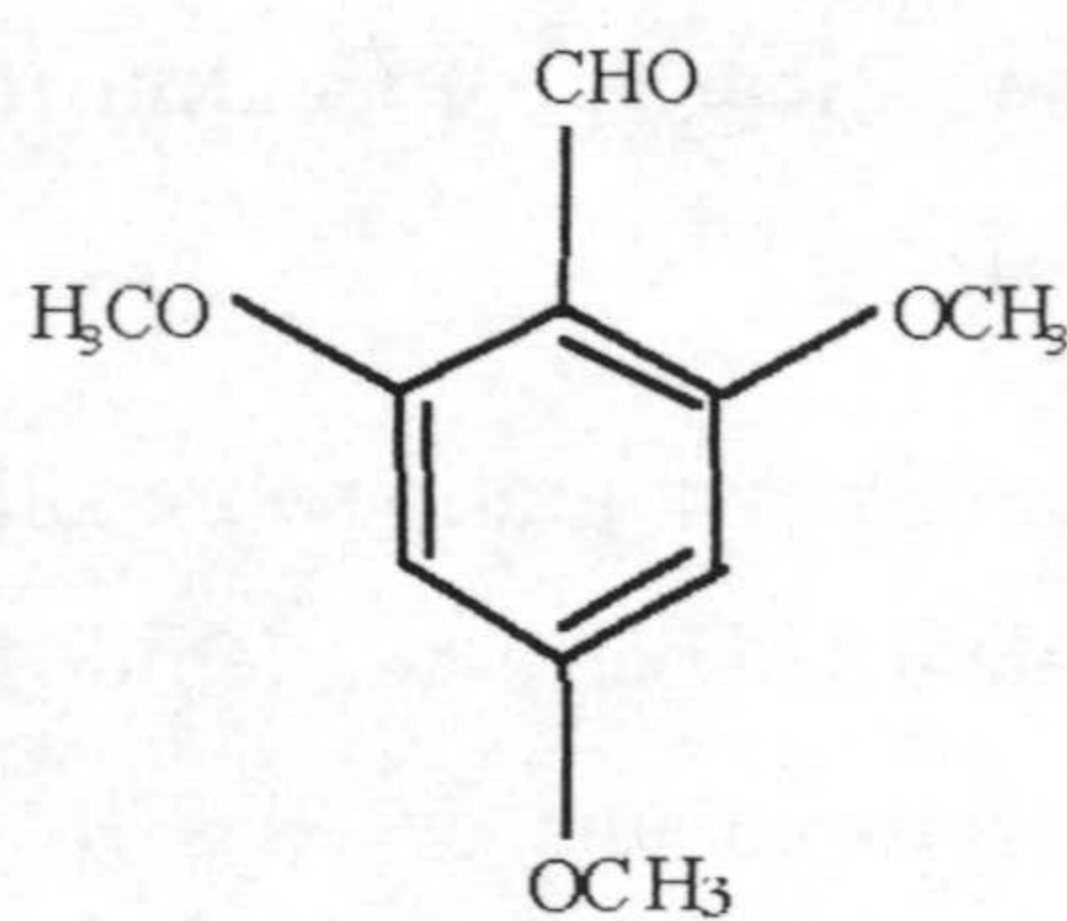
El resto de las fracciones obtenidas en esta cromatografía G también se analizaron por CG-EIMS y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla R.3.10.

Tabla R.3.10. Resultados obtenidos en el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la cromatografía G (excepto las fracciones G6, G8 y G11 cuyo resultado se mostró anteriormente)

Nombre del compuesto	% Similitud con solución patrón
Ácido 2-hidroxifenilacético	93
Ácido 3,4-dimetoxibenzoico	92
Ácido 2-hidroxibenzoico	90

R.3.4.2. CROMATOGRAFÍA SOBRE SÍLICA GEL EN COLUMNA DE LA FRACCIÓN G2 ACETILADA (CROMATOGRAFÍA H)

La fracción G2 acetilada se cromatografió sobre sílica gel en columna como se indicó en la Sección de Materiales y Métodos A.3.8.10. Se recogieron 8 fracciones que se analizaron por RMN-¹H. En todas ellas aparecían mezclas de compuestos. En la fracción H2 además de la mezcla de compuestos apareció un producto mayoritario. Tras analizar su espectro de RMN-¹H (Tabla R.3.11) (espectro E-8c) este compuesto se identificó como 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (compuesto 8). En la figura R.3.4 se presenta su estructura química.



2,4,6-trimetoxibenzaldehído

Figura R.3.4. Estructura química del compuesto 8 (2,4,5-trimetoxibenzaldehído)

Tabla R.3.11. Datos de ^1H del compuesto **8** (2,4,6-trimetoxi benzaldehído)

	^1H
1	-
2	-
3	7,645 s
4	-
5	7,645 s
6	-
CHO	9,612 s
OCH ₃	3,726 s

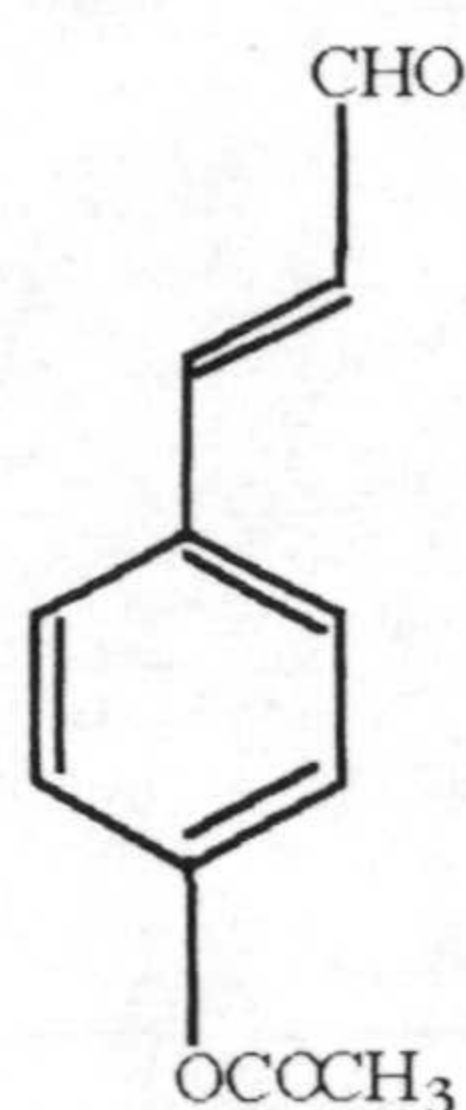
Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

Las agrupaciones H5 y H6 contenían una mezcla de compuestos. No obstante el espectro de RMN- ^1H de cada una de ellas reveló la presencia de señales correspondientes a un producto mayoritario del tipo del ácido cumárico con un acetoxilo en posición 4.

Las fracciones H3, H4, H5 y H6 se esterificaron tal y como se indicó en la sección A.3.8.11. Y a continuación se llevaron a cabo otra serie de cromatografías sobre sílica gel en columna de cada una de estas fracciones metiladas.

R.3.4.2.1. Cromatografía sobre sílica gel en columna de la agrupación H3 metilada (Cromatografía I)

La fracción H3 metilada se cromatografió sobre sílica gel en columna como se describió en la Sección A.3.8.12 de Materiales y Métodos. En todas las fracciones aparecieron mezclas de compuestos pero en una de ellas (fracción I-1) se encontró un producto mayoritario. Su espectro de RMN- ^1H (Tabla R.3.12.) (espectro E-9c), permitió identificar el compuesto **9** como 3-(*p*-acetoxifenil)-2-propen-1-al. Su estructura química se presenta en la figura R.3.5.

3-(*p*-acetoxifenil)-2-propen-1-al**Figura R.3.5.** Estructura química del compuesto **9** (3-(*p*-acetoxifenil)-2-propen-1-al)

En el espectro de RMN- ^1H (Tabla R.3.12.) (espectro E-9c), apareció una señal a 9,7 ppm, s, característica de un grupo aldehído. Además aparecieron dos dobletes, que integraban por un protón cada uno a 7,71 ppm y otro a 6,37 ppm, desplazamientos químicos típicos de protones olefínicos conjugados; además la constante de acoplamiento $J = 16$ Hz para los dos es característica de un doble enlace con acoplamiento entre protones en *trans*, todo ello sugería la presencia de dicho doble enlace conjugado a un anillo aromático. En la región de los protones aromáticos se encontraron dos dobletes de un sistema AB, cada uno de los cuales integró por dos protones y con constantes de acoplamiento características de un acoplamiento en *orto* (8,53 Hz), esto sugería la presencia de un anillo aromático disustituido en *para*. Todos estos hechos nos llevaron a identificar el compuesto **9** como 3-(*p*-acetoxifenil)-2-propen-1-al siendo el producto original que probablemente se encontraba en el alpechín el 3-(*p*-hidroxifenil)-2-propen-1-al, ya que esta cromatografía procede de una fracción que fue previamente acetilada y esterificada.

Tabla R.3.12. Datos de ^1H del compuesto **9**, 3-(*p*-acetoxifenil)-2-propen-1-al

	^1H
1	-
2, 6	7,73 d sistema AB (8,58; 19,83)
3, 5	7,73 d sistema AB (8,58; 19,83)
4	-

Cont.

Continuación de tabla R.3.12.

7		7,71 d (16)
	8	6,37 d (16)
	CHO	9,7 s
	OCOCH ₃	2,30 s
	OCOCH ₃	-

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

El análisis del resto de las fracciones no permitió identificar ningún producto nuevo, por ello se analizaron mediante CG-EIMS (Tabla R.3.13.).

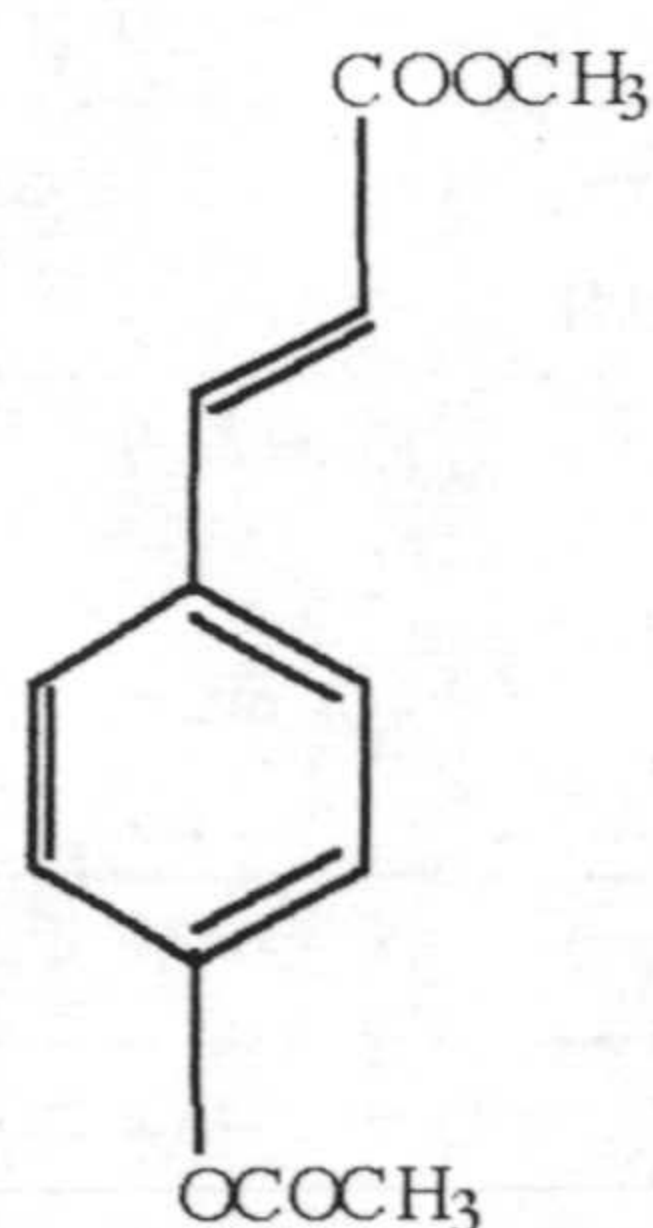
Tabla R.3.13. Resultados obtenidos en el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la cromatografía I.

Probable compuesto en el extracto	% Similitud con el producto patrón
metil éster del ácido hexadecanoico	98
Nonadecano	97
hidroxitolueno butil	97
1,3-dimetilbenceno	95
1-octadecano	92
3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico	90
3-hexin-1-ol	90
(E,Z)-5,7-dodecadieno	90
2-metil-5-(1-metil)ciclohexanona	90

Si se comparan las fragmentaciones de los espectros de masas de algunos compuestos cuya similitud con patrones fue inferior a un 90% se podría decir que podría representar a éstos o a isómeros de los indicados a continuación: *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, diácido 1,4-benceno, diácido 1,4-dietanoicobenceno.

R.3.4.2.2. Cromatografía sobre sílica gel en columna de la agrupación H4 metilada (Cromatografía J)

En esta cromatografía (ver Sección A.3.8.13. de Materiales y Métodos) se obtuvieron 8 fracciones y solo en la fracción 1 apareció un producto puro (Compuesto 10), que tras su análisis por RMN-¹H, espectrometría de masas e IR fue identificado como *p*-acetoxicumarato de metilo. La estructura de dicho compuesto se presenta en la figura R.3.6.



p-acetoxicumarato de metilo

Figura R.3.6. Estructura química del compuesto 10 (*p*-acetoxicumarato de metilo)

Dado que esta fracción fue previamente acetilada y metilada, el producto que probablemente se encontrase en el residuo analizado es el ácido *p*-hidroxicumárico. En su espectro de masas (Tabla R.3.14) (espectro E-10a) apareció un fragmento correspondiente a M^+ a m/z 220 (8,22%), así como fragmentaciones típicas de pérdida de ceteno por transferencia de protón del acético al oxígeno del anillo aromático a m/z 178 (95,58%) y pérdida del grupo metoxilo del grupo ácido esterificado, y éste además es el pico base a m/z 147 (100%). En su espectro de IR (Tabla R.3.14) (espectro E-10b) aparecieron bandas típicas de grupos carbonilo éster a 1736 cm^{-1} , además bandas características de aromáticos a 1436 , 1203 y 1167 cm^{-1} . En el espectro de RMN-¹H (Tabla R.3.15) (espectro E-10c) aparecieron señales inequívocas de este compuesto metilado y acetilado, del mismo tipo de señales que aparecían en la fracción I-1 de la cromatografía I (Sección R.3.4.2.1). En este caso en lugar de una señal a δ : 9,7 ppm de un grupo aldehído, apareció otra señal a δ : 3,802 ppm, s, correspondiente a un grupo metoxilo.

Con todos los datos obtenidos el compuesto 10 fue identificado como *p*-acetoxicumarato de metilo.

Tabla R.3.14. Datos de EIMs del compuesto **10**, *p*-acetoxicumarato de metilo

COMPUESTO 10, <i>p</i> -acetoxicumarato de metilo	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	220 [M] ⁺ (C ₁₂ H ₁₂ O ₄) (8,22), 178 [M ⁺ - CH ₂ CO] (95,58), 161 [M ⁺ - COOCH ₃] (0,93), 148 [M ⁺ - COOCH ₃ - CH] (9,97), 147 [M ⁺ - CH ₂ CO - OCH ₃] (100), 135 [M ⁺ - CH=CH - COOCH ₃] (0,49), 119 [M ⁺ - COCH ₂ - COOCH ₃] (16,30), 101 [M ⁺ - COCH ₂ - COOCH ₃ - H ₂ O] (0,88), 91 [M ⁺ - COCH ₂ - COOCH ₃ - H ₂ O - 2CH ₂] (11,74), 77 [C ₆ H ₅] ⁺ (1,98)
ESPECTRO DE IR ν _{max} cm ⁻¹	2925 (CH); 1736 (C=O); 1635 (CH=CH); 1436 (ArC-C); 1321 (C-O); 1203, 1167 (ArC-H)

Tabla R.3.15. Datos de ¹H del compuestos **10**, *p*-acetoxicumarato de metilo

	¹ H
1	-
2, 6	7,54 d (8)
3, 5	7,12 d (8)
4	-
7	7,668 d (15)
8	6,389 d (15)
COOCH ₃	3,802 s
COOCH ₃	-
OCOCH ₃	2,308 s
OCOCH ₃	-

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

En el resto de las fracciones aparecieron mezclas complejas de productos que se analizaron por CG-EIMS. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla R.3.16.

Tabla R.3.16. Resultados obtenidos en el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la cromatografía J.

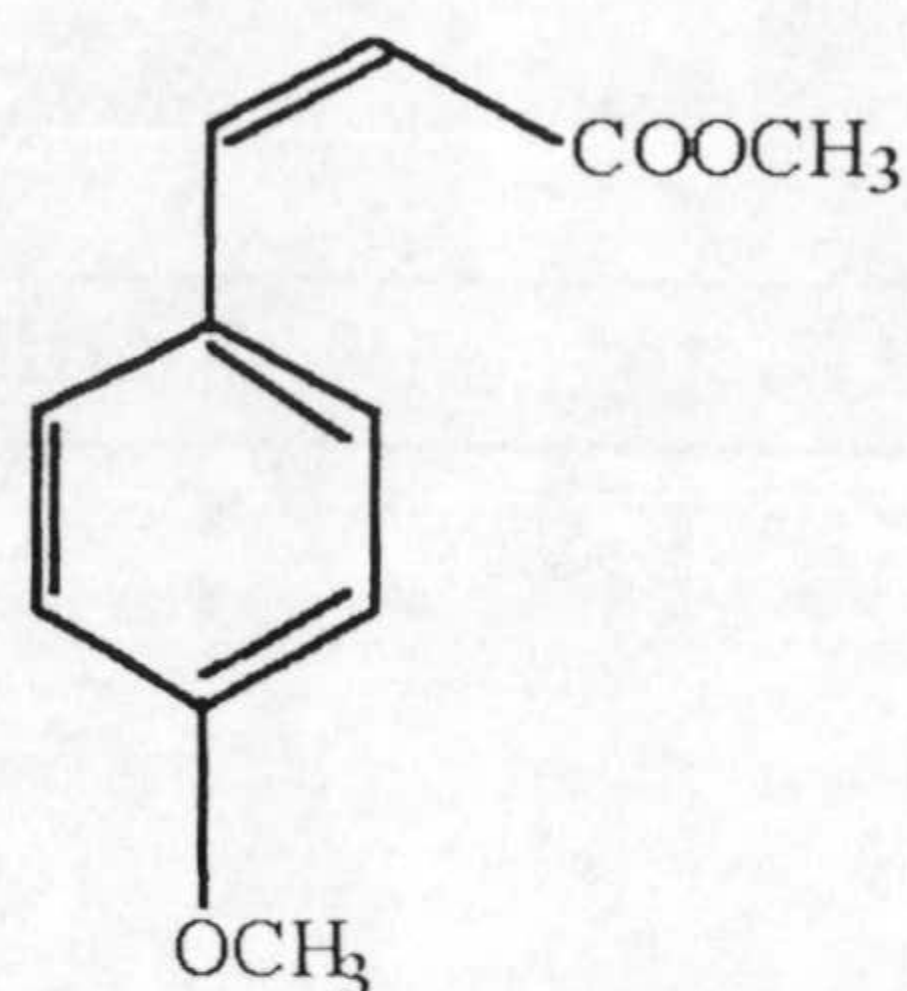
Probable compuesto en el extracto	% Similitud con el producto patrón
hidroxitolueno butilado	98
hexadecano	96
tricosano	95
Decano	94
<i>p</i> -xileno	94

R.3.4.2.3. Cromatografía sobre sílica gel en columna de la agrupación H6 metilada (Cromatografía K)

En esta cromatografía (ver Sección A.3.8.14. de Materiales y Métodos) se recogieron 4 fracciones, en las fracciones K1, K3 y K4 aparecieron, al igual que en el caso anterior una mezcla compleja de productos. En el espectro de RMN-¹H de estas fracciones aparecieron señales de protones aromáticos, grupos aldehído, doble enlace, cadena alquílica junto a oxígeno, cadenas alquílicas junto a anillo aromático.

El análisis de estas fracciones por CG-EIMS no proporcionó ningún compuesto cuya similitud fuera igual o superior al 90 %, pero a través del espectro de masas de algunos de estos compuestos se puede decir que el tipo de compuestos presentes en estas fracciones eran los citados a continuación o algún isómero de éstos. Estos compuestos son: ácido *o*-hidroxifenilacético, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico, hidroxitirosol, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, ácido verátrico, ácido gálico, ácido protocatéquico y vanillina.

En la fracción K2 apareció una mezcla del compuesto 10 presente en la fracción J1 de la cromatografía J (Sección R.3.4.2.2.) y otro compuesto, que por las señales que aparece en su espectro de RMN-¹H (espectro E-K2-c), podría tratarse del *cis-p*-metoxicumarato de metilo (Figura R.3.7), aunque no se dispone de pruebas suficientes que confirmen su estructura.



cis, *p*-metoxicumarato de metilo

Figura R.3.7. Estructura química del compuesto *cis*, *p*-metoxicumarato de metilo

R.3.5. ESTUDIO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE “ALPEORUJO” (CROMATOGRAFÍA L)

El extracto de acetato de etilo de “alpeorujo” se analizó primero por RMN-¹H. Aparecieron compuestos similares a los detectados en el análisis previo del extracto de acetato de etilo de alpechín.

En la cromatografía L llevada a cabo sobre este extracto de acetato de etilo esterificado se recogieron una serie de fracciones. Los análisis por RMN-¹H revelan la presencia en las fracciones L1, L2 y L3 de dos productos lineales, que se describen en la Sección de Resultados R.4. En el resto de las fracciones aparecieron productos aromáticos. Algunas de estas fracciones se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas, y por coelución con soluciones patrón se identificaron los siguientes compuestos: ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido verátrico, ácido 2,4- y 2,3-dihidroxibenzoico, ácido 3,5-dimetilbenzoico, ácido 2,3-dimetilbenzoico, ácido *m*-anísico, ácido *p*-anísico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, ácido cinámico, ácido *p*-hidroxifenilacético y *p*-hidroxifeniletanol (tirosol). Otras fracciones se derivatizaron y el análisis por CG-EIMS sólo nos mostró tres compuestos que fueron el ácido diisooctil 1,2-bencenodicarboxílico con un porcentaje de similitud de un 98 % con respecto al patrón, el ácido 2,3-bis(trimetilsiloxi) succínico con un 95 % de similitud y el ácido 2-propenoico con un 91% de similitud. Este tipo de compuestos ya habían aparecido en otras cromatografías llevada a cabo sobre el extracto de acetato de etilo de alpechín.

En la fracción L5 se aisló un compuesto puro aislado previamente en la cromatografía E (Sección R.3.4.) junto con el *p*-hidroxifenilpropanol (Compuesto 5), se trata del hidroxitirosol (Compuesto 6). Sus datos espectroscópicos se presentaron en la Sección R.3.4.

El espectro de RMN-¹H de algunas fracciones (L6, L7 y L8) reveló la presencia de mezcla de productos y señales que posteriormente aparecen en espectros correspondientes a productos algo más purificados.

En el espectro de RMN-¹H y ¹³C de la fracción L9 (espectro E-L9-c y espectro E-L9-d) aparecieron señales de éster metílico del ácido *p*-hidroxifenilpropanoico (Compuesto 14) además de éste último (Compuesto 13) debido a una esterificación parcial de la fracción. En la figura R.3.8. se presentan las estructuras de dichos compuestos. Las asignaciones de sus espectros de RMN-¹H y ¹³C se presentan en la Tabla R.3.18.

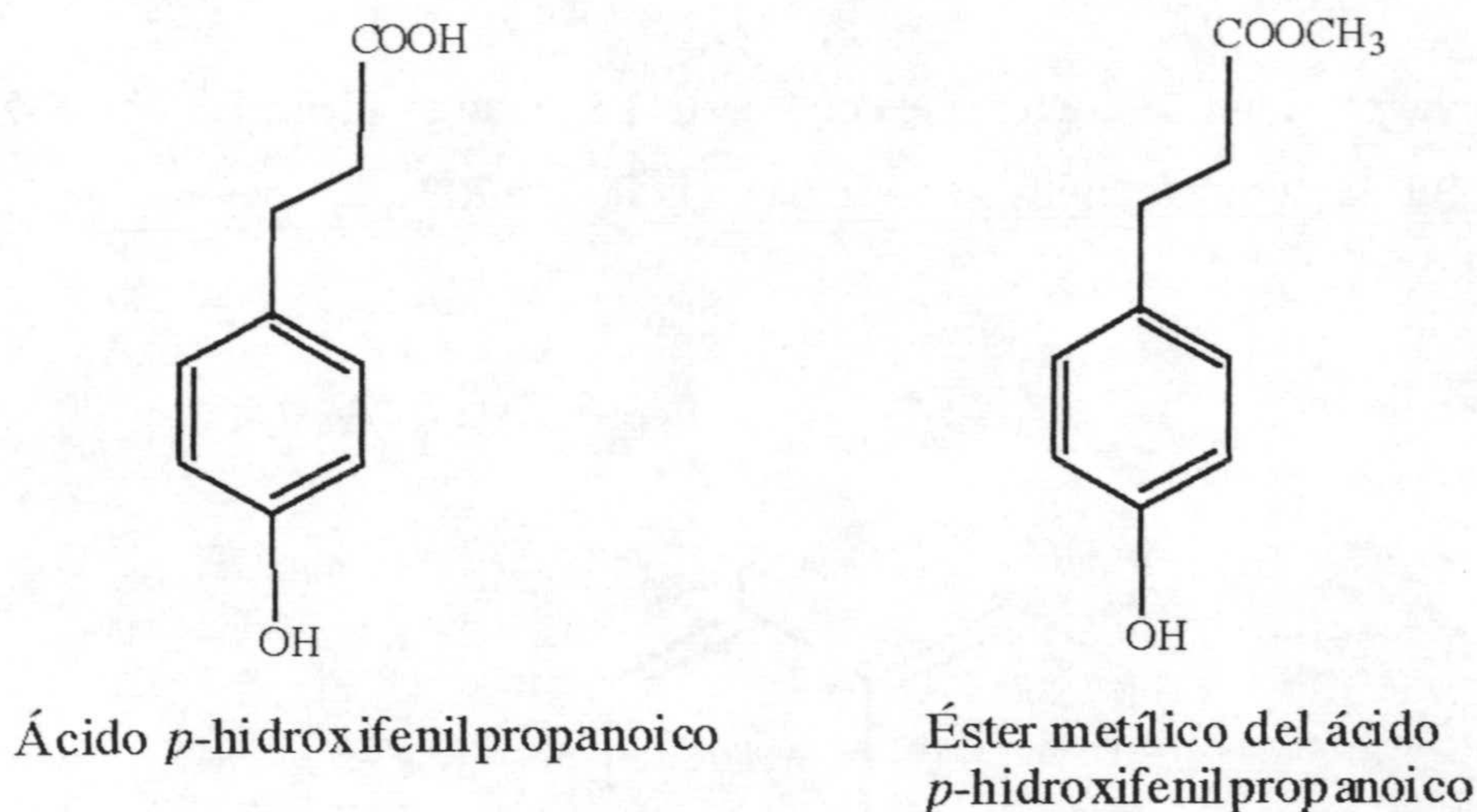


Figura R.3.8. Estructura química de los compuestos **13** (Ácido *p*-hidroxifenilpropanoico) y **14** (Éster metílico del ácido *p*-hidroxifenilpropanoico)

Resultados

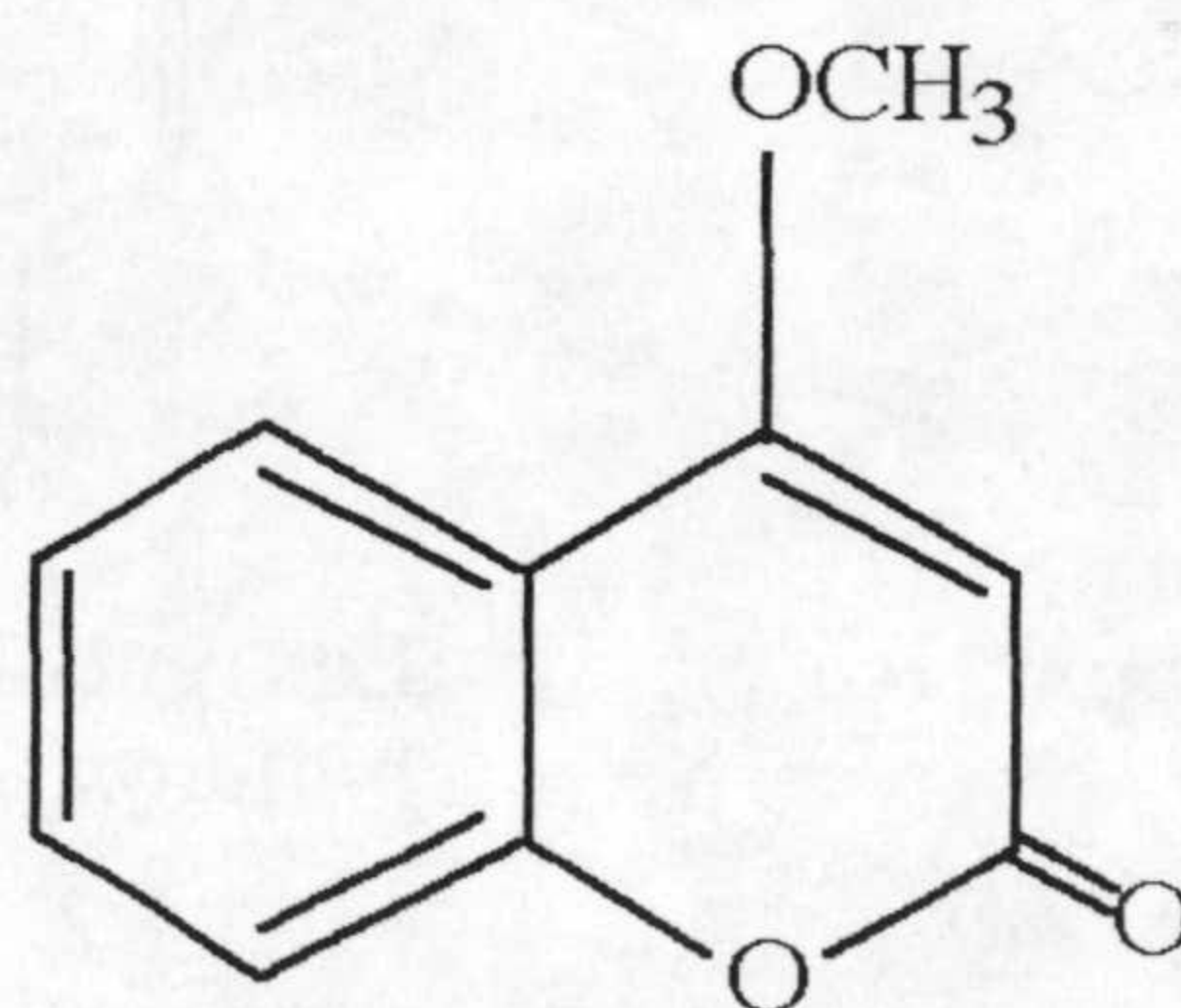
Tabla R.3.18. Datos de ^1H y ^{13}C del ácido *p*-hidroxifenilpropanoico (compuesto **13**) y su éster metílico (compuesto **14**)

	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilpropanoico		Éster del ácido <i>p</i> -hidroxifenilpropanoico	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	-	174,05	-	175,36
2*	2,50 t (7,7)	36,66	2,45 t (7,69)	36,35
3*	2,74 t (7,7)	30,42	2,73 t (7,6)	30,55
1'	-	131,85	-	132,25
2', 6'	6,97 d (8,4)	129,79	6,99 d (8,4)	129,80
3', 5'	6,69 d (8,4)	115,79	6,69 d (8,49)	115,76
4'	-	156,31	-	156,20
5', 3'	6,69 d (8,4)	115,79	6,69 d (8,4)	115,76
6', 2'	6,97 d (8,4)	129,79	6,99 d (8,4)	129,80
COOCH ₃	-	-	-	51,64

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

*: datos intercambiables

En la fracción L11 contenía el compuesto **15**. Éste se identificó como 4-metil éter cumarina. Su estructura química se presenta en la Figura R.3.9.



4-metil éter cumarina

Figura R.3.9. Estructura química del compuesto **15** (4-metil éter cumarina)

En base a su espectro de masas (espectro E-L11-a) (Tabla R.3.19) y de RMN- ^{13}C (espectro E-L11-d) (Tabla R.3.20) se le asignó la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_9$ ($P_m = 176$). En su espectro de IR (espectro E-L11-b) (Tabla R.3.19) aparecen señales de anillo aromático ($3080, 1607$ y 1566 cm^{-1}), de doble enlace a 1624 cm^{-1} y lactona a 1724 cm^{-1} . Las fragmentaciones en su espectro de masas (espectro E-L11-b) (Tabla R.3.19) corroboran dicha estructura.

La asignación del espectro de RMN- ^1H (espectro E-L11-c) se recoge en la tabla R.3.20. Del patrón de acoplamiento y el número de los protones aromáticos se excluye la disposición del éter metílico sobre este anillo. La irradiación selectiva de los protones H-5 y H-7 ha permitido la disposición relativa de los protones aromáticos. La correlación bidimensional HMQC nos permitió asignar sus carbonos correspondientes (Tabla R.3.20). Teniendo en cuenta que en la experiencia de RMN bidimensional HMBC (Tabla R.3.20), en sistemas planos como los anillos aromáticos se observan las correlaciones a $^3J_{\text{CH}}$ (7-10 Hz) en vez de $^2J_{\text{CH}}$ (1-4 Hz) se asignan los carbonos cuaternarios; así mismo la disposición del éter metílico en la posición 4 en vez de 3, por la correlación del carbono cuaternario C-4 con el H-5.

Tabla R.3.19. Datos de EIMS e IR del compuesto **15**, 4-metil éter cumarina

COMPUESTO 15 , 4-metil éter cumarina	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	176 [$\text{M}-\text{HCOOCH}_3$] $^+$ ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$)-($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) (100), 161 (4,54), 148 (8,89), 146 (17,04), 133 (48,86), 120 (21,59), 105 (35,23), 92 (43,18), 89 (11,36), 83 (5,68), 77 (22,73), 69 (19,32), 63 (18,18), 50(12,5)
ESPECTRO DE IR $\nu_{\text{max}}\text{ cm}^{-1}$	3080, 1607, 1566 (aromáticos), 1624 (doble enlace), 1724 (lactona)

Tabla R.3.20. Datos de ^1H y ^{13}C del compuesto **15** (4-metil éter cumarina)

	^1H	^{13}C	HMBC
1	-	-	
2	-	166,64	
3	5,68 s	90,11	C-2; C-4
4	-	115,67	
5	7,3 dd (1,6; 7,94)	116,84	C-4

Cont.

Resultados

Continuación Tabla R.3.20.

5a	-	153,30	
6	7,53ddd (1,6; 7,2; 8,4)	132,53	C-8
7	7,26ddd (1,1; 7,94; 7,2)	124,03	
8	7,8dd (1,6; 7,94)	123,07	C-2; C-5a; C-6
8a	-	163,22	

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

*: Datos intercambiables

En otras fracciones se detectaron aromáticos con sustituciones en *para*, grupos aldehído bien unidos a anillo aromático o a cadena alquílica, grupos acetato y cadenas alquílicas (-CH₂-CH₂-) unidos a anillo aromático o bien a un oxígeno constituyendo un grupo éter o un alcohol e incluso grupos aldehído de diferente naturaleza.

R.4. AISLAMIENTO DE PRODUCTOS LINEALES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE “ALPEORUJO”

El extracto de acetato de etilo de los residuos sólidos resultantes del proceso de extracción del aceite de oliva se considera la fracción más interesante para la identificación de compuestos químicos presentes en el fruto de la aceituna (Capasso y col., 1992; Fleming y col., 1969; Maestro Durán y col., 1991). En este capítulo se muestra el análisis de la identificación de nuevos productos que se aislaron en el residuo que se obtiene cuando se utiliza el sistema continuo de dos fases, denominado “alpeorujo”.

En este extracto han sido identificados compuestos aromáticos sustituidos con grupos hidroxilo y metoxilo y cadenas alquílicas (Balice y col., 1984; Vázquez Roncero y col., 1974). El objeto de estudiar este extracto es identificar compuestos aromáticos y/o no aromáticos no identificados anteriormente, mediante ensayos espectroscópicos.

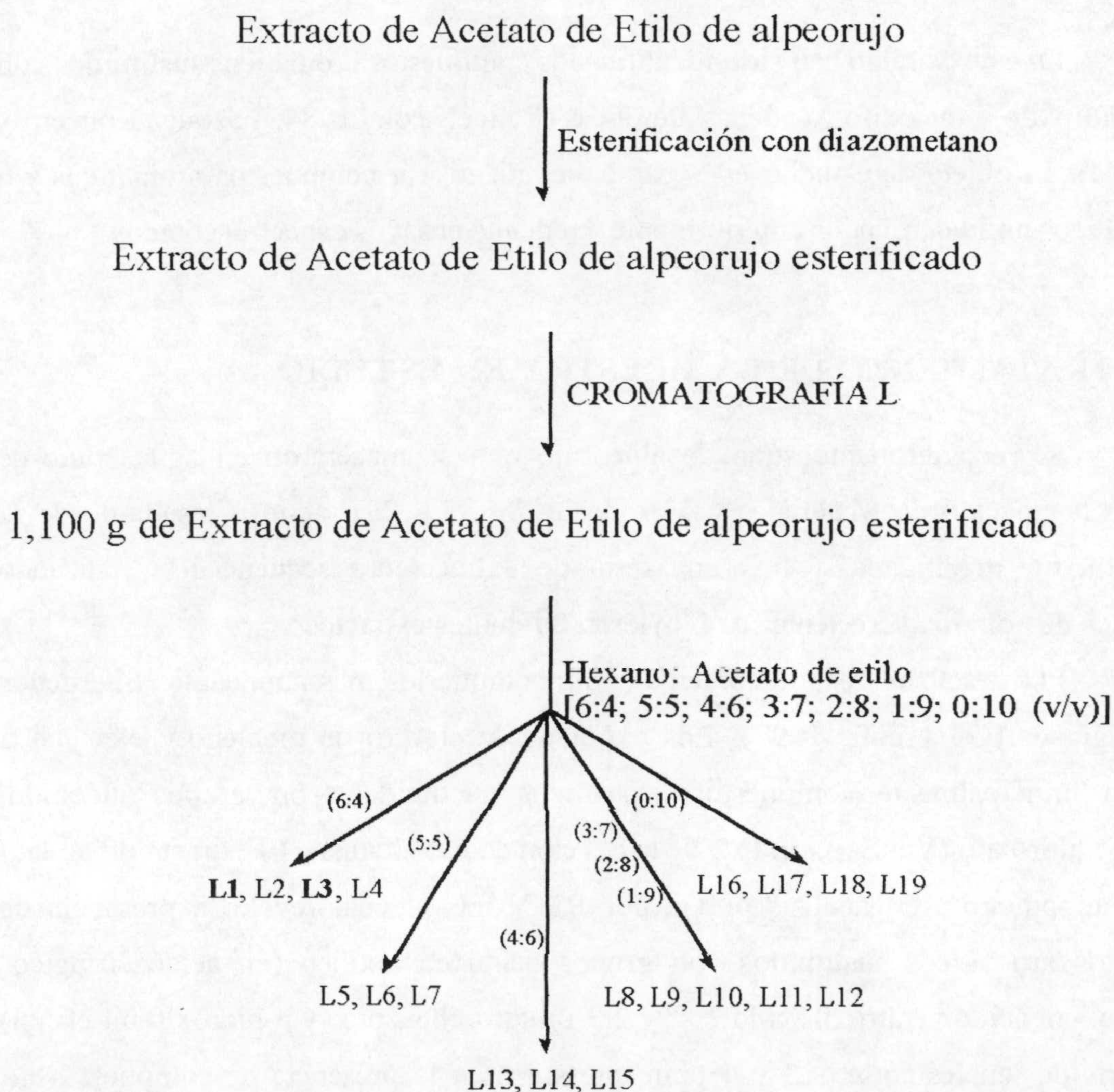
R.4.1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN ESTUDIO

Se recogieron muestras de alpeorujo que se maceraron en agua como se indicó en la Sección de Materiales y Métodos A.3.3. La fase acuosa resultante de la maceración fue acidificada, y tras una serie de extracciones secuenciales, utilizando disolventes de polaridad creciente se obtuvieron diferentes extractos.

El extracto de hexano contenía como compuestos más abundantes triterpenos y ácidos grasos (Gil y col., 1997). Los extractos de cloruro de metileno y éter etílico contenían principalmente compuestos aromáticos sustituidos con grupos aldehído, metoxilo e hidroxilo (Ver Sección R.2 de la Sección de Resultados). El extracto de acetato de etilo se sometió a un análisis previo por RMN-¹H, el cual reveló la presencia de compuestos aromáticos sustituidos con grupos ácido carboxílico (ej, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido verátrico, ácido 2,4- y 2,3-dihidroxibenzoico y *p*-hidroxifenil etanol) y una serie de señales entre δ : 2 y 4 ppm que sugerían la presencia de compuestos no aromáticos, los cuales no han sido descritos previamente en este extracto y fueron objeto de posterior estudio, tal y como se describe a continuación.

R.4.2. ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE “ALPEORUJO”

Con objeto de analizar los compuestos presentes en este extracto, en concreto los de naturaleza no aromática, dicho extracto fue esterificado como se indicó en la Sección de Materiales y Métodos A.3.8.1. La muestra esterificada se cromatografió sobre sílica gel en columna a presión (Cromatografía L) como se describió en la Sección A.3.8.15. de Materiales y Métodos. Se recogieron varias fracciones (esquema R.4.1.) y se analizaron por RMN-¹H, cromatografía en capa fina y cromatografía de gases.



Esquema R.4.1. Esquema de separación de las fracciones L1 y L3.

R.4.3. ESTUDIO DE ALGUNAS DE LAS FRACCIONES RECOGIDAS EN LA CROMATOGRAFÍA L

Tres fracciones que se eluyeron con una mezcla de hexano:acetato de etilo (6:4) (v/v) contenían productos cuyas señales por RMN-¹H revelaban que no eran compuestos aromáticos. La cromatografía en capa fina y análisis por cromatografía de gases han puesto de manifiesto dos compuestos puros en dos fracciones diferentes, en la fracción L1 el compuesto **11** que fue identificado como ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico y en la fracción L3 el compuesto **12** que fue identificado como ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E) 1-propenil] glutárico y una mezcla de los dos en la fracción L2. La estructura de ambos compuestos se presenta en la figura R.4.1.

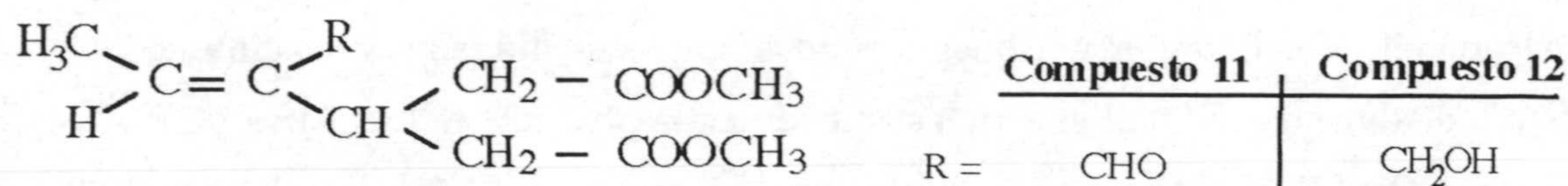


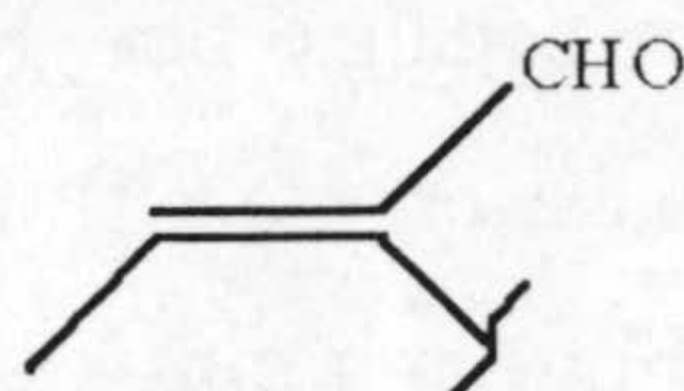
Figura R.4.1. Estructura química de los compuestos **11** (ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico) y **12** (ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E) 1-propenil] glutárico).

R.4.3.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS **11** Y **12**

Para determinar la estructura de estos compuestos llevamos a cabo análisis de RMN-¹H, RMN-¹³C, HETCOR, COSY 90°, NOE dif, IR y EIMS de cada una de las fracciones que contenían un compuesto puro.

La fórmula molecular C₁₁H₁₆O₅ para el compuesto **11** fue asignada basada sobre el EIMS (Tabla R.4.1.) (espectro E-11a) y los datos de RMN-¹³C (Tabla R.4.2.) (espectro E-11d). El espectro de IR (espectro E-11b) (Tabla R.4.1.) muestra picos de absorción a 1734 cm⁻¹ y 1215 cm⁻¹, los cuales fueron atribuidos a la presencia de un grupo metoxicarbonilo, otra banda de absorción a 1683 cm⁻¹ junto con otra a 2850 cm⁻¹ pequeña, sugirió la presencia de un aldehído conjugado. El espectro de RMN-¹H (espectro E-11c) (Tabla R.4.2.) mostró un doblete a 9,26 ppm (J=2,0 Hz), típico de un grupo aldehído acoplado con un protón olefínico en posición alílica, que aparece como un cuadruplete ancho a δ: 6,66 ppm (J=7,08 Hz) debido al metilo doblete a 2,06 ppm

($J=7,08$ Hz). Estos datos junto con los resultados de RMN- ^{13}C , establecen una estructura de vinil aldehído en el compuesto **11** (esquema R.4.2.).



Esquema R.4.2. Estructura de vinil aldehído presente en el compuesto **11** (ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico)

Otras señales del espectro de RMN- ^1H , dos dobles dobletes a δ : 2,62 ppm (2H, dd, $J_1=5,83$ Hz, $J_2=16,08$ Hz) y δ : 2,76 ppm (2H, dd, $J_1=8,9$ Hz, $J_2=16,08$ Hz) y un multiplete a δ : 3,50-3,69 ppm (Tabla R.4.1.) junto con la señal del grupo metoxicarbonilo a δ : 3,58 ppm que integra por dos grupos metilo, son compatibles con la estructura de dimetoxicarbonil glutárico sustituido en la posición 3. Los datos de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y EIMS determinaron la estructura del compuesto **11** como el ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico.

Tabla R.4.1. Datos de EIMS e IR del compuesto **11**, ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico

COMPUESTO 11 , ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	228 [M] ⁺ (C ₁₁ H ₁₆ O ₅), 227 [M-1] ⁺ (8,09), 213 [M ⁺ - CH ₃] (27,26), 200 [M ⁺ - CO] (20,85), 198 [M ⁺ - 2CH ₃] (11,57), 197 [M ⁺ - OCH ₃] (19,09), 182 [M ⁺ - CH ₃ - OCH ₃] (6,44), 181 [(M-1) ⁺ - CH ₃ - OCH ₃] (12,77), 169 [M ⁺ - COOCH ₃] (13,79), 166 [M ⁺ - 2OCH ₃] (37,79), 154 [M ⁺ - COOCH ₃ - CH ₃] (12,91), 153 [M ⁺ - CH ₃ - OCH ₃ - CHO] (79,21), 141 [M ⁺ - COOCH ₃ - CO] (12,45), 138 [M ⁺ - 2OCH ₃ - CO] (46,04), 125 [M ⁺ - COOCH ₃ - CH ₃ - CHO] (51,18), 123 [M ⁺ - COOCH ₃ - OCH ₃ - CH ₃] (67,15), 110 [M ⁺ - 2COOCH ₃] (24,03), 109 [M ⁺ - COOCH ₃ - OCH ₃ - CHO] (46,58), 108 [M ⁺ - COOCH ₃ - HOCH ₃ - CHO] (45,19), 95 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CH ₃] (62,84), 81 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CHO] (56,79), 79 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH] (80,40), 67 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CHO - CH ₂] (89,05), 66 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CHO - CH ₃] (31,32), 59 [COOCH ₃] ⁺ (100), 53 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CHO - CH ₂ - CH ₂] (44,82), 51 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CHO - 2CH ₃] (46,92), 43 [COCH ₃] ⁺ (98,55)
ESPECTRO DE IR ν_{max} cm ⁻¹	3020 (CH); 1734 (C=O); 1683 (CHO); 1438 (CH ₃); 1215 (C-O); 757.

Tabla R.4.2. Datos de ^1H y ^{13}C del ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico, compuesto 11

	^1H	^{13}C
1	-	172,47
2a*, 2b*	2,62 dd (5,83; 16,08)	36,65
4a*, 4b*	2,76 dd (8,9; 16,08)	36,45
3	3,50-3,69 m	29,98
5	-	172,47
1'	-	143,40
2'	6,66 bq (7,08)	154,17
3'	2,06 d (7,08)	15,12
HCO	9,26 d (2,0)	194,95
OCH_3	3,58 s	51,35
OCH_3	3,58 s	51,35

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

* Datos intercambiables.

Para el compuesto 12 el EIMS identificó un ión a m/z 230 [M^+] (5,16) (Tabla R.4.3.) (espectro E-12a). Los datos espectrocópicos del compuesto 12 fueron similares pero no idénticos a los del compuesto 11. El espectro de IR (espectro E-12b) (Tabla R.4.3.) reveló la presencia de un grupo hidroxilo ($3685, 3615 \text{ cm}^{-1}$), mientras que el RMN- ^1H reveló un sistema AB a δ : 4,66 ppm ($J=12,8 \text{ Hz}$, $\Delta\nu/J=5,3 \text{ Hz}$) (espectro E-12c) (Tabla R.4.4.) y el correspondiente espectro de carbono apareció con un desplazamiento químico a δ : 72,08 ppm (Tabla R.4.4.) (espectro E-12d) de acuerdo con el grupo hidroximetileno alílico. Esto establece que en el compuesto 12 C-1' sostiene un sustituyente hidroximetilo en lugar de un grupo aldehído.

También se observaron otras diferencias con respecto a los desplazamientos químicos en los análisis de RMN- ^1H entre el compuesto 11 y el compuesto 12 (Tablas R4.2. y R4.4.).

La configuración *trans* del doble enlace trisustituido fue asignado en base a datos obtenidos en ensayos NOE diferencia (espectro e-11f), donde la irradiación de la frecuencia del grupo metilo resultó en el efecto NOE sobre el grupo aldehído en el compuesto 11.

Las estructuras de los compuestos 11 y 12 se confirmaron después, tras sus modificaciones químicas, como se describe a continuación.

Tabla R.4.3. Datos de EIMS e IR del compuesto **12**, ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E) 1-propenil] glutárico

COMPUESTO 12 , ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E) 1-propenil] glutárico	
ESPECTRO DE MASAS m/z (rel. int.)	230 [M] ⁺ (C ₁₁ H ₁₈ O ₅) (5.16), 229 [M - 1] ⁺ (29.21), 215 [M ⁺ - CH ₃] (3.43), 213 [M ⁺ - OH] (13.99), 199 [M ⁺ - OCH ₃] (20.78), 198 [M ⁺ - CH ₃ OH] (16.46), 197 [(M - 1) ⁺ - CH ₃ OH ₂] (68.10), 183 [M ⁺ - CH ₃ - OCH ₃] (19.49), 182 [M ⁺ - CH ₃ OH ₂ - CH ₃] (11.55), 181 [M ⁺ - OCH ₃ - H ₂ O] (31.74), 179 [(M - 1) ⁺ - HOCH ₃ - H ₂ O] (63.19), 168 [M ⁺ - 2OCH ₃] (17.38), 167 [M ⁺ - CH ₃ OH ₂ - 2CH ₃] (60.75), 165 [M ⁺ - CH ₃ - CH ₃ OH - H ₂ O] (38.61), 155 [M ⁺ - CH ₃ - CH ₃ OH - CO] (18.82), 153 [M ⁺ - COOCH ₃ - H ₂ O] (24.66), 150 [M ⁺ - 2OCH ₃ - H ₂ O] (81.96), 139 [M ⁺ - COOCH ₃ - CH ₃ OH] (29.11), 138 [M ⁺ - COOCH ₃ - H ₂ O - CH ₃] (21.83), 137 [M ⁺ - CH ₃ - CH ₃ OH - H ₂ O - CO] (61.84), 125 [M ⁺ - COOCH ₃ - H ₂ O - CH ₃ - CH] (51.68), 123 [M ⁺ - CH ₃ OH ₂ - COOCH ₃ - CH ₃] (59.66), 122 [M ⁺ - COOCH ₃ - OCH ₃ - H ₂ O] (21.54), 121 [M ⁺ - COOCH ₃ - CH ₃ OH - H ₂ O] (73.78), 111 [(M ⁺ - 2COOCH ₃)] (27.00), 109 [M ⁺ - COOCH ₃ - OCH ₃ - CH ₂ OH] (51.42), 107 [M ⁺ - COOCH ₃ - OCH ₃ - CH ₃ - H ₂ O] (72.71), 94 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O] (27.75), 93 [M ⁺ - CH ₃ - CH ₃ OH - H ₂ O - CO - CO ₂] (48.67), 81 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH] (76.83), 80 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH ₂] (17.91), 79 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH ₃] (85.67), 78 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CH ₃ OH ₂] (17.35), 67 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH - CH ₂] (66.38), 66 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH ₃ - CH] (19.80), 65 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CH ₃ OH ₂ - CH] (34.17), 59 [COOCH ₃] ⁺ (87.59), 55 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH - CH ₂ - C] (72.94), 53 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - H ₂ O - CH - 2CH ₂] (39.32), 51 [M ⁺ - 2COOCH ₃ - CH ₃ OH ₂ - CH - CH ₂] (15.26), 43 [COCH ₃] ⁺ (100)
ESPECTRO DE IR ν _{max} cm ⁻¹	3685, 3615, 1377 (OH); 3019 (CH); 2976, 2927 (CH ₃ , CH ₂); 1736 (C=O); 1437 (CH ₃); 1215 (C-O); 1080, 1047, 1022, 929 (CH ₂ OH); 756 (CH=C); 668 (C=C)

Tabla R.4.4. Datos de ¹H y ¹³C del ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E) 1-propenil] glutárico, compuesto **12**

	¹ H	¹³ C
1 [#]	-	171,88
2a* ^c	2,43 dd (9,26; 16,12)	38,35
2b*	2,55 dd (4,54; 16,12)	38,35
3	3,32 quintuplete (6,7)	29,57
4a	2,63 dd (6,68; 15,8)	35,18

Cont.

Continuación de Tabla R.4.4.

4b	2,74 dd (6,47; 15,8)	35,18
5#	-	171,54
1'	-	132,33
2'	5,64 q (6,83)	125,05
3'	1,68 d (6,98)	15,53
CH ₂ OH	4,66 d, sistema AB (12,8; 5,3)	72,08
OCH ₃	3,67 s	51,90
OCH ₃	3,67 s	51,90

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

* y # datos intercambiables.

R.4.3.1.1. Reducción del compuesto 11

Para corroborar la estructura del compuesto 12 y que, efectivamente, el carbono C-1' soportaba un grupo hidroximetileno en lugar de un grupo aldehído, el compuesto 11 fue reducido con NaBH₄ como se describe en la Sección A.3.8.15.3. de Materiales y Métodos. Tal y como se esperaba se obtuvo el compuesto 12.

R.4.3.1.2. Saponificación del compuesto 12

El compuesto 12 fue saponificado como se indicó en la Sección de Materiales y Métodos A.3.8.15.1. y tras acidificación con HCl 2N se obtuvo el compuesto 16. Los datos espectroscópicos del compuesto 16 (Tabla R.4.5.) (espectros e-16c y E-16d) revelaron que este compuesto correspondía a una lactona, cuya estructura se presenta en la figura R.4.2.

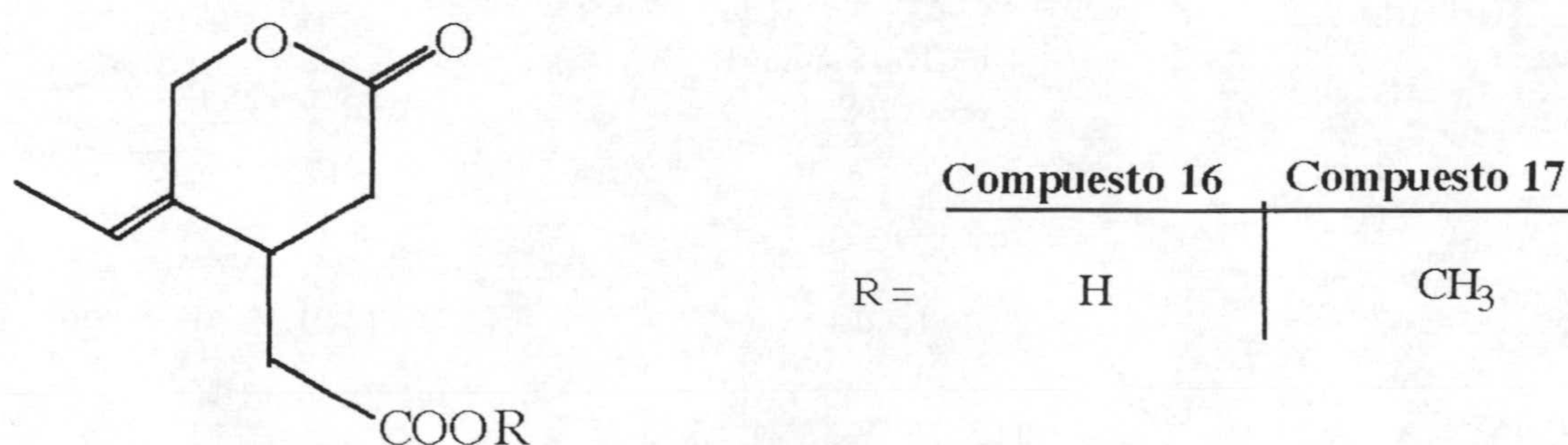


Figura R.4.2. Estructura química de los compuestos 16 y 17

Tabla R.4.5. Datos de ^1H y ^{13}C del compuesto 16

	^1H	^{13}C
1'a*	2,51 dd (9,5; 16,48)	171,88
1'b*	2,64 dd (4,15; 16,48)	38,35
1''	5,64 q (6,5)	38,35
2	-	29,57
2'	-	35,18
2''	1,74 d (7,0)	35,18
3a*	2,71 dd (6,7; 15,8)	171,54
3b*	2,82 dd (6,4; 15,8)	132,33
4	3,6 m	125,05
5	-	15,53
6	4,71 d, sistema AB (12,9; 5,02)	72,08

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

* datos intercambiables.

R.4.3.1.3. Esterificación del compuesto 16

Tras metilación de la lactona con CH_2N_2 (ver Sección de Materiales y Métodos A.3.8.15.2.) se obtuvo el compuesto 17, el cual contenía, como era de esperar, un grupo metoxicarbonilo (ver datos espectroscópicos en Tabla R.4.6.) (espectros E-17c y e-17d).

Tabla R.4.6. Datos de ^1H y ^{13}C del compuesto 17

	^1H	^{13}C
1'a*	2,45 dd/2,5 dd (9,40; 16,18)/(5,54; 16,08)	35,13/35,04
1'b*	2,56 dd/2,61 dd (4,43; 16,18)/(4,5; 16,08)	35,13/35,04
1''	5,65 q (6,5)	125,22/125,13
2	-	175,32
2'	-	172,14/171,61
2''	1,7 d/1,69 d (6,50)/(6,19)	14,21/13,60
3a*	2,65 dd/2,77 dd (6,62; 15,58)/(8,94; 15,35)	38,32/38,04

Cont.

Continuación de Tabla R.4.6.

3b*	2,79 dd/2,79 dd (6,44; 15,58)/(6,44; 15,35)	38,32/38,04
4	3,32 m/3,65 m	30,37/29,30
5	-	132,19/132,02
6	4,67 d, sist. AB/4,68 d, sist. AB (12,84; 7,02)/(12,79; 6,87)	72,14
7	3,69 s	51,99

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

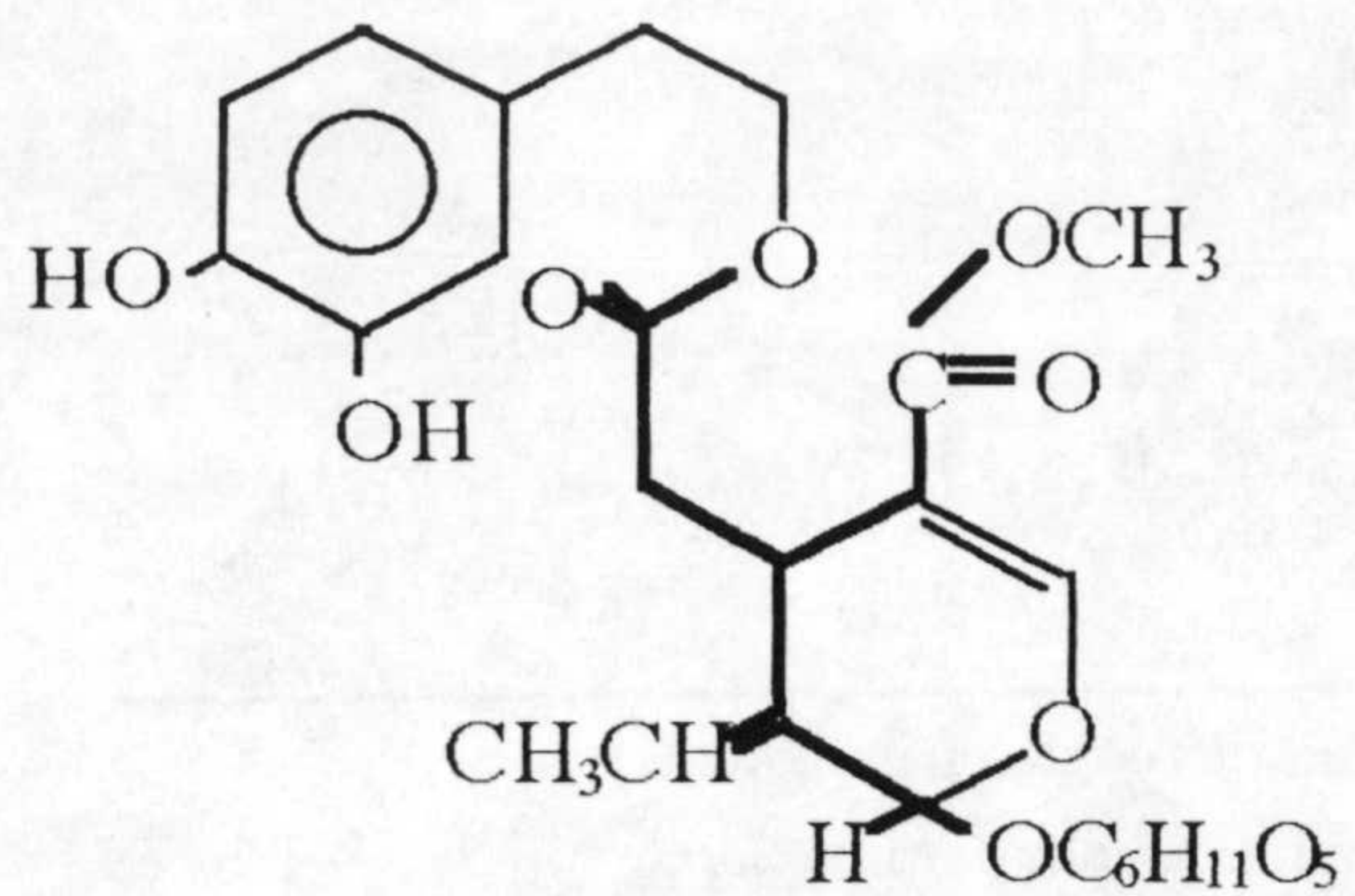
Desplazamientos químicos de los dos productos isómeros están separados por una barra.

* datos intercambiables.

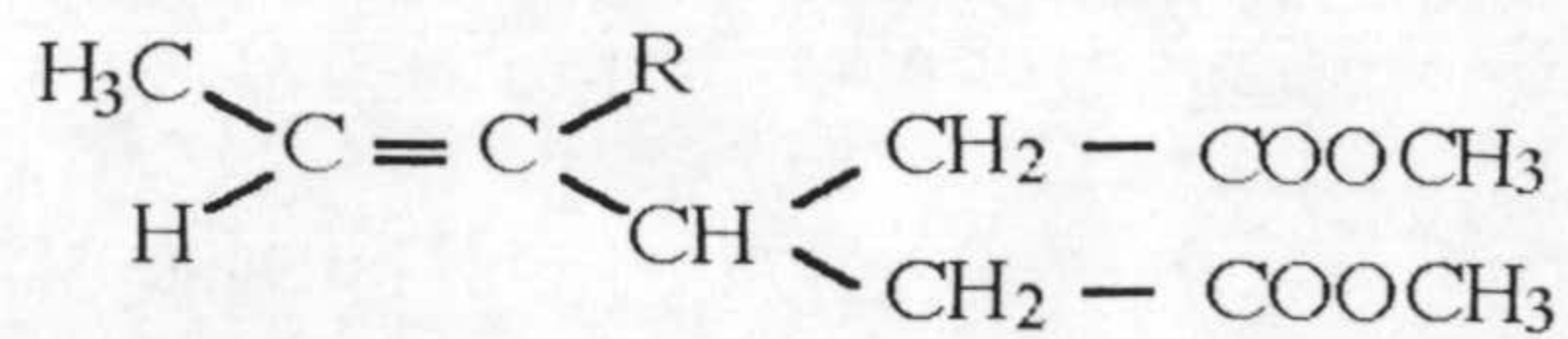
R.4.3.2. CONCLUSIONES DE LOS ANÁLISIS PREVIOS

Los productos resultantes de la modificación química de los compuestos 11 y 12 confirmaron que las estructuras de los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo del residuo semisólido ("alpeorujo") fueron el ácido 3-[1-(formil)-(E) 1-propenil] glutárico (Compuesto 11) y el ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E) 1-propenil] glutárico (Compuesto 12).

Los compuestos 11 y 12 pueden ser derivados de la oleuropeina, una molécula más compleja (figura R.4.3.) la cual confiere el amargor a las aceitunas (Brenes Balbuena y col., 1992; Gariboldi y col., 1986; Tsukamoto y col., 1985). Generalmente, el amargor es eliminado antes del consumo humano por tratamiento del fruto con hidróxido sódico (2 % p/v). La hidrólisis alcalina de la oleuropeina produce diferentes productos (figura R.4.4.), los cuales son el aglicón de la oleuropeina, β -3,4-dihidroxifenil etanol, glucosa y ácido elenólico (Amiot y col., 1989; Brenes Balbuena y col., 1992; Gariboldi y col., 1986; Tsukamoto y col., 1985). El aglicón de la oleuropeina también produce bastantes productos de transformación por apertura del anillo no aromático del ácido elenólico. Estos son derivados del dialdehído, denominados como compuesto A y los diastereoisómeros B y C en la figura R.4.4. (Amiot y col., 1989; Gariboldi y col., 1986; Limiroli y col., 1995; Tsukamoto y col., 1985). Hasta este estudio no se habían descrito productos lineales del tipo de los descritos en este capítulo como productos resultantes de la hidrólisis de la oleuropeina.



OLEUROPEINA



Compuesto 11 Compuesto 12

R = CHO CH₂OH

Figura R.4.3. Estructura química de la oleuropeina y de los compuestos **11** y **12**. La estructura química de los compuestos lineales está dibujada con línea más oscura dentro de la estructura de la oleuropeina.

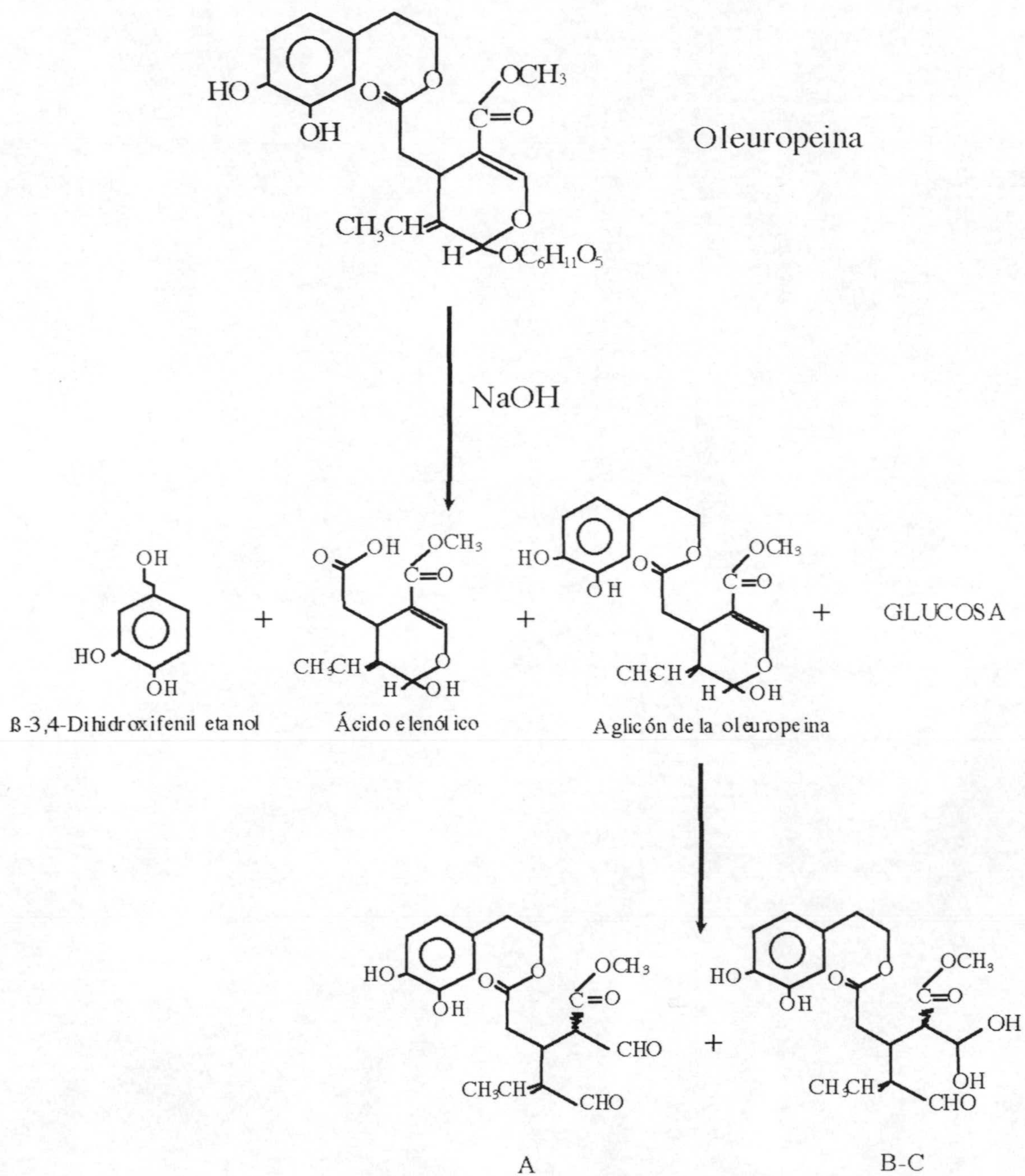
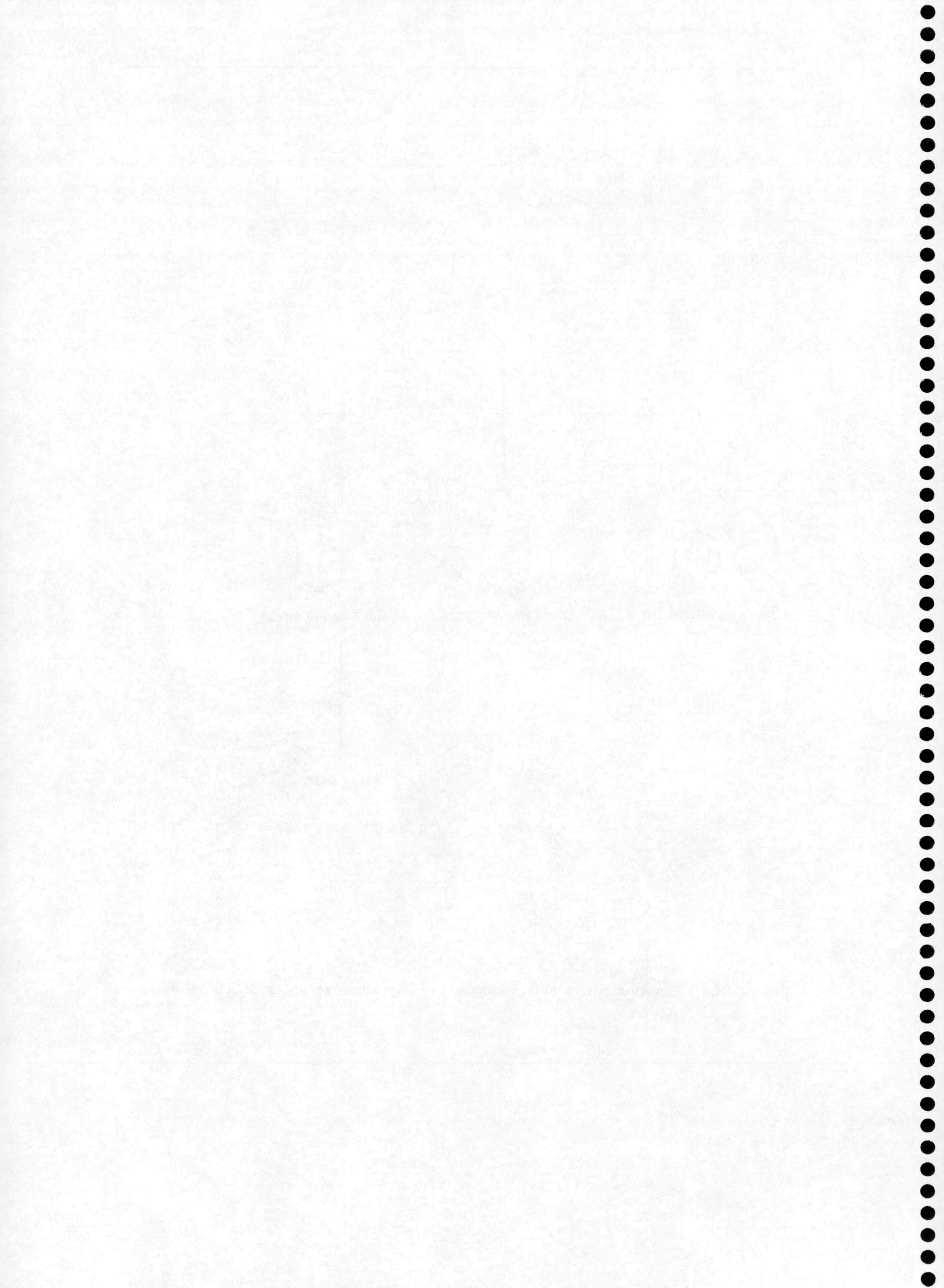


Figura R.4.4. Estructura química de la oleuropeina y de los productos resultantes de su hidrólisis alcalina.



R.5. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CAPACES DE UTILIZAR DIFERENTES COMPUESTOS PRESENTES EN EL ALPECHÍN COMO FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA

En el abordaje de problemas de contaminación por compuestos orgánicos mediante procesos biológicos es necesario, en primer lugar, buscar y aislar microorganismos que sean capaces de utilizar dichos contaminantes como fuente de carbono y energía. En el caso concreto en el que el contaminante a tratar es alpechín se realizaron una serie de enriquecimientos microbianos, en los que se utilizaron como fuente de carbono diferentes compuestos químicos que habían sido identificados en el alpechín (ver Sección B.4. de Materiales y Métodos). Como fuente de los microorganismos se partió de diferentes suelos y sustratos que habían estado en contacto o no con alpechín. Simultáneamente a este proceso de enriquecimiento, y debido a la gran cantidad de compuestos químicos presentes en el alpechín, se realizaron una serie de ensayos químicos (extracciones, cromatografías, reacciones...) encaminados al aislamiento e identificación de compuestos que estuvieran presentes en el mismo y utilizarlos como fuente de carbono y energía.

Las fuentes de microorganismos utilizadas fueron: alpechín seco, tierra de jardín de la E.E.Z., aguas de la depuradora de Granada, y aguas residuales de una industria de producción de amoníaco en la provincia de Huelva.

Los compuestos químicos presentes en el alpechín que se utilizaron como fuente de carbono se muestran en la figura R.5.1.

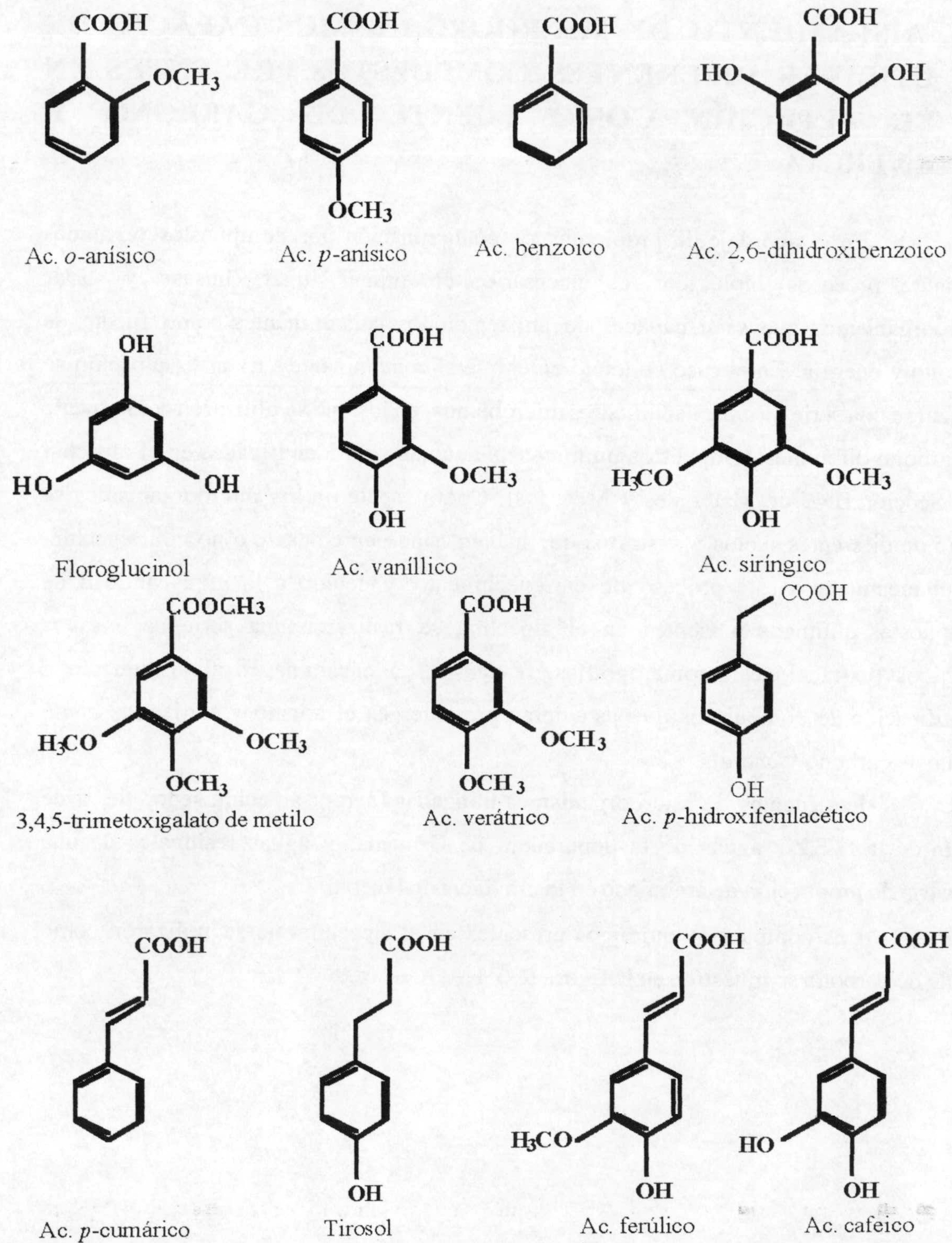


Figura R.5.1. Estructuras de los compuestos químicos presentes en el alpechín que se utilizaron en la serie de enriquecimientos bacterianos.

En la tabla R.5.1 se muestra el número de bacterias aisladas con cada una de las fuentes de carbono utilizadas y entre paréntesis la fuente de la que proceden.

Tabla R.5.1. Resultados de los enriquecimientos llevados a cabo en diferentes fuentes de carbono con compuestos presentes en el alpechín.

Fuente de Carbono	Número de bacterias aisladas y origen de la muestra
Ac. <i>o</i> -anísico	4 [4 (j)]
Ac. <i>p</i> -anísico	40 [9 (j), 15 (h), 16 (a.d.)]
Ac. benzoico	12 [1 (a), 10 (h), 1 (a.d.)]
Ac. cafeico	6 [5 (j), 1 (a)]
Ac. <i>p</i> -hidroxifenilacético	60 [16 (j), 9 (a), 16 (h), 19 (a.d.)]
Ac. 2,6-dihidroxibenzoico	8 [8(j)]
Ac. ferúlico	13 [10(j), 1 (a), 2 (h)]
Floroglucinol	23 [23 (j)]
Ac. siríngico	25 [15 (j), 8 (h), 2 (a.d.)]
Ac. vanílico	125 [87 (j), 9 (a), 29 (h)]
Ac. verátrico	79 [64 (j), 4 (a), 11 (h)]
Tirosol	53 [53 (j)]
3,4,5-trimetoxigalato de metilo	8 [8 (j)]
Ac. <i>p</i> -cumárico	0

(j): tierra de jardín de la E.E.Z.. (a): alpechín seco. (h): aguas residuales de una industria de amoniaco de Huelva. (a.d.): aguas de la depuradora de Granada.

En total se obtuvieron 456 cepas que fueron capaces de utilizar como fuente de carbono algunos de los compuestos presentes en alpechín. De entre esta amplia gama centramos nuestros esfuerzos iniciales en estudiar aquellas que eran capaces de utilizar compuestos químicos tipo presentes en este contaminante, como los derivados del ácido benzoico con grupos metoxilo (ácido *o*-anísico o 2-metoxibenzoico) y compuestos con un anillo aromático sustituido con una cadena lineal con grupo ácido y un grupo hidroxilo en otra posición (ácido *p*-hidroxifenilacético).

Las bacterias aisladas capaces de crecer en ácido *o*-anísico y en ácido *p*-hidroxifenilacético se clasificaron taxonómicamente mediante una serie de test que incluyeron tinción de Gram, análisis de fosfolípidos de membrana y test bioquímicos. La adscripción se llevó a nivel de género y/o especie, y las bacterias clasificadas se recogen en la Tabla B.1.1. en la Sección de Materiales y Métodos B.1. Los géneros y especies identificados fueron *Arthrobacter oxydans*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter* sp., *Bacillus circulans*, *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia* sp., *Escherichia coli*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Klebsiella oxytoca*, *Nocardia asteroides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Sphingomonas paucimobilis*. Todas las cepas se conservaron a -70°C en glicerol para su posterior estudio (ver Secciones R.5.1., R.7 y R.7.4.2).

Del enriquecimiento en ácido *o*-anísico se obtuvieron 4 cepas. La identificación bacteriológica se llevó a cabo como se describió en la Sección B.5. Las colonias de las cepas DAO1, DAO2 y DAO3 presentaron en placa de medio mínimo y medio rico LB el mismo aspecto morfológico, colonias blancas y pequeñas. En contraste, las colonias correspondientes a la cepa bacteriana denominada DAO4, aunque aparecían todas con el mismo aspecto morfológico en placa de medio mínimo, en placa de medio rico LB se distinguieron dos tipos de colonias morfológicamente diferentes, una era blanca y pequeña y otra de mayor tamaño y color amarillo. Ambos tipos de colonias se purificaron y se procedió a su identificación microbiana. Los resultados de la identificación bacteriana fueron que las cepas cuya morfología era blanca y pequeña eran Gram-positivas, mientras que las de mayor tamaño y amarilla eran Gram-negativas. El test de API no permitió identificar inequívocamente estas bacterias y todas se sometieron a análisis de fosfolípidos de membrana; el resultado de éste análisis fue que DAO1, DAO2, DAO3 y DAO4 (blanca-pequeña) pertenecían al género *Arthrobacter* y probablemente a la especie *oxydans*, mientras que la cepa correspondiente a DAO4 (amarilla-grande) pertenecía al género *Pantoea* y probablemente a la especie *agglomerans*.

R.5.1. CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS A EXPENSAS DE ÁCIDO *o*-ANÍSICO COMO FUENTE DE CARBONO

El crecimiento en medio mínimo de las 4 cepas bacterianas (DAO1 a DAO4) que utilizaron ácido *o*-anísico como fuente de carbono se presenta en la Figura R.5.2 y se puede observar que los cuatro cultivos crecieron hasta alcanzar los cultivos una turbidez superior a 0,5 a 660 nm.

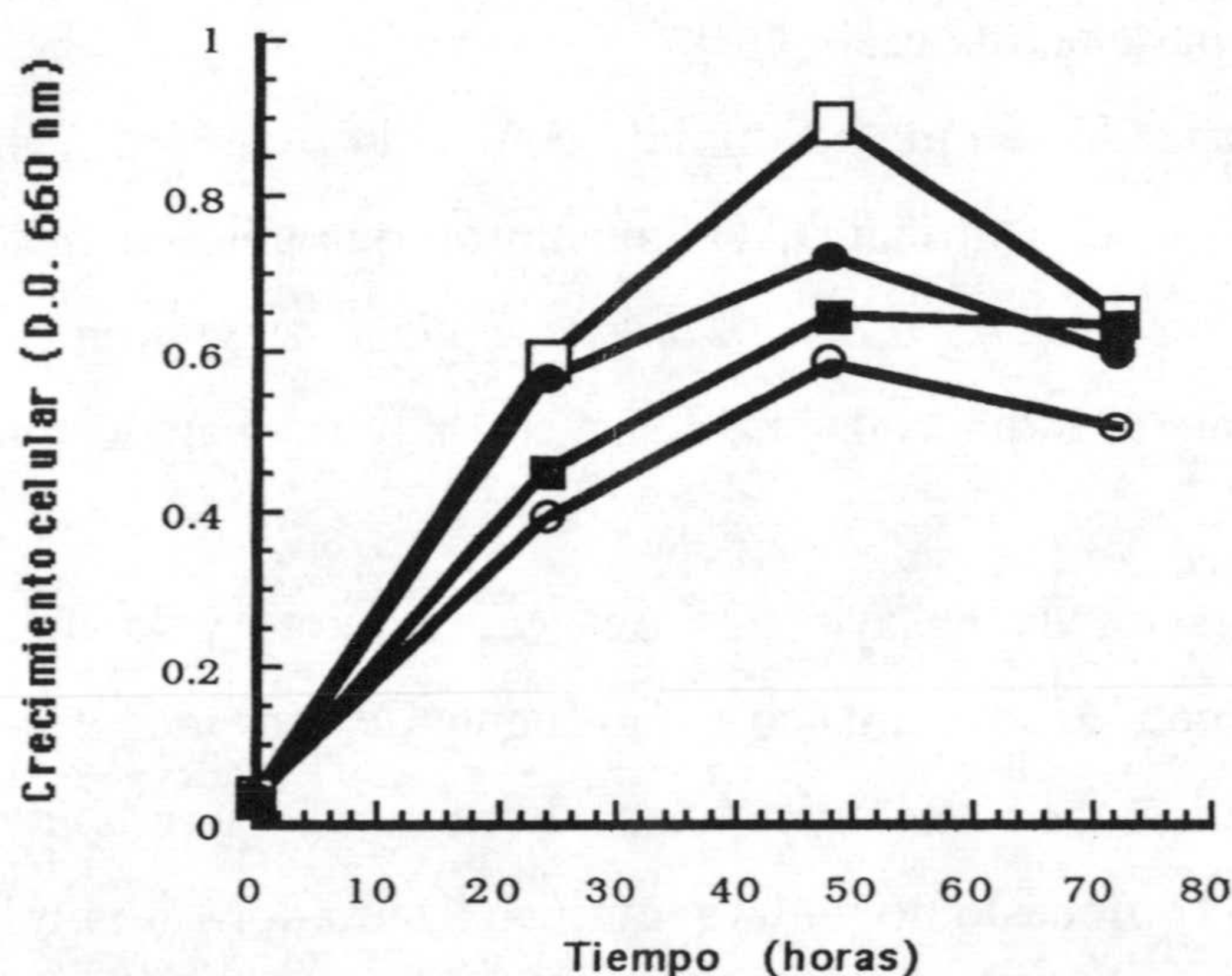


Figura R.5.2. Crecimiento de varias cepas bacterianas en medio mínimo con *o*-anísico como fuente de carbono. DAO1 (□); DAO2 (■); DAO3 (○) y DAO4 (●) se inocularon en medio mínimo M9 con 5 mM de ácido *o*-anísico como fuente de carbono, y a los tiempos indicados se determinó la turbidez (DO_{660nm}) de los cultivos.

R.5.2. ELUCIDACIÓN DE LOS PRIMEROS PASOS DE LA RUTA CATABÓLICA

Los experimentos encaminados a elucidar la ruta catabólica del ácido *o*-anísico se iniciaron con los 5 microorganismos, con el objeto de estudiar posibles diferencias en las rutas catabólicas.

R.5.2.1. EL PRIMER PASO DE LA RUTA ES LA *o*-DEMÉTILACIÓN E HIDROXILACIÓN DEL ÁCIDO *o*-ANÍSICO. EVIDENCIAS OBTENIDAS CON DICAMBA (ÁCIDO 3,6-DICLORO-2-METOXIBENZÓICO) COMO SUSTRATO.

El dicamba o ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico (Figura R.5.4), es un herbicida con una estructura química base del ácido *o*-anísico (Figura R.5.4) pero con dos átomos de cloro en posiciones 3 y 6. Es sabido que los compuestos halogenados son en muchos casos parcialmente metabolizados por los microorganismos, y el aislamiento de productos intermedios puede conducir a elucidar en parte la ruta catabólica.

Experimentos realizados en medio mínimo con ácido *o*-anísico 5 mM como fuente de carbono con las dos cepas que constituían DAO4 mostraron que sólo cuando se encontraban las dos bacterias juntas (*Arthrobacter oxydans* y *Pantoea agglomerans*) eran capaces de crecer con esta fuente de carbono, mientras que cada una de las cepas por separado no lo hacían. Esto se analizará posteriormente.

En una primera serie de ensayos las tres cepas puras y la mezcla DAO4 se cultivaron en medio mínimo con ácido *o*-anísico como fuente de carbono, y se transfirieron a medio mínimo con 5 mM de dicamba como única fuente de carbono. En ningún caso se observó crecimiento sugiriendo que el compuesto no podía ser mineralizado por estos microorganismos. A continuación se realizó otra serie de ensayos en los que las bacterias se cultivaron en medio mínimo con 5 mM de ácido *o*-anísico, se incubaron a 30°C y agitación de 250 rpm y cuando la turbidez de los cultivos a 660 nm fue superior a 0,5, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con 1 x M9 y se inocularon nuevos cultivos líquidos de medio mínimo utilizando como fuente de carbono una concentración 0,5% (p/v) de glucosa y se añadió 0,5 mM de dicamba. De cada uno de estos cultivos se tomaron muestras cada 24 horas y se determinó crecimiento bacteriano midiendo la turbidez del cultivo a 660 nm y la posible biotransformación del dicamba por análisis por HPLC, previa puesta a punto del método adecuado (ver Secciones A.1.6. y B.12.1.).

Los resultados obtenidos con las 4 cepas fueron similares y la figura R.5.3 presenta los resultados obtenidos con DAO3. En los cuatro casos hubo crecimiento bacteriano y biotransformación de dicamba acumulándose en el medio de cultivo un producto más polar que éste, el cual podría tratarse de la transformación del grupo metoxilo (-OCH₃) a un grupo hidroxilo (-OH).

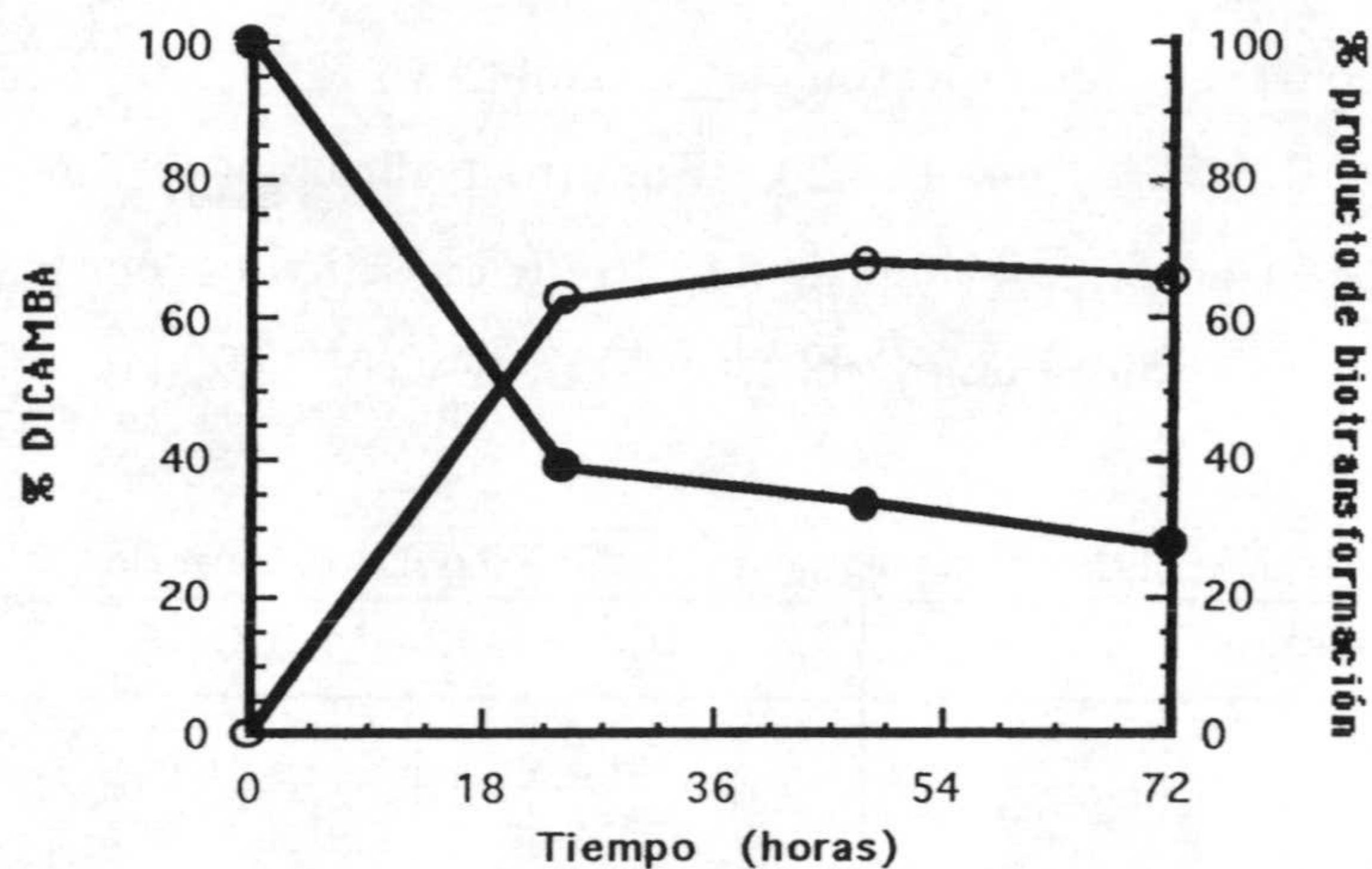


Figura R.5.3. Biotransformación de Dicamba por la cepa DAO3. DAO3 se inoculó en medio mínimo M9 con 0,5% (p/v) de glucosa y 0,5 mM de dicamba como fuente de carbono y a los tiempos indicados se determinaron las concentraciones relativas de dicamba (●), y de su producto de biotransformación (○), los cuales se analizaron en los medios de cultivo por HPLC a 230 nm.

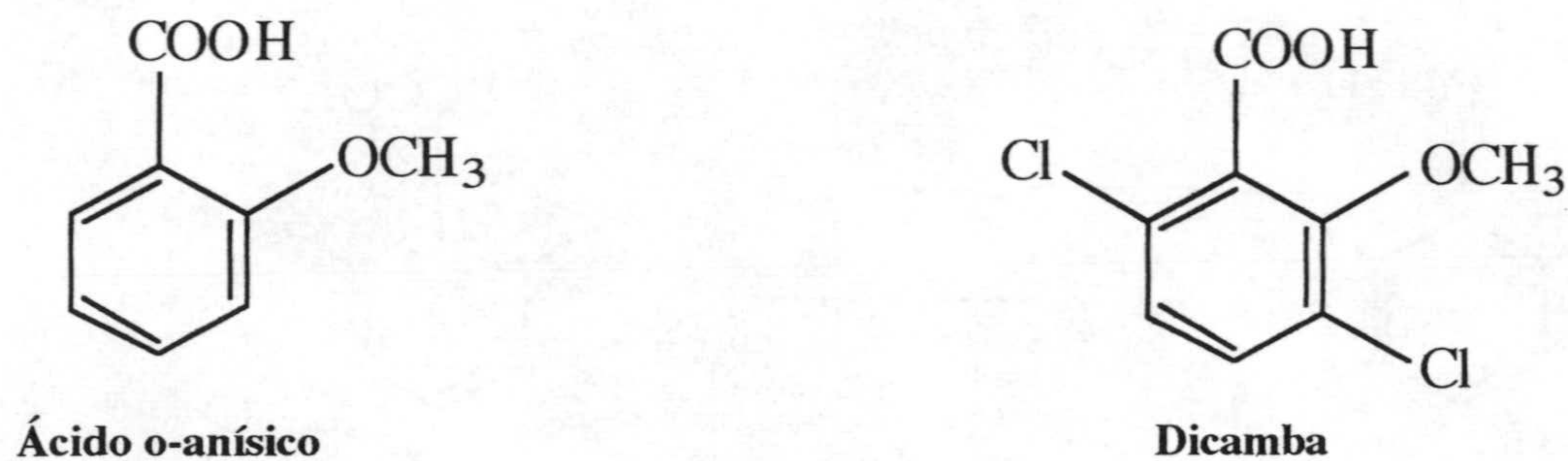


Figura R.4. Estructuras químicas del ácido o-anísico ó ácido 2-metoxibenzóico y del dicamba ó ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico.

Con objeto de determinar la naturaleza del producto resultante de la metabolización del dicamba se procedió como se ha indicado anteriormente, salvo que en este caso el inóculo fue de mayor volumen (100 ml). Tras 72 horas de incubación a 30°C y agitación de 250 rpm se separaron las células del medio de cultivo por centrifugación. El medio de cultivo sin células se extrajo con éter etílico 3 veces. A continuación la fase acuosa resultante se aciduló con una solución de HCl 2 N hasta pH 3 y se extrajo de nuevo otras tres veces con el mismo disolvente anteriormente utilizado. Cada una de las fases orgánicas obtenidas (extracción a pH 7 y extracción a pH 3) se secaron sobre

Na₂SO₄ anhidro y a continuación se llevaron hasta sequedad evaporando el disolvente en un evaporador rotatorio a 30°C. Cada uno de los extractos obtenidos se analizó por RMN-¹H. En ambos extractos se identificaron el dicamba y el ácido 2-hidroxi-3,6-diclorobenzoico (Figura R.5.5), (Tabla R.5.2), (espectro E-dicamba-c). En bibliografía está descrita la conversión de dicamba en ácido 3,6-diclorosalicílico por varias cepas bacterianas (Krueger y col., 1989; Wang y col., 1997; Yang y col., 1994).

Tabla R.5.2. Datos de RMN-¹H del Dicamba y del ácido 2-hidroxi-3,6-diclorobenzoico

DICAMBA		2-HIDROXI-3,6-DICLOROBENZOICO	
H-3	7,15 d (8,7 Hz)	H-3	6,98 d (8,6 Hz)
H-4	7,39 d (8,7 Hz)	H-4	7,46 (8,6 Hz)
-OCH ₃	3,97 s	-	-

Desplazamientos químicos en ppm relativas a TMS; constantes de acoplamiento J en Hz.

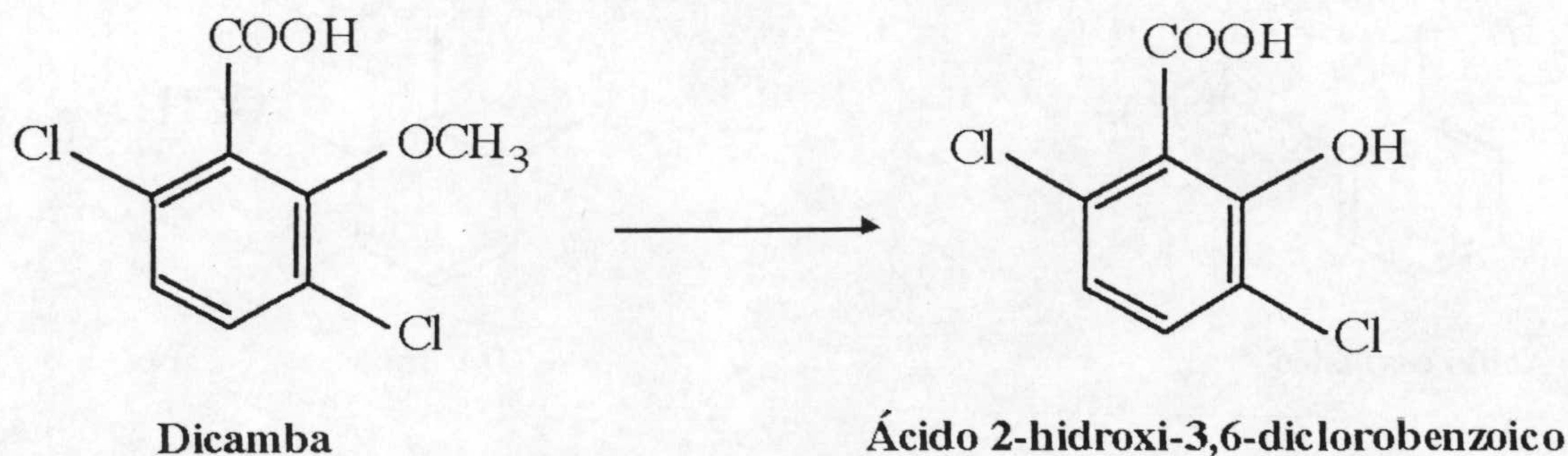


Figura R.5.5. Reacción de biotransformación del dicamba.

El extracto ácido se derivatizó como se describió en la Sección A.2.5. y se analizó por cromatografía de gases (Sección A.1.7.) utilizando una rampa de temperatura desde 110°C durante 2 minutos, hasta 160°C, aumentando la temperatura 10°C/min. Finalmente se mantuvo la temperatura a 160°C durante un minuto. Como cabía esperar aparecieron 2 picos, uno a 1,7 min. minoritario y otro a 2,3 min. mayoritario que, de acuerdo con los resultados obtenidos por RMN-¹H, se puede decir que el que apareció al

tiempo de retención de 1,7 min. es el ácido 2-hidroxi-3,6-diclorobenzoico y el que apareció a un tiempo de retención de 2,3 es el dicamba.

Los resultados anteriormente presentados sugerían que el primer paso de la ruta catabólica del ácido *o*-anísico es la conversión de éste a ácido salicílico (Figura R.5.6)

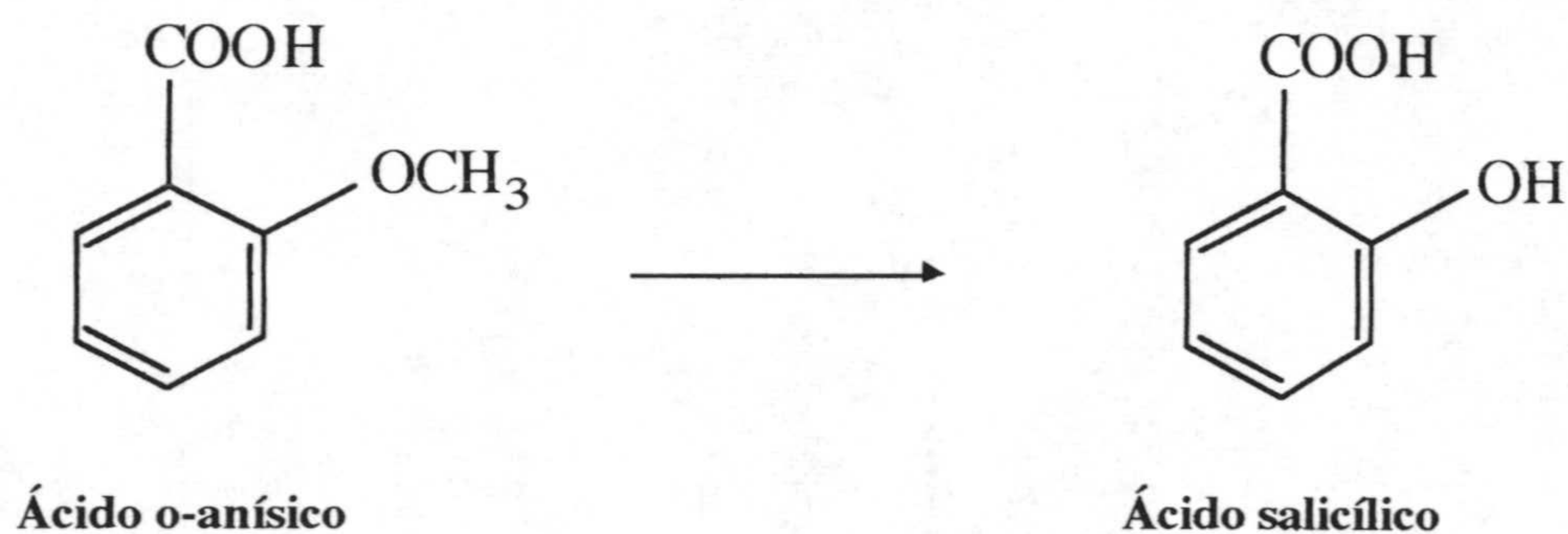


Figura R.5.6. Esquema del primer paso de la ruta catabólica del ácido *o*-anísico

R.5.2.2. ELUCIDACIÓN DEL SEGUNDO Y TERCER PASOS DE LA RUTA CATABÓLICA DEL ÁCIDO *o*-ANÍSICO. METABOLIZACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO, ÁCIDO GENTÍSICO Y CATECOL POR LAS CEPAS DAO1, DAO2 Y DAO3.

Si el ácido salicílico fuera el producto del metabolismo del ácido *o*-anísico era de esperar que las cepas DAO1, DAO2 y DAO3 crecieran en ácido salicílico como única fuente de carbono. Para confirmarlo se realizaron una serie de siembras en placa de medio mínimo M9 con 5 mM de ácido salicílico como única fuente de carbono, partiendo de bacteria cultivada en placa de medio mínimo M9 con ácido *o*-anísico 5 mM como fuente de carbono. En todos los casos hubo crecimiento bacteriano.

A partir del ácido salicílico, se podrían seguir varias rutas para la degradación de este ácido, todas encaminadas a la hidroxilación del anillo aromático en una o más posiciones. Las dos rutas más frecuentes en la degradación de este aromático son la degradación via catecol, previa descarboxilación del anillo; y via ácido gentísico en la que el ácido salicílico es hidroxilado en la posición 5. Mientras que el ácido gentísico parece degradarse vía *orto*, el anillo de catecol puede sufrir fisión tanto de tipo *orto* como *meta* (Figura R.5.7.).

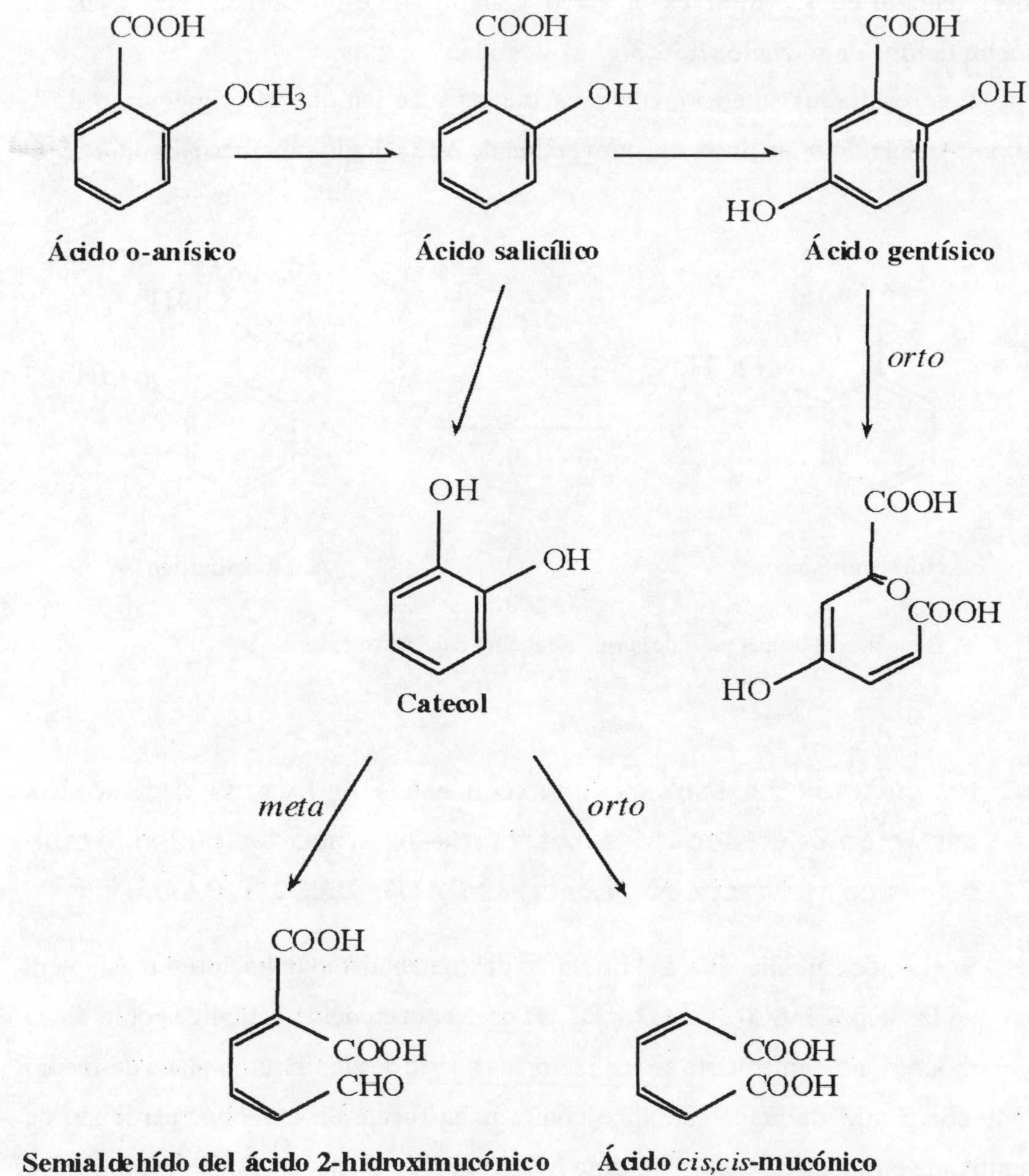


Figura R.5.7. Esquema de las posibles rutas catabólicas que podría seguir la degradación del ácido salicílico.

Con objeto de determinar si la ruta de asimilación de salicilato implicaba una fisión *meta*, células de las cepas DAO1, DAO2 y DAO3 cultivadas en placa de medio mínimo M9 con ácido *o*-anísico se expolvorearon con una solución de 0,5 M de catecol. La falta de cambio de color de las colonias sugerían que el catecol no se metabolizaba vía *meta*, ya que el semialdehído del ácido 2-hidroximucónico al que da lugar esta ruptura es

de color amarillo intenso. Este resultado excluía la ruta meta, aunque no daba información sobre cual de las dos rutas orto era funcional en estas cepas.

Con objeto de estudiar cual de las dos rutas era la que seguían estas cepas, se sembraron en medio líquido las bacterias DAO1, DAO2 y DAO3 utilizando como fuente de carbono cada uno de los posibles metabolitos de la ruta a concentración 5 mM, y tras incubar durante 24 horas a 30°C y 250 rpm se sembraron diluciones seriadas en placas de medio mínimo M9 utilizando como fuente de carbono la misma que se había utilizado en los cultivos líquidos (Tabla R.5.3.).

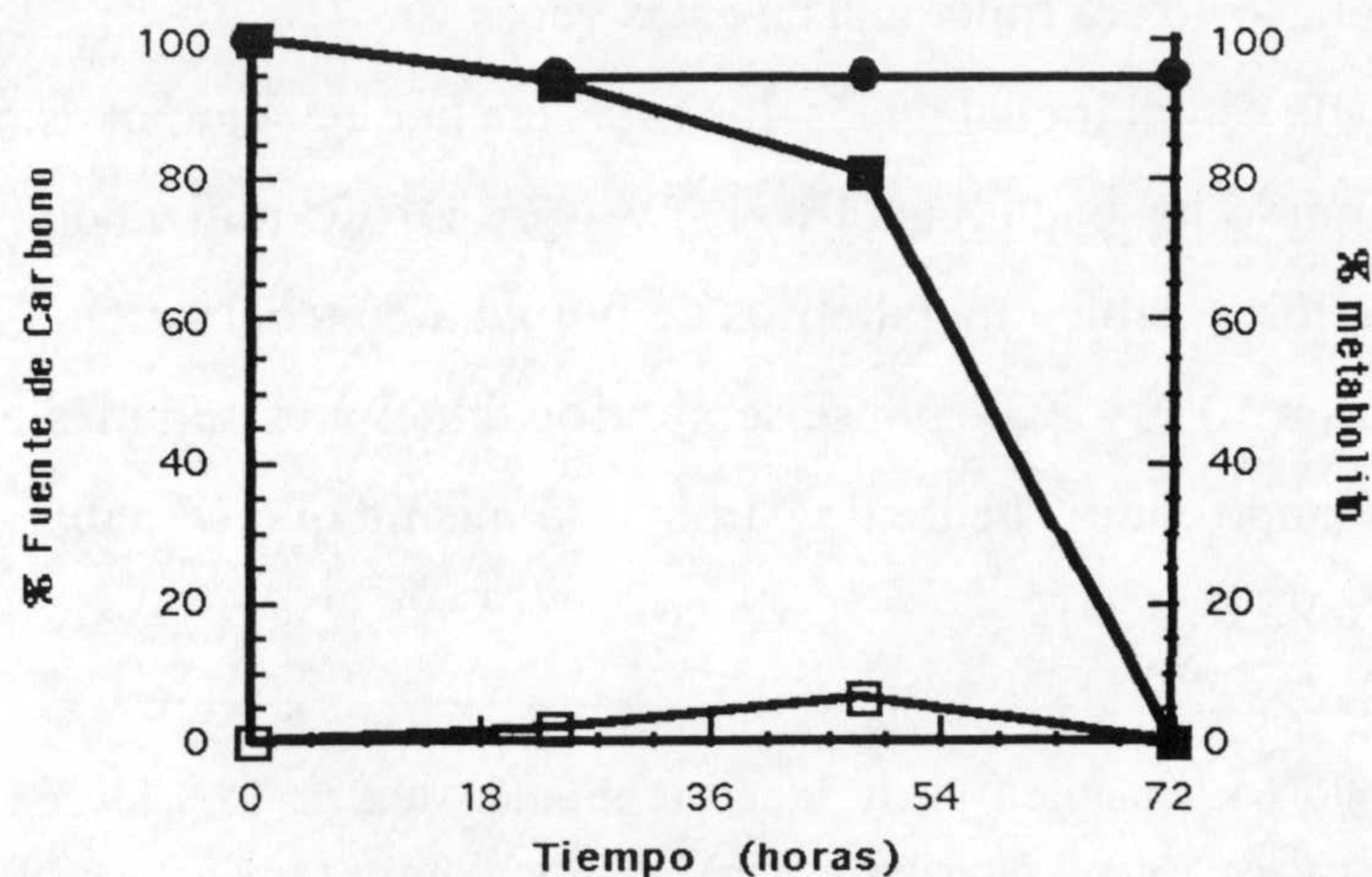
Tabla R.5.3. Crecimiento bacteriano en placa de medio mínimo utilizando ácido *o*-anísico, ácido salicílico, ácido gentísico y catecol a concentración de 5 mM como fuente de carbono.

	Ac. <i>o</i> -anísico	Ac. salicílico	Ac. gentísico	Catecol
DAO1	++	+	++	-
DAO2	++	-	++	-
DAO3	++	+	++	-

:- 10^1 - 10^3 cfu/mL; +: 10^4 - 10^5 cfu/mL; ++: 10^6 - 10^7 ufc/mL

Estos resultados sugerían que las cepas DAO1, DAO2 y DAO3 utilizaban la ruta del ácido gentísico puesto que el número de bacterias al final del ensayo en medio con gentísico fue del orden de 10^7 ufc/ml mientras que era 4 ordenes de magnitud inferior en catecol.

A continuación se decidió estudiar si las bacterias cultivadas en ácido *o*-anísico o ácido salicílico daban lugar a la acumulación de algún producto intermedio. Para ello se realizó el siguiente ensayo con cada una de las tres cepas. Se partió de un preinóculo de las tres cepas en ácido *o*-anísico 5 mM y cuando los cultivos alcanzaron una D.O. a 660 nm de alrededor de 0,5 una alícuota de los cultivos (5 ml) previa centrifugación se transfirió a cultivos líquidos de 50 ml con 5 mM de ácido *o*-anísico ó ácido salicílico. De cada uno de los cultivos se tomaron muestras cada 24 horas para analizar la posible acumulación de metabolitos y consumo de la fuente de carbono inicial mediante análisis por HPLC como se muestra en la Sección A.1.6. de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos con DAO1 se presentan en la figura R.5.8. Se observó la acumulación transitoria de un metabolito que absorbe a 230 nm tanto en cultivos con *o*-anísico como con salicílico.



Gráfica R.5.8. Consumo de ácido *o*-anísico y ácido salicílico por la cepa DAO1. Ácido *o*-anísico (●), ácido salicílico (■) y metabolito acumulado temporalmente (□). DAO1 se inoculó en medio mínimo M9 con ácido *o*-anísico ó ácido salicílico 5 mM. A los tiempos indicados se analizaron los medios de cultivo por HPLC. Se pudo observar la acumulación de un metabolito que absorbía a 230 nm y que finalmente era degradado. Las concentraciones relativas están expresadas en % respecto a la cantidad inicial de fuente de carbono.

R.5.2.3. IDENTIFICACIÓN DEL METABOLITO QUE APARECE EN LA RUTA CATABÓLICA DEL ÁCIDO *o*-ANÍSICO

Para comprobar la naturaleza del compuesto, que podría ser ácido gentísico, primero se añadió a los medios de cultivo en los que aparecía este producto intermedio 10 μ L de ácido gentísico 0,5 M, y la muestra mezcla se analizó por HPLC del mismo modo que se analizaron las muestras originales tomadas de cada uno de los cultivos. En todos los casos el producto presente y el añadido aparecieron en un mismo pico, esto es, ácido gentísico añadido y el metabolito presente en el medio de cultivo co-eluyen. Esto sugería que el producto era ácido gentísico (Figura R.5.9. y R.5.10.).

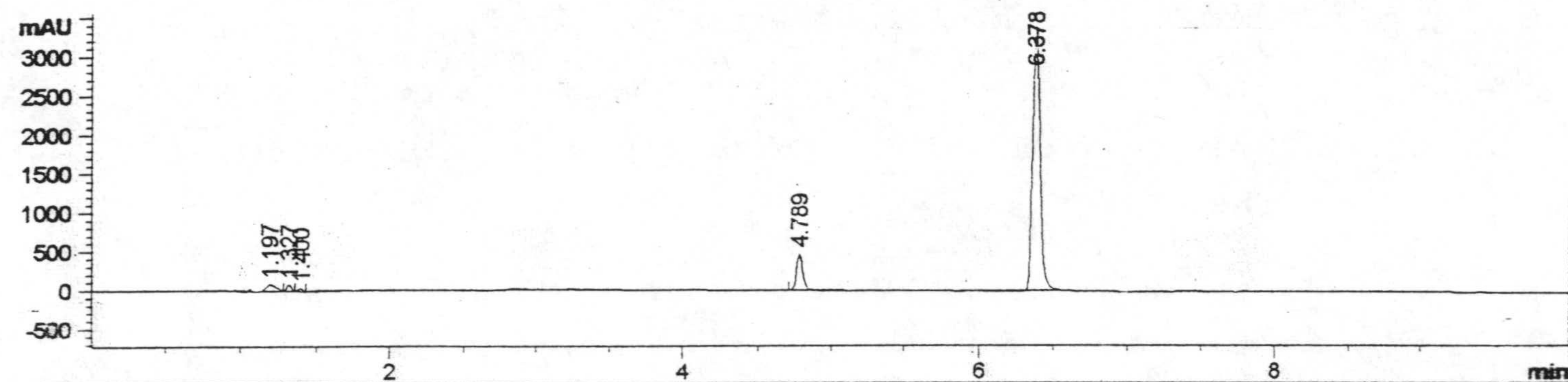


Figura R.5.9. Cromatograma a tiempo 48 horas del medio de cultivo de DAO3 en medio mínimo M9 con ácido salicílico 5 mM como fuente de carbono sin adición de ácido gentísico. El pico que aparece a tiempo de retención 6,378 corresponde al ácido salicílico y el pico que aparece a un tiempo de retención de 4,789 es el nuevo metabolito.

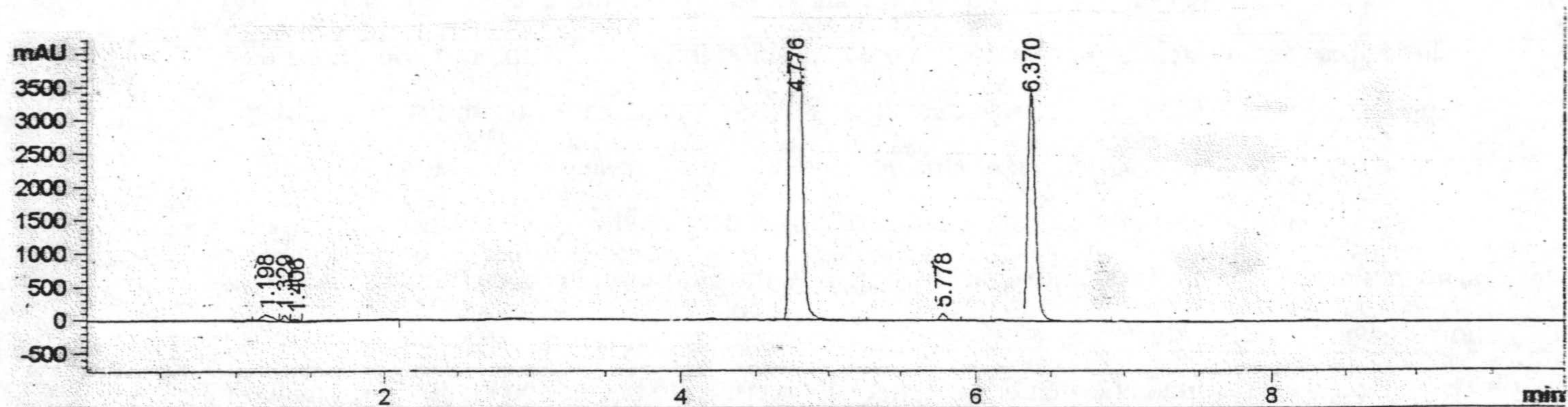


Figura R.5.10. Cromatograma a tiempo 48 horas del medio de cultivo de DAO3 en medio mínimo M9 con ácido salicílico 5 mM como fuente de carbono con adición de 10 μ l de ácido gentísico 0,5M. El pico que aparece a 6,370 corresponde al ácido salicílico y a un tiempo de retención de 4,776 se puede apreciar como co-eluyen perfectamente el metabolito que aparece en la figura R.8 y el ácido gentísico.

Según estos resultados se puede decir que el metabolito que aparece en la ruta catabólica del ácido *o*-anísico es ácido gentísico. La acumulación de este producto en determinados casos confirma que la ruta catabólica del ácido *o*-anísico tiene lugar vía ácido gentísico y no catecol.

R.5.3. DEGRADACIÓN DE ÁCIDO *o*-ANÍSICO POR UN CONSORCIO BACTERIANO

El consorcio denominado DAO4 estaba formado por una Gram negativa *Pantoea agglomerans* y una Gram positiva *Arthrobacter oxydans* y es objeto de los siguientes ensayos.

R.5.3.1. ESTUDIO CON DAO4 DE LA BIODEGRADACIÓN DEL ÁCIDO *o*-ANÍSICO DURANTE LAS PRIMERAS 24 HORAS

Los resultados presentados en la figura R.5.2. sugerían que durante las primeras 24 horas de cultivo se producía el máximo crecimiento bacteriano y el mayor consumo de ácido *o*-anísico (ver figura R.5.2.). Con el objeto de estudiar tanto el crecimiento como el consumo de esta fuente de carbono durante las primeras 24 horas, así como intentar localizar algún otro metabolito de la ruta diferente al ácido gentísico que pudiera aparecer al iniciarse la ruta, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se partió de un preinóculo de DAO4 en ácido *o*-anísico 5 mM, se inocularon dos cultivos líquidos también con DAO4, uno con ácido *o*-anísico 5 mM y otro con ácido salicílico 5 mM. En este experimento se tomaron muestras cada dos horas desde el tiempo 0 horas hasta las 12 primeras horas, y a partir de aquí a las 24 horas de iniciado el cultivo y entonces cada 24 horas hasta las 72 horas.

Los resultados obtenidos respecto al crecimiento bacteriano en ácido *o*-anísico y ácido salicílico, y respecto al consumo de cada una de estas fuentes de carbono se muestran en la figura R.5.11. A y B, respectivamente.

Se observó que tanto en el caso de cultivos líquidos de DAO4 cultivados con ácido *o*-anísico como con ácido salicílico el consumo total de la fuente de carbono utilizada coincidió con el máximo número de ufc/ml para cada cepa. En ambos cultivos el único metabolito que se acumuló fue el ácido gentísico.

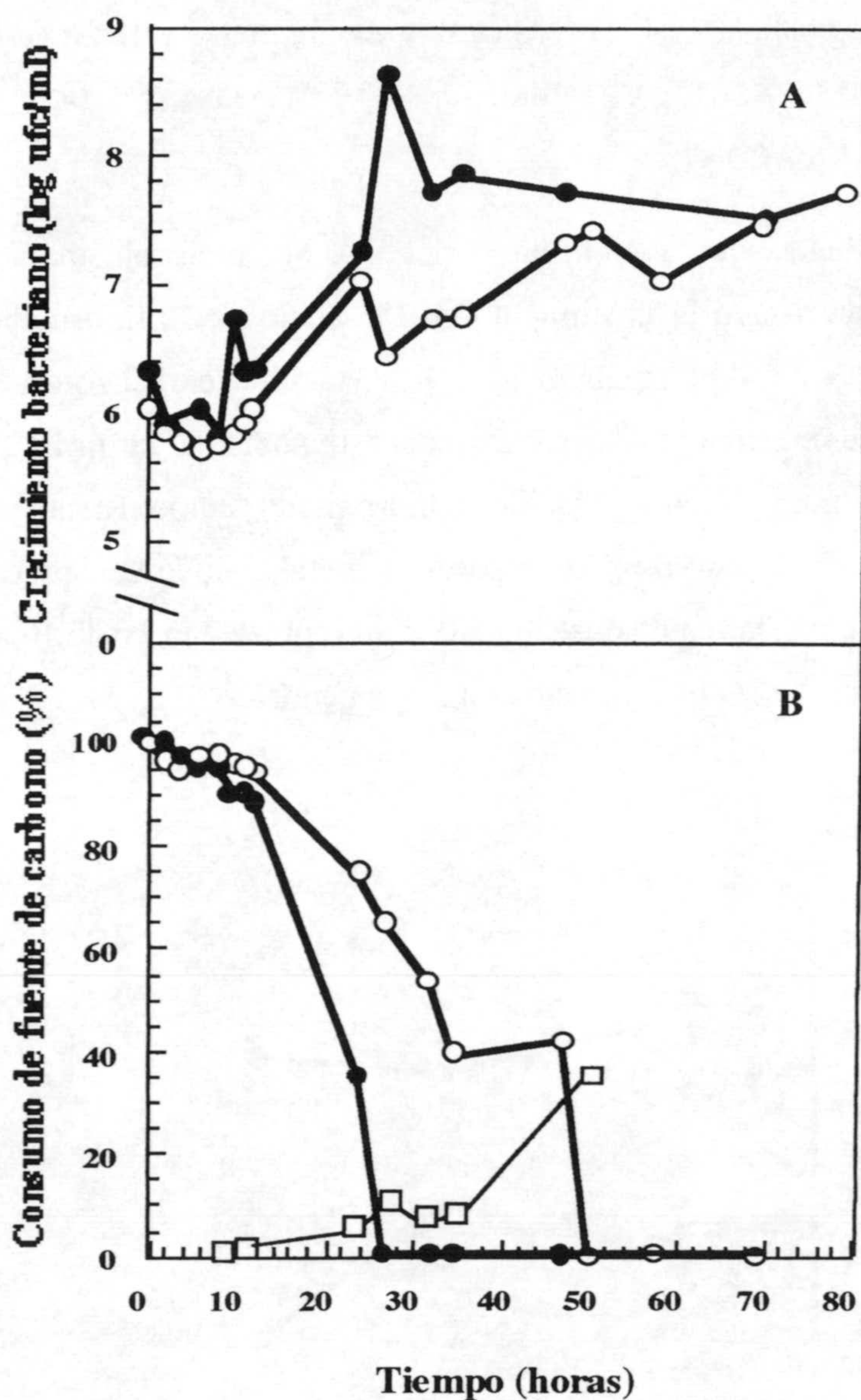


Figura R.5.11. Crecimiento del consorcio DAO4 con ácido *o*-anísico y ácido salicílico como fuente de carbono. En el panel A se representa el crecimiento bacteriano de DAO4 en medio líquido con ácido *o*-anísico ó ácido salicílico 5 mM como fuente de carbono; en el panel B se representa el consumo de cada una de las fuentes de carbono y la aparición de un metabolito que absorbe a 230 nm. DAO4 se inoculó en cultivos líquidos de medio mínimo M9 con ácido *o*-anísico (●) ó ácido salicílico (○) 5 mM como fuente de carbono. A los tiempos indicados se determinó el crecimiento bacteriano mediante siembra de diluciones seriadas en placas de LB así como la concentración relativa de cada una de las fuentes de carbono utilizadas y del metabolito que aparece (□) mediante análisis de los medios de cultivo por HPLC a 230 nm.

R.5.3.2. EL CONSORCIO DAO4 METABOLIZA EL ÁCIDO GENTÍSICO (ÁCIDO 2,5-DIHIDROXIBENZOICO) PERO NO OTROS ÁCIDOS BENZOICOS DIHIDROXILADOS.

Con objeto de comprobar si DAO4 metabolizaba otros ácidos dihidroxibenzoicos se ensayó el crecimiento en los ácidos 2,3-dihidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoico, 2,6-dihidroxibenzoico, 3,4-dihidroxibenzoico y 3,5-dihidroxibenzoico. El crecimiento se siguió como medida de la turbidez del cultivo inoculado en medio mínimo con el ácido dihidroxilado como fuente de carbono a concentración 5 mM. En estos ensayos se partió de células de DAO4 precultivadas en 5 mM de ácido *o*-anísico. Los resultados obtenidos se representan en la figura R.5.12, e indican que el consorcio DAO4 solo creció con ácido gentísico.

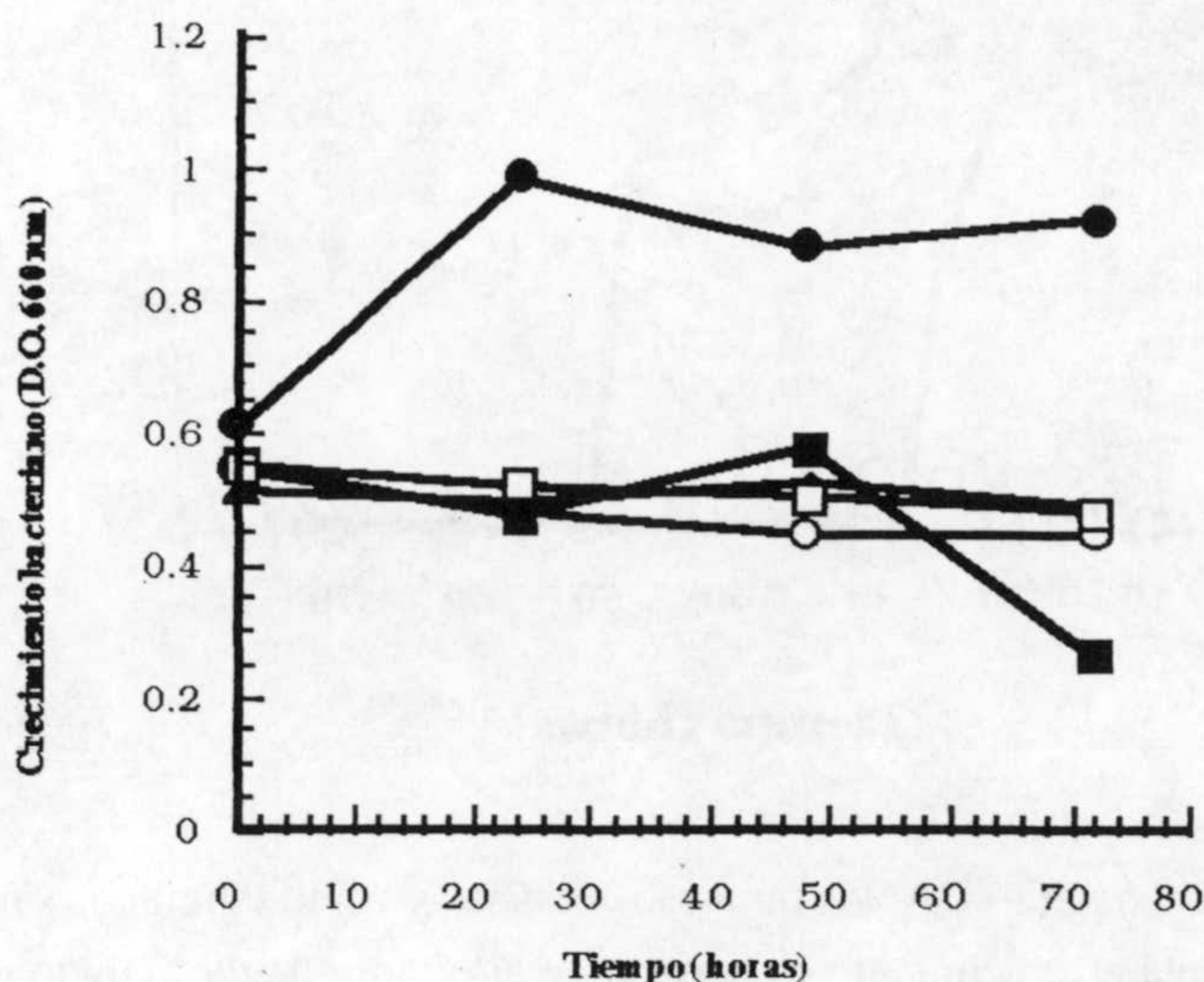


Figura R.12. Crecimiento de la cepa DAO4 en medio mínimo con diferentes ácidos dihidroxibenzoicos como fuente de carbono. DAO4 se inoculó en medio mínimo M9 con 5 mM de los ácidos 2,3-dihidroxibenzoico (▲), 2,5-dihidroxibenzoico ó gentísico (●), 2,6-dihidroxibenzoico (○), 3,4-dihidroxibenzoico (■) y 3,5-dihidroxibenzoico (□) como fuente de carbono y a los tiempos indicados se determinó la turbidez a 660 nm de los cultivos.

En este ensayo se analizaron por HPLC los metabolitos presentes en el caldo de cultivo con objeto de determinar si había degradación de la fuente de carbono utilizada en cada caso. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R.5.13.

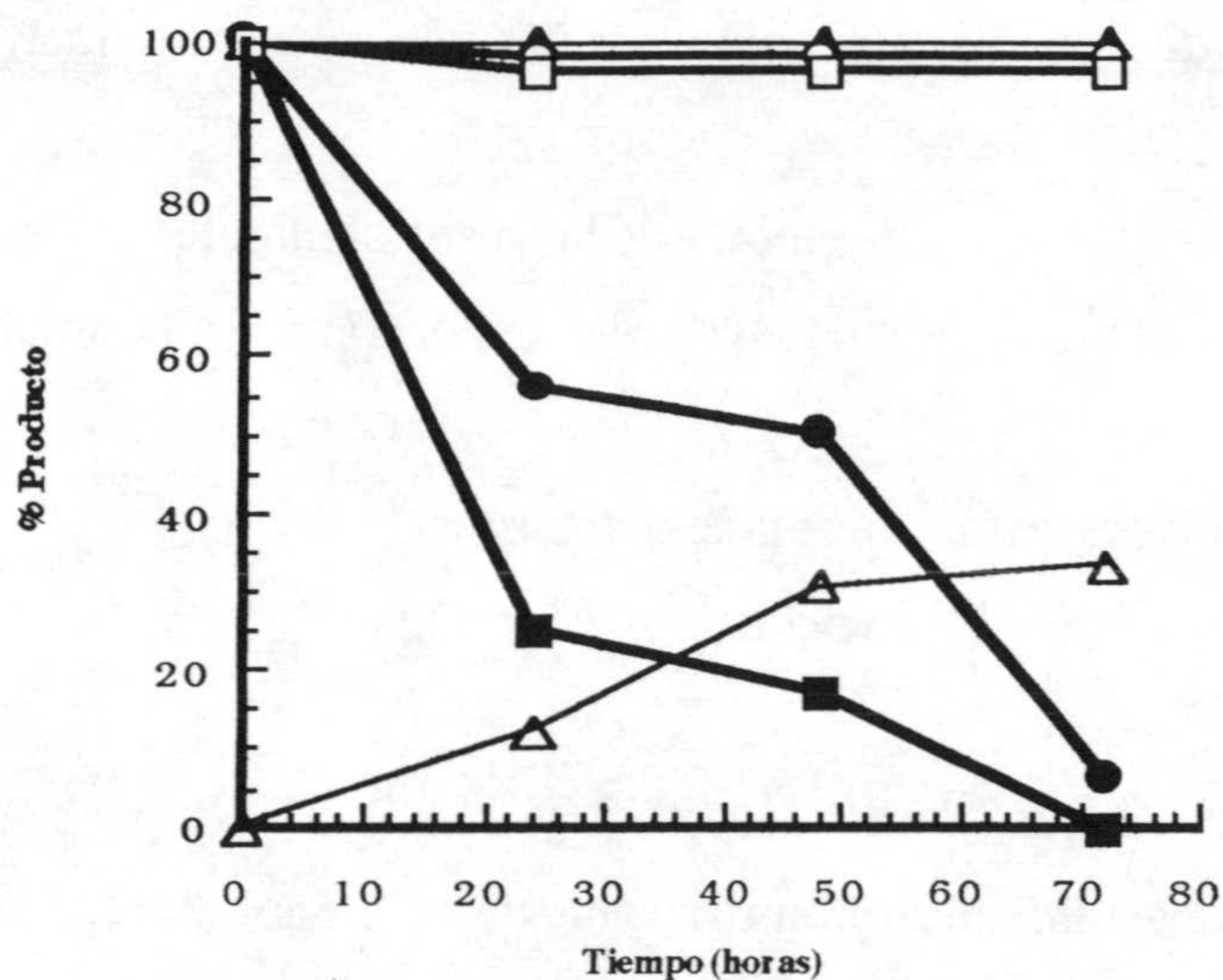


Figura R.5.13. Consumo de ácidos dihidroxilados por DAO4. DAO4 se inoculó en medio mínimo M9 con 5 mM de los ácidos 2,3-dihidroxibenzoico (▲), 2,5-dihidroxibenzoico ó gentísico (●), 2,6-dihidroxibenzoico (○), 3,4-dihidroxibenzoico (■) y 3,5-dihidroxibenzoico (□) y metabolito acumulado (Δ). Las concentraciones relativas están expresadas en % respecto a la cantidad inicial de fuente de carbono.

Se observó, como cabía esperar, que la cepa DAO4 consumía el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, los ácidos 2,3-, 2,6- y 3,5-dihidroxibenzoicos no fueron metabolizados, en cambio se observó consumo de ácido 3,4-dihidroxibenzoico indicando que la falta de crecimiento bacteriano (ver figura R.5.12) se puede deber a la acumulación de un producto intermedio que podría ser tóxico a la bacteria. En relación con esta observación fue que se detectó en el medio de cultivo con este ácido dihidroxilado la acumulación con el tiempo de un metabolito que absorbía a 230 nm. El producto no se identificó químicamente.

R.5.4. ORGANISMO DEGRADADOR DEL CONSORCIO

R.5.4.1. AISLAMIENTO DE CADA UNA DE LAS CEPAS QUE COMPONEN EL CONSORCIO DAO4

Con objeto de establecer si cada una de las cepas del consorcio era capaz de degradar ácido *o*-anísico o si, por el contrario, era necesario que estuvieran las dos juntas,

o sea, que formaran un consorcio real para llevar a cabo la degradación, se procedió al aislamiento de cada una de ellas en placa de LB que es donde se pueden distinguir tanto en tamaño como en color, ya que en placa de medio mínimo ambas presentan el mismo tamaño y color.

A estas bacterias se les va a denominar de la forma siguiente:

DAO4: es el conjunto de la blanca-pequeña *Arthrobacter oxydans* y la amarilla-grande *Pantoea agglomerans*.

DAO4-A: es la cepa *Pantoea agglomerans* (grande y amarilla).

DAO4-B: es la cepa *Arthrobacter oxydans* (pequeña y blanca).

En primer lugar se sembraron DAO4-A y DAO4-B en placas de medio mínimo y en cultivos líquidos utilizando como fuente de carbono 5 mM de ácido *o*-anísico. El resultado obtenido en cada una de ellas tras 48 horas de incubación a 30°C fue inferior a 10^1 - 10^3 ufc/ml y la turbidez inferior a 0,05 unidades a 660 nm. Esto sugería que ni DAO4-A ni DAO4-B por separado fueron capaces de utilizar ácido *o*-anísico como fuente de carbono.

Se volvió a realizar este tipo de experimento pero cada uno de los cultivos líquidos se suplementó en un caso con un 0,02% (p/v) de extracto de levadura y en otro caso con un 0,05% (p/v) de glucosa. Los resultados se muestran en la figura R.5.14. y R.5.15.

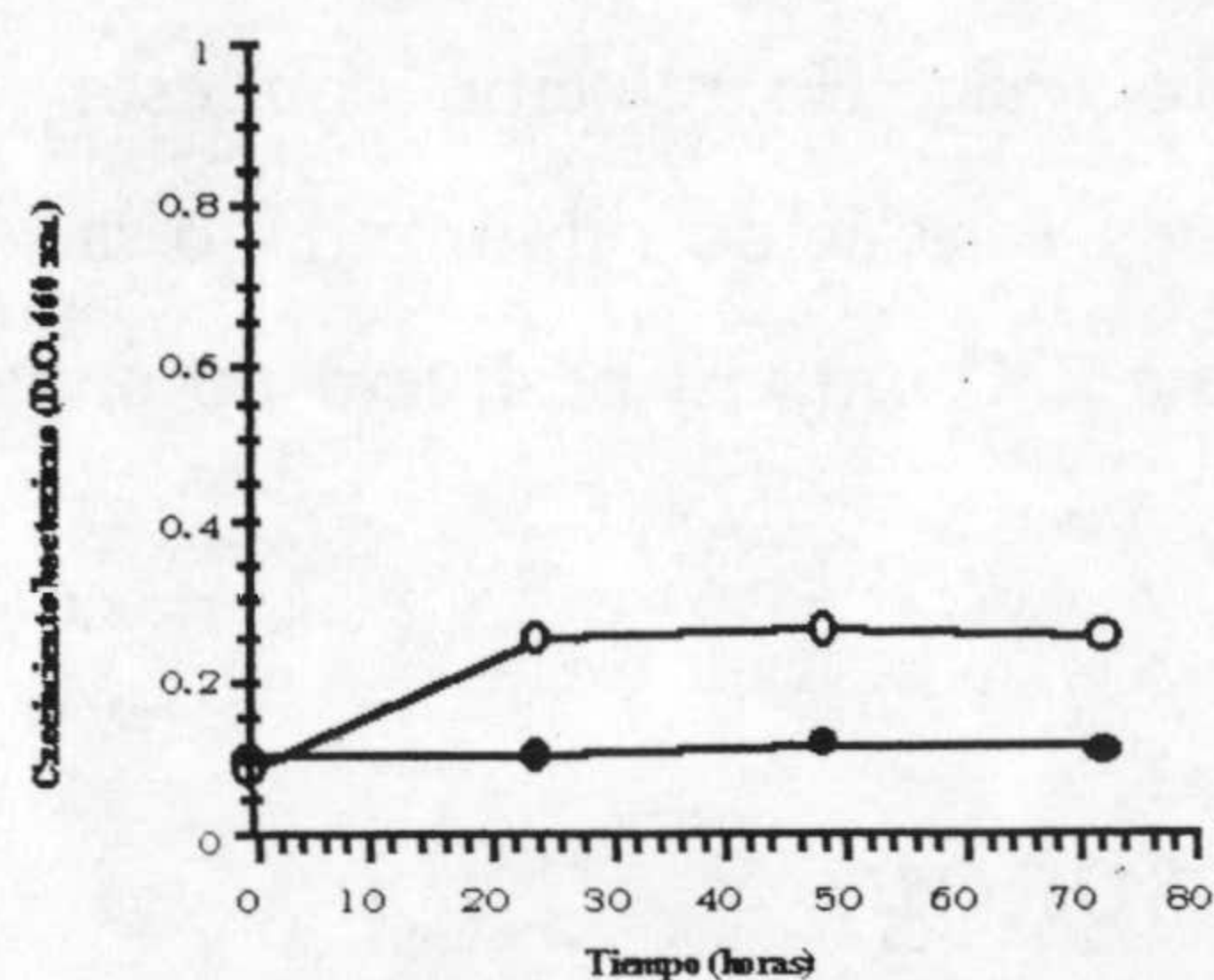


Figura R.5.14. Crecimiento bacteriano de DAO4-A y DAO4-B en medio de cultivo líquido, utilizando ácido *o*-anísico a concentración 5 mM y extracto de levadura en una concentración 0,02% (p/v) como fuente de carbono. Medida de D.O. a 660 nm a los tiempos indicados. DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

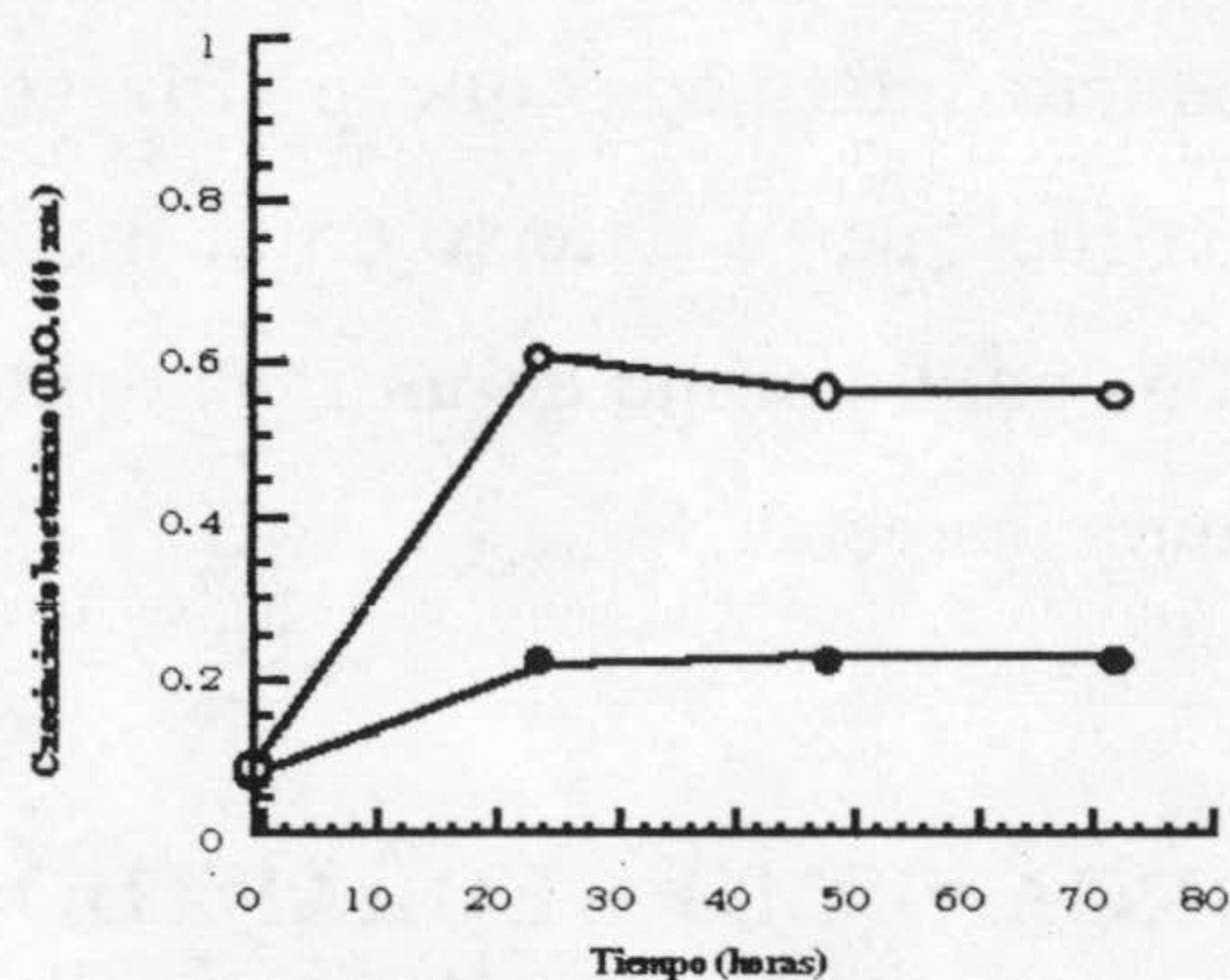


Figura R.5.15. Crecimiento bacteriano de DAO4-A y DAO4-B en medio de cultivo líquido, utilizando ácido *o*-anísico a concentración 5 mM y glucosa en una concentración 0,05% (p/v) como fuente de carbono. Medida de D.O. a 660 nm a los tiempos indicados. DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

Se observó que las cepas DAO4-A y DAO4-B crecieron en medio con 0,05% (p/v) de glucosa, mientras que con 0,02% de extracto de levadura sólo se observó crecimiento de DAO4-B. Pero este crecimiento lo experimentan solo durante las primeras 24 horas de incubación, lo cual hace pensar que sea debido al pequeño aporte de extracto de levadura y glucosa en cada uno de los casos y no al compuesto aromático.

Estos resultados sugieren que la degradación de ácido *o*-anísico por DAO4 requiere de un consorcio bacteriano.

R.5.4.2. CONFIRMACIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO

Para confirmar la presencia del consorcio bacteriano componente de DAO4 se realizaron otra serie de experimentos similares a los anteriores pero incluyendo al conjunto de las dos cepas, o sea, a DAO4.

En primer lugar se sembraron en cultivos líquidos DAO4, DAO4-A y DAO4-B, utilizando como fuente de carbono ácido *o*-anísico 5 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R.5.16.

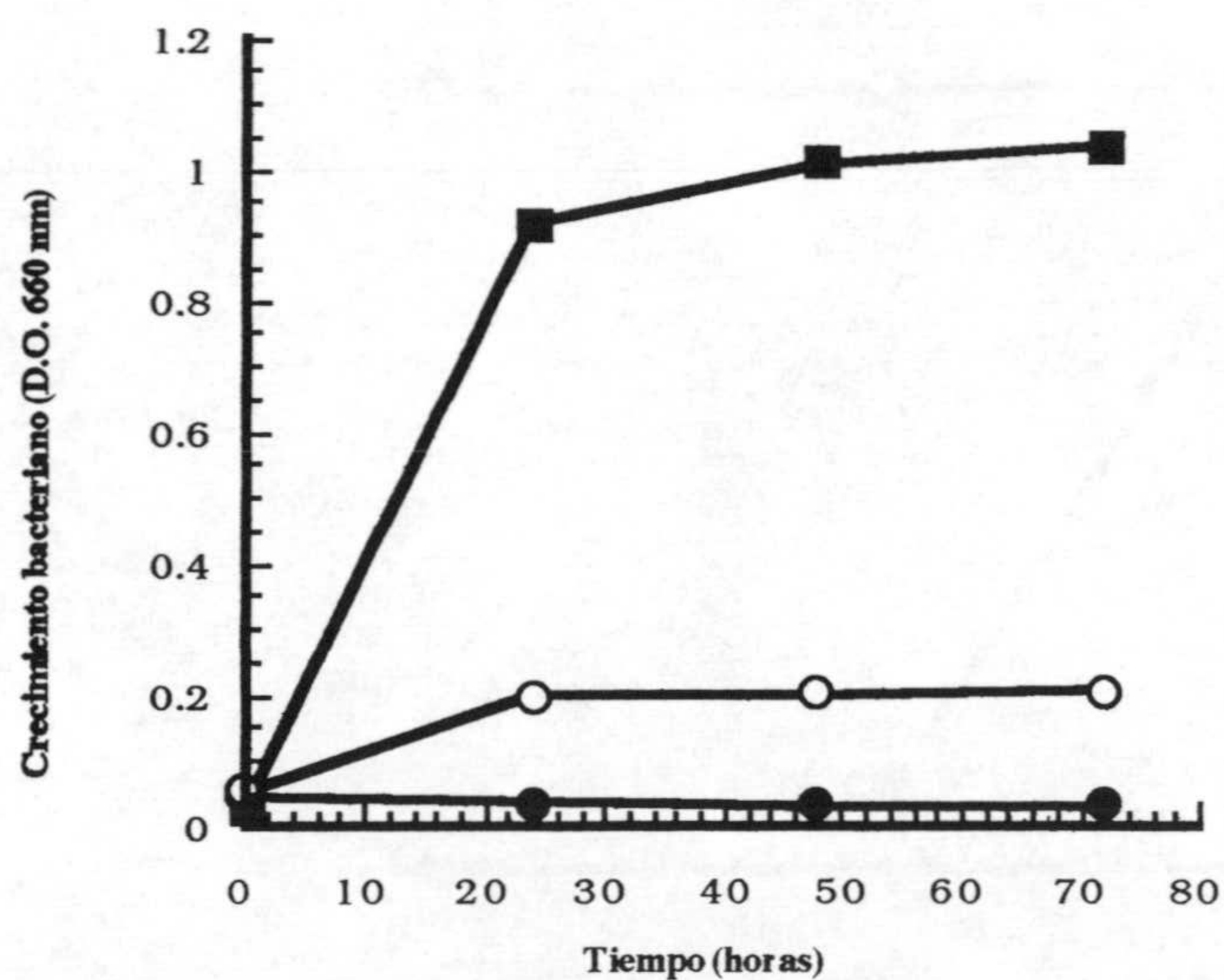


Figura R.5.16. Crecimiento bacteriano de DAO4, DAO4-A y DAO4-B en cultivos líquidos utilizando ácido *o*-anísico como fuente de carbono en una concentración 5 mM. DAO4 (■), DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

En esta gráfica podemos observar como sólo la mezcla de las dos bacterias es capaz de crecer utilizando ácido *o*-anísico como fuente de carbono y que cada una de las cepas aisladas no es capaz de utilizar este compuesto como fuente de carbono.

Este experimento se volvió a repetir partiendo de un preinóculo de cada una de las cepas con ácido *o*-anísico 5 mM y glucosa al 0,05 % (p/v). Tras 24 horas de incubación a 30°C se inocularon cultivos líquidos con cada una de las cepas utilizando ácido *o*-anísico como fuente de carbono y energía. Los resultados obtenidos fueron similares a los presentados en la figura R.5.16. Igual que ocurre en el caso anterior, sólo se observó crecimiento bacteriano en el caso que estuvieran las dos cepas bacterianas asociadas, y cuando estuvieron aisladas no lo hubo.

En este experimento también se tomaron muestras para analizarlas por HPLC, con objeto de determinar si había degradación del ácido *o*-anísico por parte de alguna de las cepas aisladas. El resultado fue, como cabía esperar, que solo hubo degradación en el caso de DAO4, o sea, cuando se encontraron las dos cepas juntas, y, sin embargo, cuando estas cepas estuvieron aisladas no hubo consumo de la fuente de carbono. Figura R.5.17.

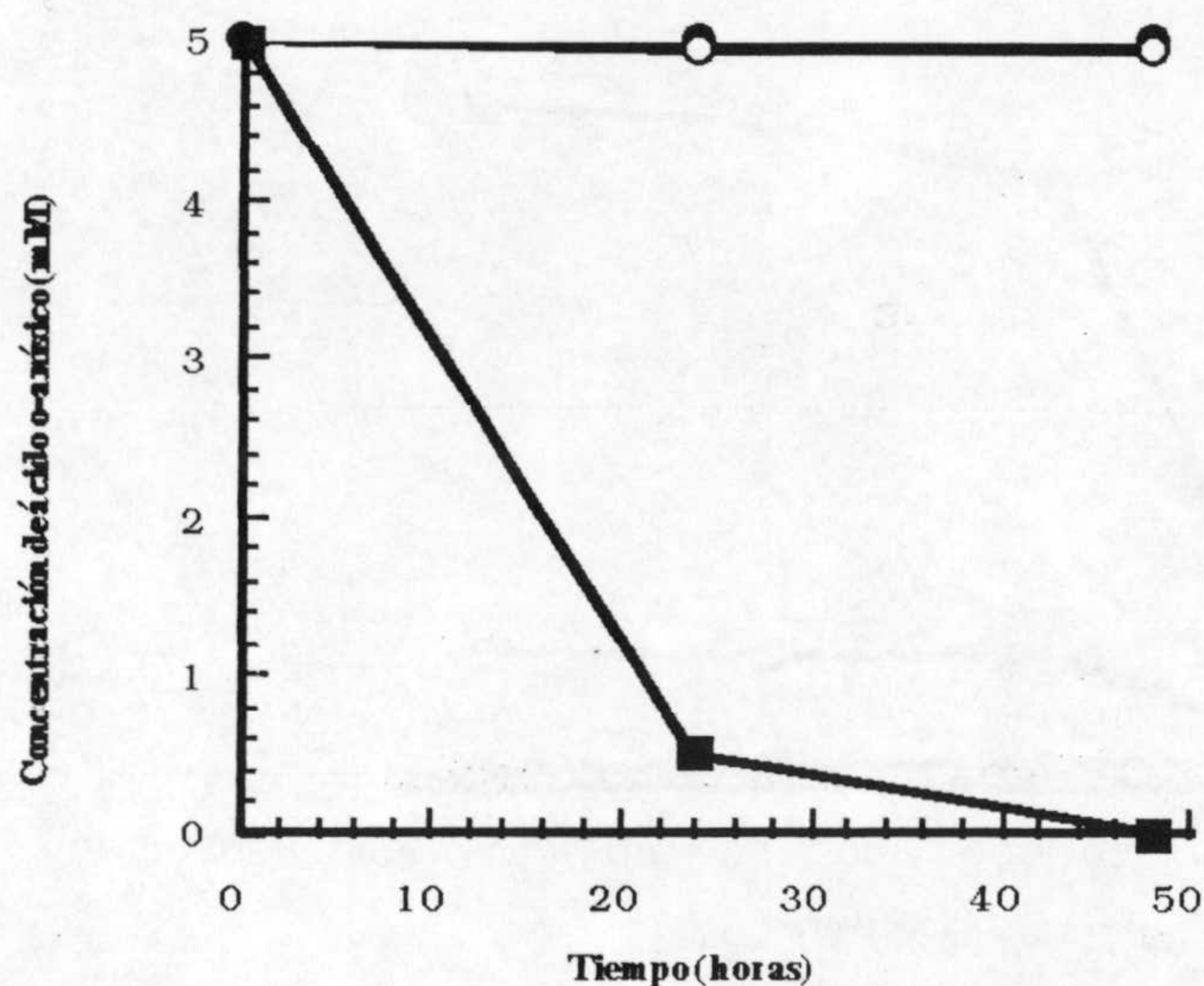


Figura R.5.17. Consumo de ácido *o*-anísico por DAO4, DAO4-A y DAO4-B en cultivos líquidos utilizando ácido *o*-anísico como fuente de carbono en una concentración 5 mM. DAO4 (■), DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

Estos ensayos sugieren que los microorganismos responsables de la degradación del ácido *o*-anísico es el consorcio bacteriano constituido por *Pantoea agglomerans* (Gram negativa, grande y amarilla) y *Arthrobacter oxydans* (gram positiva, pequeña y blanca) y que cada una de estas cepas aisladas no es capaz de utilizar ácido *o*-anísico como fuente de carbono y energía.

R.5.4.3. PAPEL DE CADA UNA DE LAS BACTERIAS COMPONENTES DEL CONSORCIO BACTERIANO

Con objeto de estudiar cómo actúa cada una de las bacterias dentro de esta asociación, o sea cual de ellas es la responsable de la degradación de cada uno de los compuestos que intervienen en la ruta o si alguna se encarga de eliminar algún producto tóxico o inhibidor de la otra cepa o si realiza algún aporte energético, etc., se realizaron una serie de ensayos utilizando como fuente de carbono cada uno de los compuestos intermedios que ya hemos visto que aparecen en la ruta catabólica.

En primer lugar se comprobó si alguna de estas cepas era capaz de utilizar alguno de los compuestos intermediarios de la ruta como fuente de carbono. Para ello se sembraron en cultivos líquidos cada una de ellas, y el consorcio utilizando como fuente de carbono los ácidos intermediarios de esta ruta sin y con aporte de glucosa, o sea, ácido salicílico a una concentración 5 mM sin y con aporte de glucosa en un 0,05% (p/v) y ácido gentísico también a una concentración 5 mM sin y con aporte de 0,05% (p/v) de glucosa. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras R.5.18., R.5.19., R.5.20. y R.5.21.

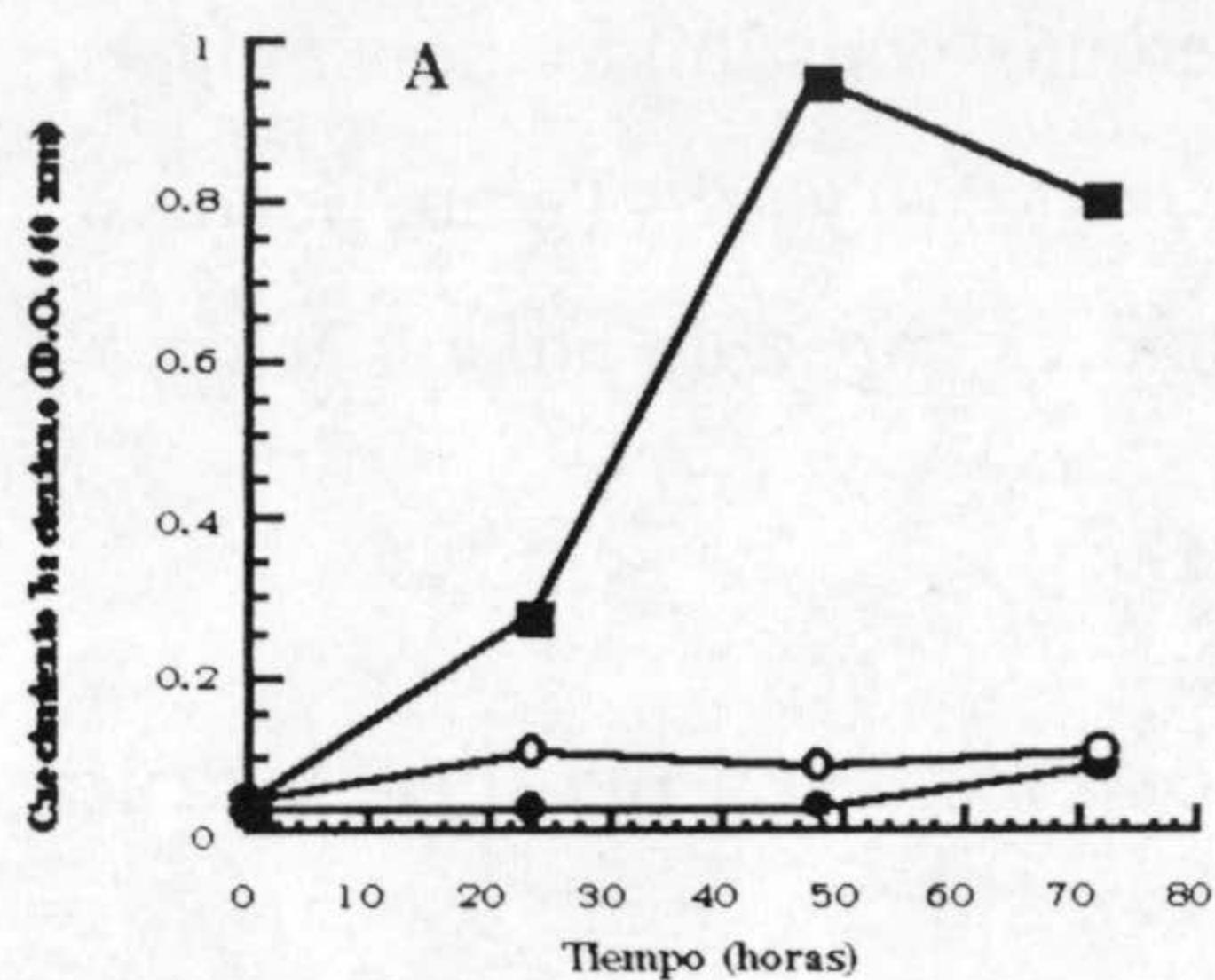


Figura R.5.18. Crecimiento bacteriano del consorcio DAO4, y cada una de las cepas componentes del mismo por separado, DAO4-A y DAO4-B en cultivos líquidos de medio mínimo M9 con ácido salicílico 5 mM como fuente de carbono. A los tiempos indicados se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm. DAO4 (■), DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

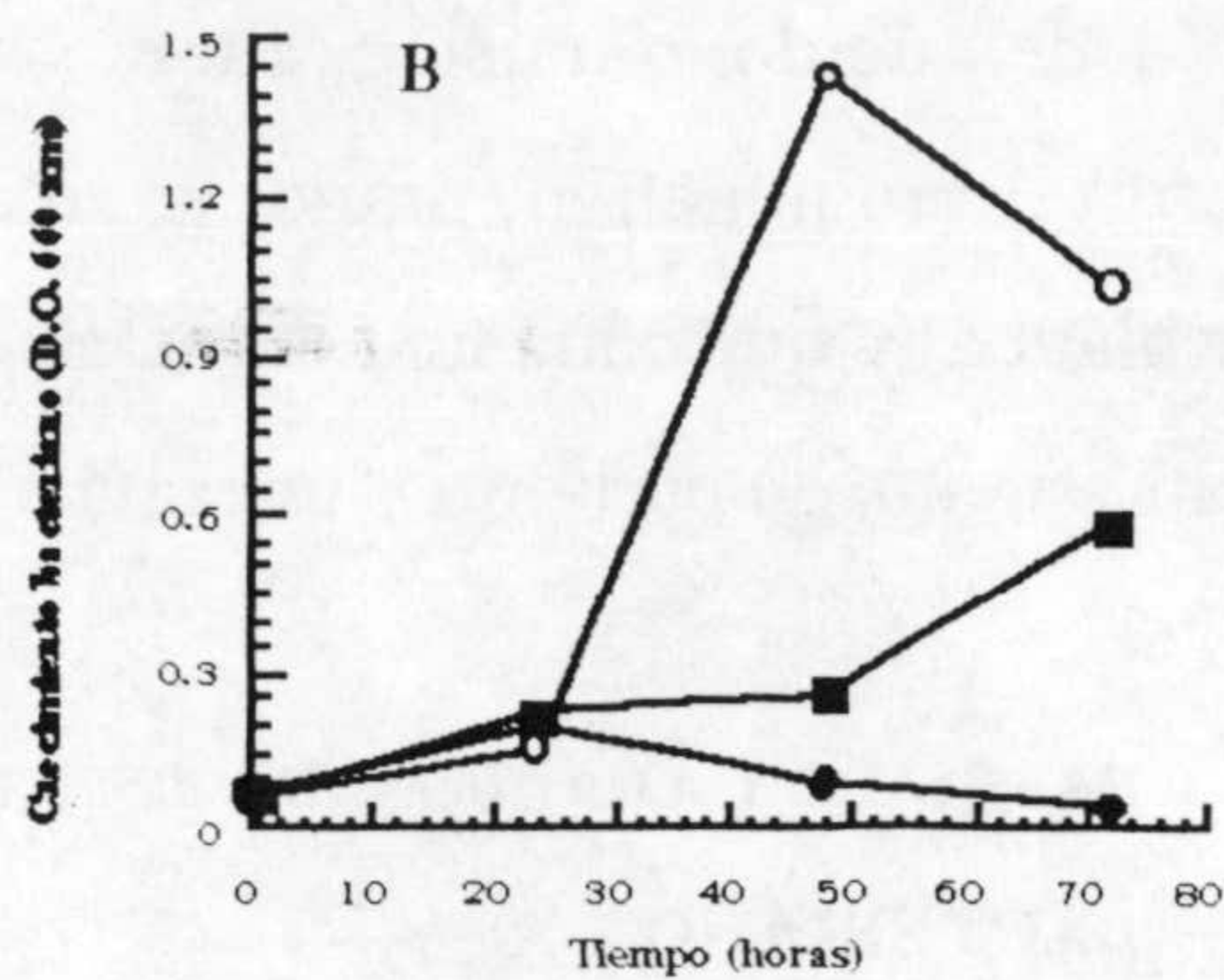


Figura R.5.19. Crecimiento bacteriano del consorcio DAO4, y cada una de las cepas componentes del mismo por separado, DAO4-A y DAO4-B en cultivos líquidos de medio mínimo M9 con ácido salicílico 5 mM como fuente de carbono y un complemento de 0,05% (p/v) de glucosa. A los tiempos indicados se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm. DAO4 (■), DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

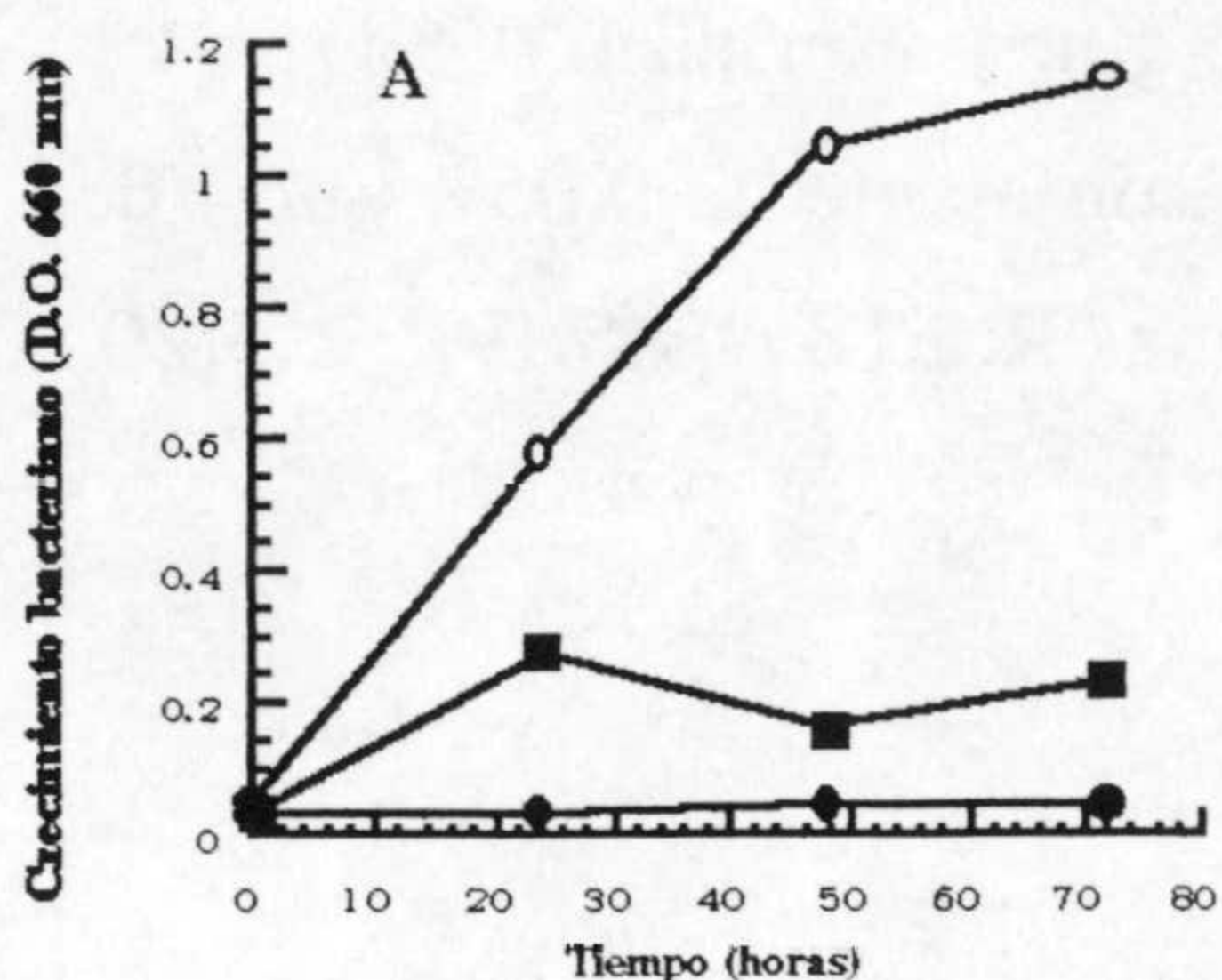


Figura R.5.20. Crecimiento bacteriano del consorcio DAO4, y cada una de las cepas componentes del mismo por separado, DAO4-A y DAO4-B en cultivos líquidos de medio mínimo M9 con ácido gentísico 5 mM como fuente de carbono. A los tiempos indicados se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm. DAO4 (■), DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

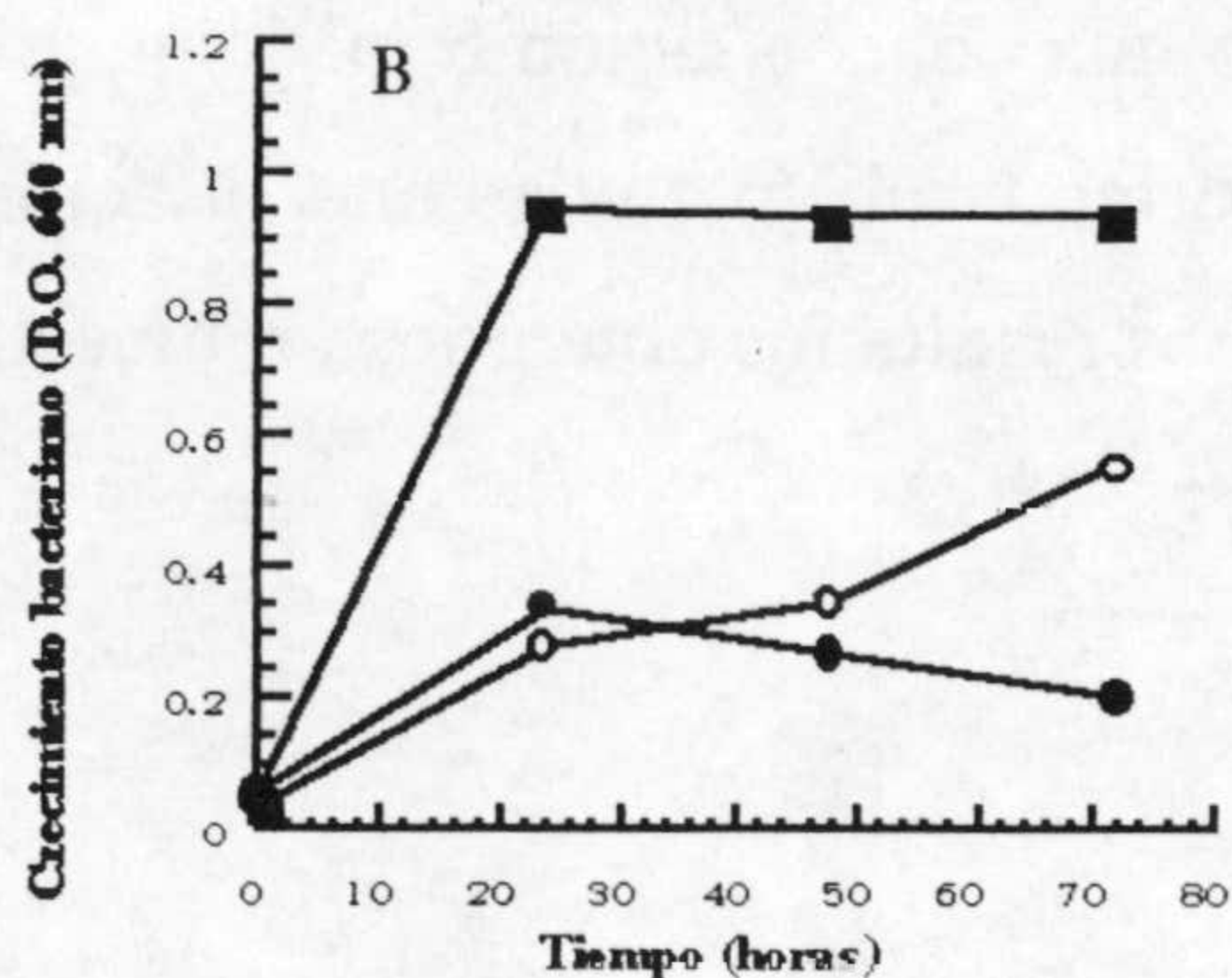


Figura R.5.21. Crecimiento bacteriano del consorcio DAO4, y cada una de las cepas componentes del mismo por separado, DAO4-A y DAO4-B en cultivos líquidos de medio mínimo M9 con ácido gentísico 5 mM como fuente de carbono y un complemento de 0,05% (p/v) de glucosa. A los tiempos indicados se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm. DAO4 (■), DAO4-A (●) y DAO4-B (○).

En los cuatro casos el consorcio bacteriano es capaz de utilizar ambos ácidos como fuente de carbono. Se pueden observar ciertas diferencias respecto al crecimiento de la bacteria DAO4-B (*Arthrobacter oxydans*) y la bacteria DAO4-A (*Pantoea agglomerans*); es la primera la que experimentó mayor crecimiento en cualquiera de los dos casos aunque sin el complemento de 0,05% (p/v) de glucosa creció mejor en ácido gentísico, mientras que con el complemento del 0,05% (p/v) de glucosa lo hizo mejor en ácido salicílico.

Respecto a la degradación de la fuente de carbono, tanto en el caso del ácido salicílico como del ácido gentísico, hubo consumo de dichos ácidos por parte del consorcio DAO4 y de la bacteria DAO4-B (*Arthrobacter oxydans*) y este consumo está en consonancia con el crecimiento que experimentaron estas cepas. Respecto a la bacteria DAO4-A (*Pantoea agglomerans*) con ácido salicílico no hubo consumo, luego el crecimiento que experimentó esta bacteria a las 24 horas es debido al aporte de glucosa; mientras que en ácido gentísico se observó un ligero consumo durante las primeras 24 horas, esto es debido a que aunque esta cepa crece principalmente a expensas del aporte de glucosa, también consume algo de este ácido ya que el valor de su D.O. a 660 nm a las 24 horas es casi el doble que con cualquiera de las otras dos fuentes de carbono.

En la figura R.5.22. se muestran los resultados obtenidos con respecto al consumo de ácido gentísico.

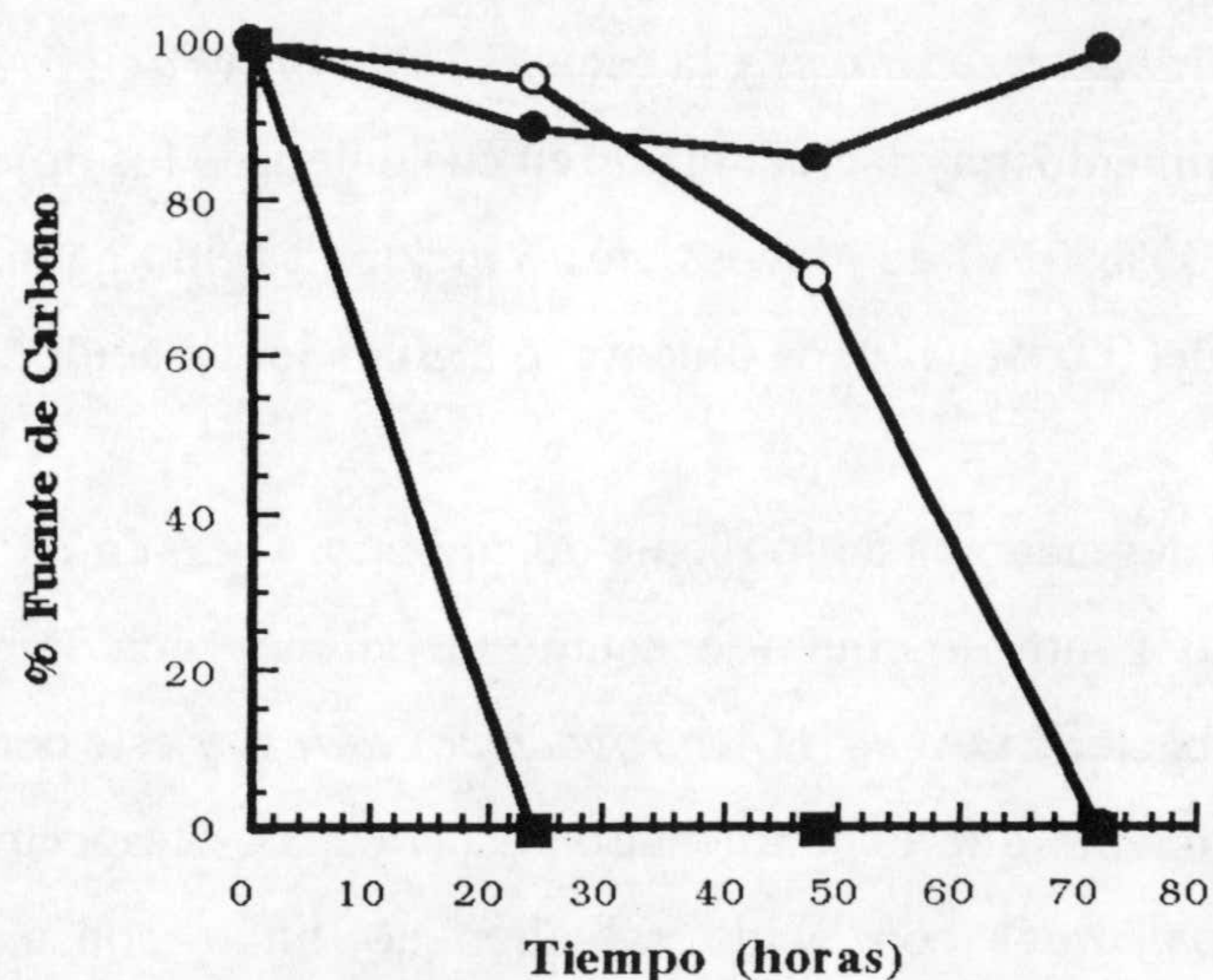


Figura R.5.22. Consumo de ac. gentísico por DAO4 (■), DAO4-A (●) y DAO4-B (○) en medio de cultivo líquido, utilizando ácido gentísico a una concentración 5 mM y glucosa al 0,05 % como fuente de carbono. A los tiempos indicados se determinó la concentración relativa de fuente de carbono, expresada en % mediante análisis por HPLC a 230 nm.

Los resultados anteriores sugieren que DAO4-B (*Arthrobacter oxydans*) es la bacteria que juega un papel más activo en la ruta catabólica del ácido *o*-anísico, sobre todo en la degradación del ácido salicílico y ácido gentísico.

En otra serie de ensayos se partieron de preinóculos dos de DAO4, DAO4-A y DAO4-B con ácido *o*-anísico 5 mM y glucosa al 0,05% (p/v) y con 5 mM de ácido salicílico y glucosa al 0,05% (p/v). Los cultivos se transfirieron a medio con 0,5 mM de dicamba y 0,05% (p/v) de glucosa y cada 24 horas se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm y la biotransformación de dicamba mediante análisis por HPLC a 230 nm. Los resultados obtenidos fueron que ni DAO4-A ni DAO4-B aisladas eran capaces de biotransformar dicamba; mientras que con el consorcio DAO4 sí tuvo lugar dicha biotransformación.

Estos experimentos sugieren que *Arthrobacter oxydans* es la que continúa la degradación de los productos intermedios de la ruta aunque aún no está claro cual de las dos bacterias es la que inicia la degradación del ácido *o*-anísico.

R.5.4.4. PROPORCIÓN EN LA QUE SE ENCUENTRAN DAO4-A Y DAO4-B EN EL CONSORCIO BACTERIANO

Además de conocer el papel de cada una de estas cepas dentro del consorcio bacteriano, es interesante también saber en qué proporción deben estar cada una de ellas dentro del mismo para que puedan degradar el ácido *o*-anísico, y si esta proporción es importante o influye en la degradación. Con este objeto se realizaron una serie de ensayos.

El primero de ellos consistió en partir de un preinóculo de DAO4 en ácido *o*-anísico 5 mM, con glucosa al 0,05% (p/v) y tras 24 horas de incubación a 30°C, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con 1 x M9 y se inocularon cultivos líquidos en los que se utilizó como fuente de carbono ácido *o*-anísico, ácido salicílico y ácido gentísico a concentración 5 mM. Se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm y se sembraron diluciones seriadas en placas de LB para conocer la variación en la relación de DAO4-A respecto a DAO4-B mediante conteo de ufc/ml. Además estos medios de cultivo también se analizaron por HPLC para determinar el consumo de las fuentes de carbono utilizadas. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras R.5.23., R.5.24.

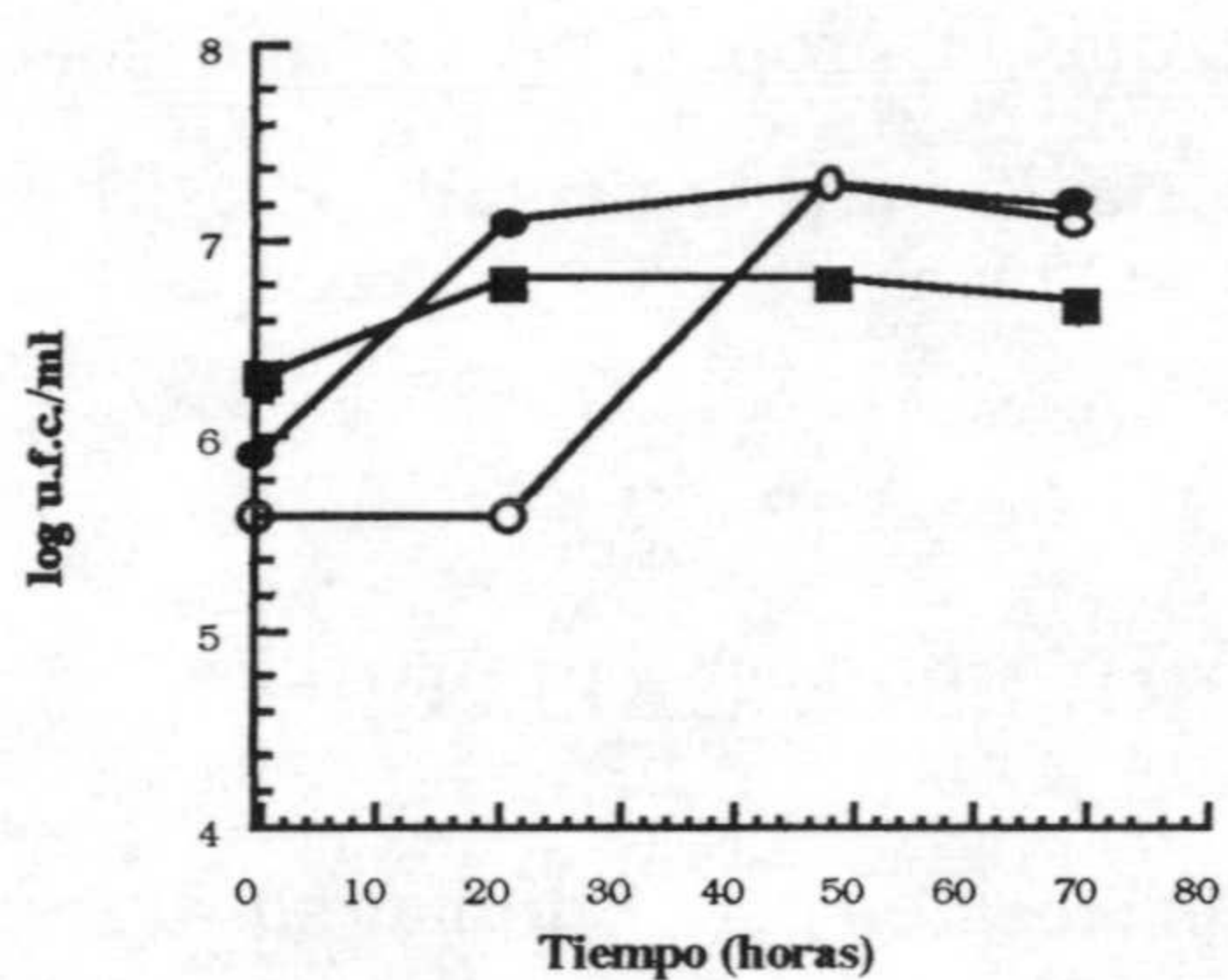


Figura R.5.23. Crecimiento bacteriano de DAO4-A (*Pantoea agglomerans*) en cultivos líquidos de medio mínimo M9 con ácido *o*-anísico 5 mM (●), ácido salicílico 5 mM (○) y ácido gentísico 5 mM (■). A los tiempos indicados se sembraron diluciones seriadas en placas de LB y tras conteo de las bacterias amarillas los resultados obtenidos se expresan en log ufc/ml.

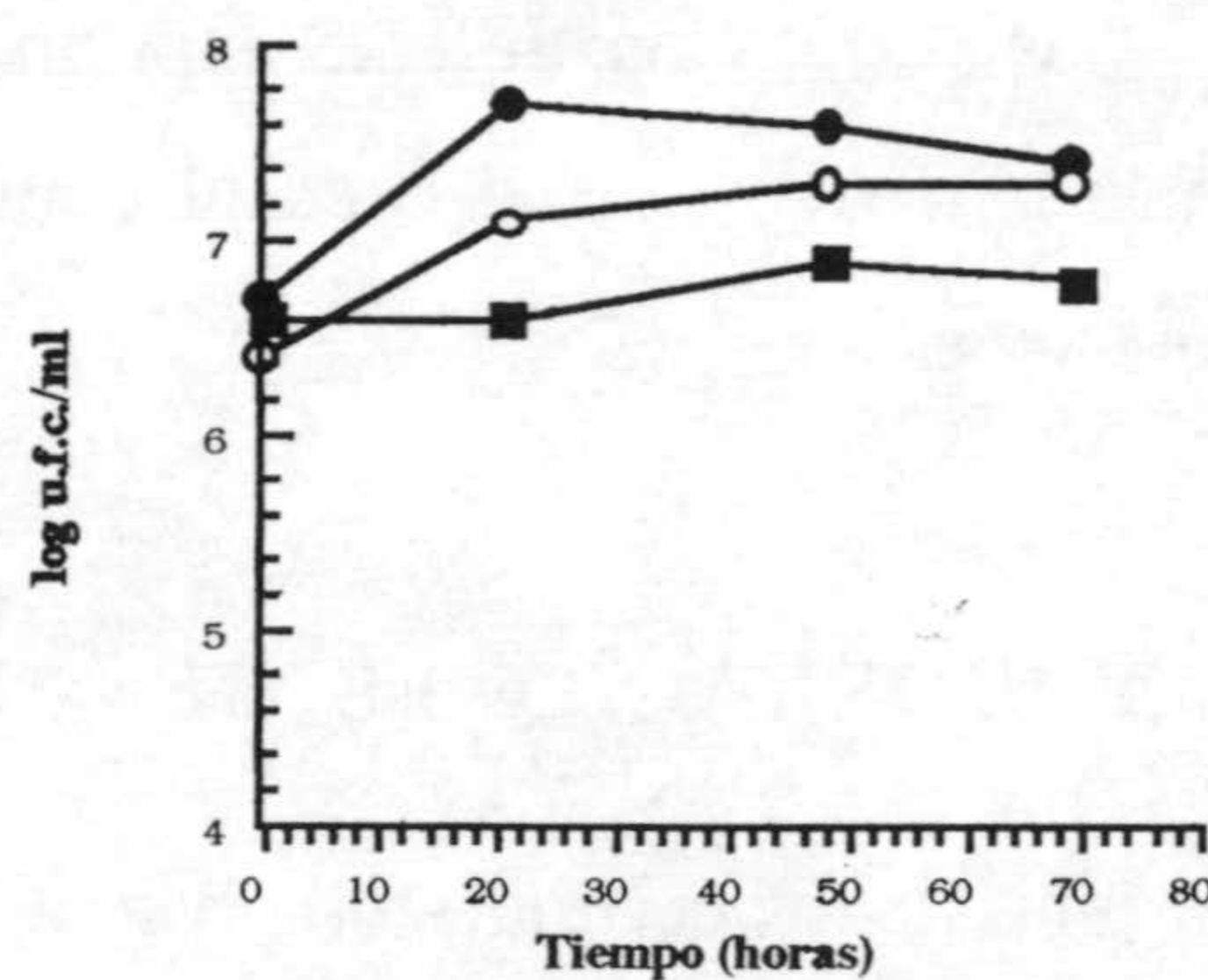


Figura R.5.24. Crecimiento bacteriano de DAO4-B (*Arthrobacter oxydans*) en cultivos líquidos de medio mínimo M9 con ácido *o*-anísico 5 mM (●), ácido salicílico 5 mM (○) y ácido gentísico 5 mM (■). A los tiempos indicados se sembraron diluciones seriadas en placas de LB y tras conteo de las bacterias blancas los resultados obtenidos se expresan en log ufc/ml.

Los resultados respecto a la proporción de DAO4-A y DAO4-B obtenidos tras el conteo de ufc/ml de DAO4-A y DAO4-B respectivamente se muestran en la tabla R.5.4.

Tabla R.5.4. Proporción de DAO4-A y DAO4-B (*Pantoea agglomerans* / *Arthrobacter oxydans*) con el tiempo en diferentes fuentes de carbono, expresada como ufc/ml de DAO4-A / ufc/ml de DAO4-B.

Tiempo (horas)	Fuentes de Carbono 5 mM		
	Ac. o-anísico	Ac. salicílico	Ac. gentísico
0	8 x 10 ⁵ / 46 x 10 ⁵ [1/5,75] (0,061)	4 x 10 ⁵ / 25 x 10 ⁵ [1/6,25] (0,062)	20 x 10 ⁵ / 37 x 10 ⁵ [1/1,85] (0,078)
21	128 x 10 ⁵ / 461 x 10 ⁵ [1/3,6] (1,296)	4 x 10 ⁵ / 123 x 10 ⁵ [1/28] (0,221)	58 x 10 ⁵ / 42 x 10 ⁵ [1/0,7] (0,151)
48	188 x 10 ⁵ / 409 x 10 ⁵ [1/2,2] (1,081)	190 x 10 ⁵ / 205 x 10 ⁵ [1/1,1] (0,785)	64 x 10 ⁵ / 86 x 10 ⁵ [1/1,3] (0,092)
69	158 x 10 ⁵ / 284 x 10 ⁵ [1/1,8] (1,075)	132 x 10 ⁵ / 191 x 10 ⁵ [1/1,4] (0,796)	52 x 10 ⁵ / 68 x 10 ⁵ [1/1,3] (0,348)

Dato numérico: ufc/ml de DAO4-A / ufc/ml DAO4-B

[]: Proporción de DAO-A/DAO4-B

(): medida de la turbidez de los cultivos a 660 nm a los tiempos indicados

Las proporciones con las tres fuentes de carbono siguen la misma tendencia; en un principio hay mayor proporción de DAO4-B que de DAO4-A y con el tiempo tienden a igualarse estas proporciones.

Los resultados de este experimento sugieren que la proporción en que se encuentren DAO4-A y DAO4-B en el consorcio es importante para la degradación del ácido o-anísico.

R.5.5. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE ESTE CAPÍTULO

Uno de los compuestos presentes en el alpechín elegidos para estudiar su ruta de degradación ha sido el ácido o-anísico (ácido o-metoxibenzoico). La aproximación experimental ha consistido en aislar microorganismos que degraden este compuesto lo que ha conducido al aislamiento de las cepas DAO1, DAO2 y DAO3 junto con el consorcio DAO4. Las cepas DAO1, DAO2 y DAO3 pertenecen al género *Arthrobacter* y probablemente a la especie *oxydans*, mientras que una de las cepas del consorcio DAO4 también era *Arthrobacter oxydans* y otra cepa se ha clasificado como *Pantoea*

agglomerans. En cualquiera de los cuatro casos la ruta catabólica parece idéntica y se muestra en la figura R.5.25.

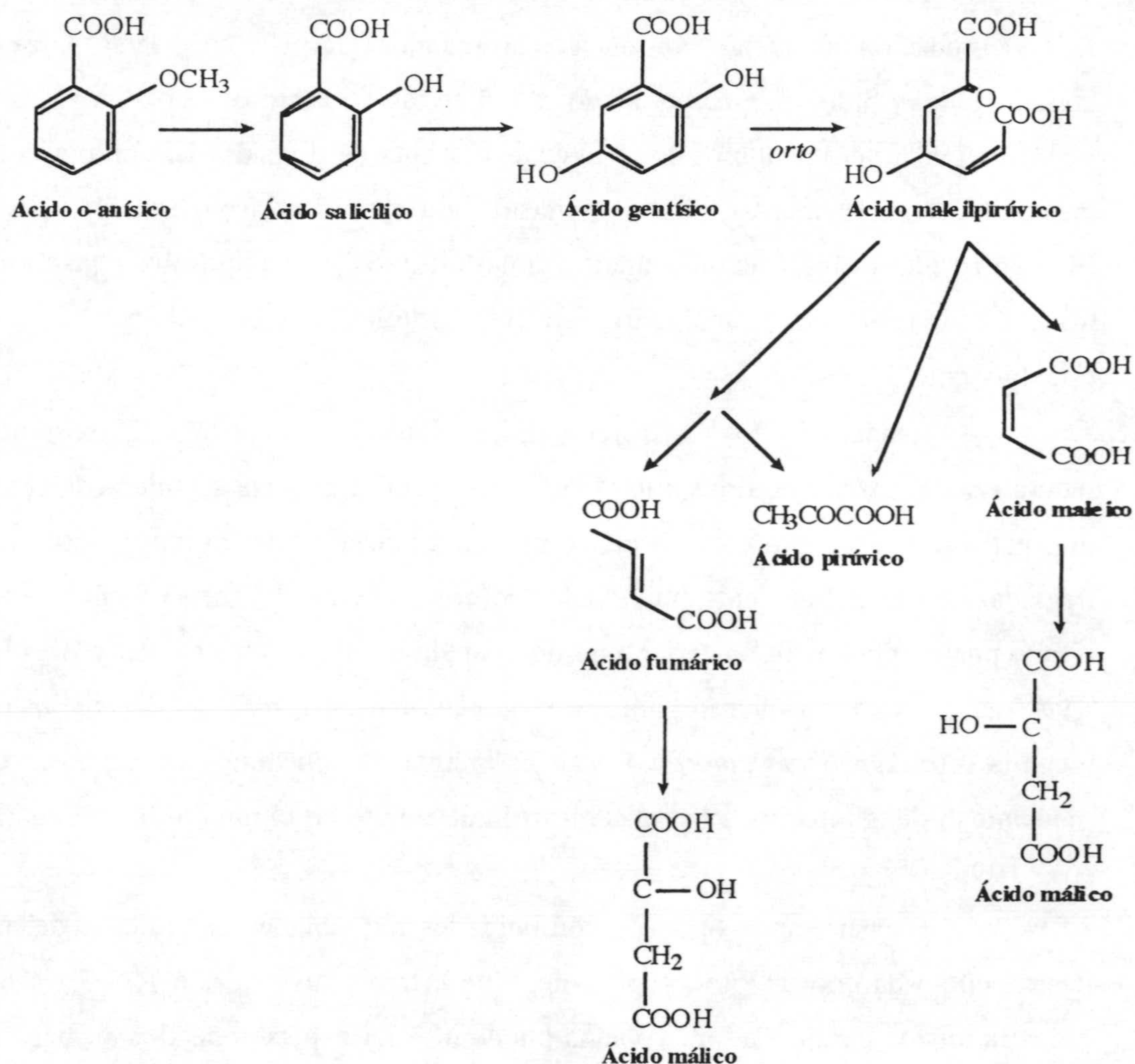


Figura R.5.25. Esquema de la posible ruta catabólica que podría seguir la degradación del ácido *o*-anísico.

El primer paso de la ruta, la *o*-demetilación por una demetilasa, es un paso común en las rutas metabólicas de derivados metoxilados de ácido benzoico, dando lugar al derivado hidroxilado, como en el caso de los ácidos vanílico y siríngico por la cepa *Pseudomonas* sp. ATCC 19151, *Pseudomonas aeruginosa* y *Sphingomonas paucimobilis* y los ácidos *m*- y *p*-metoxibenzoico y verátrico por la cepa *Pseudomonas testosteroni* (Nishikawa y col., 1998; Ribbons, 1971).

El producto resultante de la *o*-demetilación e hidroxilación del ácido *o*-anísico es el ácido salicílico, éste se ha descrito que bien se puede hidroxilar y descarboxilar a catecol mediante la salicilato hidroxilasa (Arunachalam y col., 1992) o se puede hidroxilar

en posición 5 dando lugar al ácido gentísico. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados muestran que la ruta a seguir es la del ácido gentísico.

El ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) es un producto intermedio en la biodegradación de muchos compuestos aromáticos (Harpel y col., 1996) tales como *m*-cresol, ácido *m*-hidroxibenzoico, ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), etc. El ácido gentísico puede ser metabolizado a través de una ruta de división del anillo aromático por una dioxigenasa (gentisato 1,2-dioxigenasa) para formar el ácido maleilpirúvico que, o bien sufre una isomerización a ácido fumarilpirúvico y una hidrólisis posterior dando lugar a ácido fumárico y a ácido pirúvico, o se hidroliza a ácido maleico y ácido pirúvico (Bayly y col., 1996).

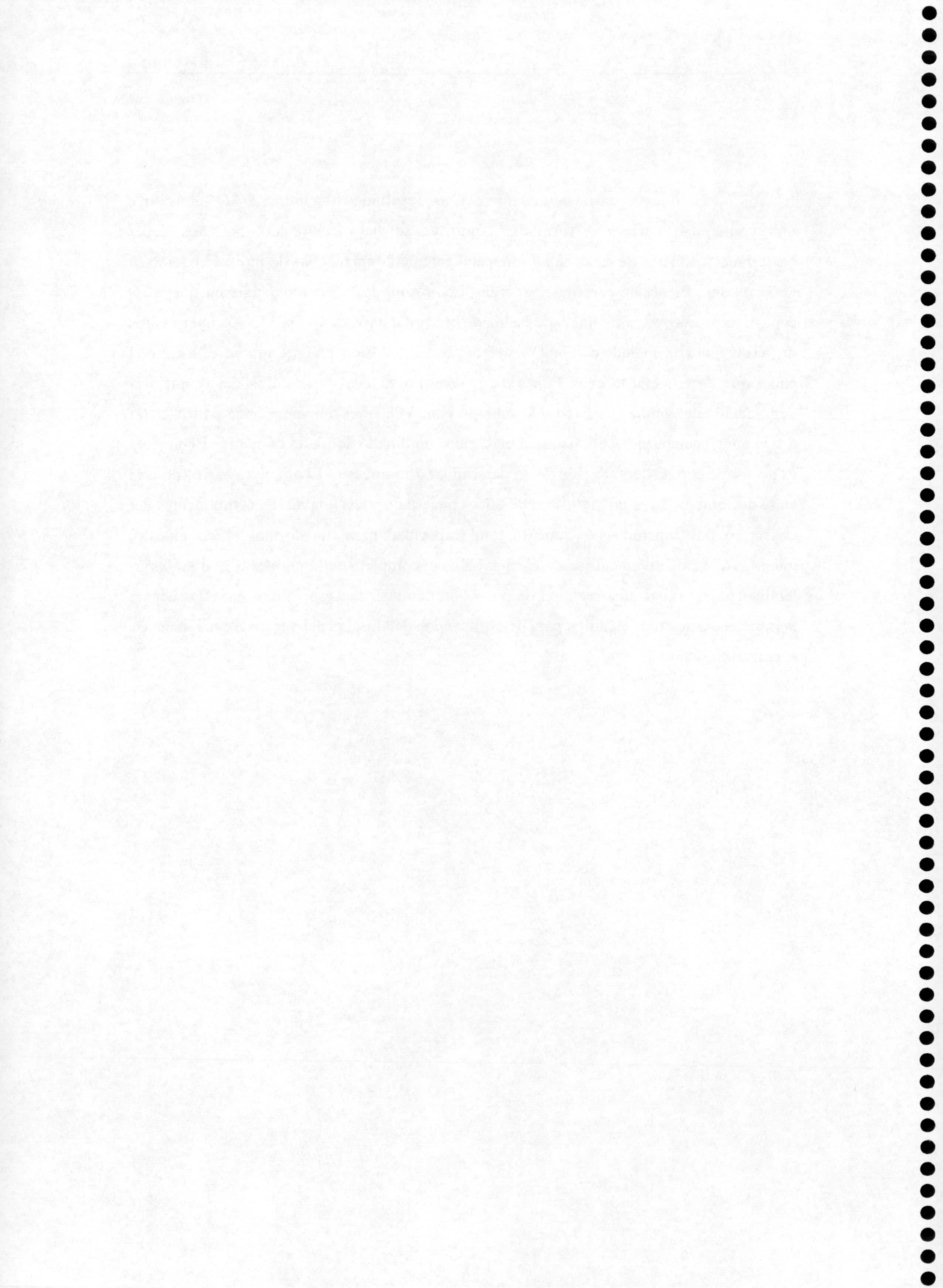
Respecto a los consorcios microbianos, es conocida la existencia en la naturaleza de mezclas de flora microbiana existiendo una serie de interacciones entre los más próximos. En algunos casos las comunidades aisladas tienen mayor éxito frente a la degradación que poblaciones individuales como es el caso del metabolismo de ésteres de nitrato por un consorcio bacteriano de dos bacterias, *Arthrobacter ilicis* y *Agrobacterium radiobacter*, donde el microorganismo degradador es *Arthrobacter ilicis* y el papel que juega la cepa *Agrobacterium radiobacter* es facilitar la mineralización del éster de nitrato mediante la disminución de la concentración de nitrato en el medio de cultivo (Ramos y col., 1996).

Existen varios tipos de comunidades microbianas en función del papel que desempeñe cada uno de los componentes que la constituye (Tabla R.5.5.), en algunos casos la misma comunidad microbiana puede mostrar aspectos de dos o más categorías (Slater y col., 1996).

Tabla R.5.5. Tipos de comunidades microbianas

- 1 Interacciones basadas en la provisión de nutrientes específicos
 - 2 Interacciones basadas en la eliminación de productos inhibidores del crecimiento
 - 3 Interacciones basadas en la modificación de parámetros del crecimiento básicos del organismo individual.
 - 4 Interacciones basadas en ataque metabólico combinado (concertado)
 - 5 Interacciones basadas en cometabolismo
 - 6 Interacciones basadas en transferencia de hidrógeno (o electrones)
 - 7 Interacciones basadas en la presencia de más de un consumidor primario de sustrato
-

En nuestro caso, de acuerdo con los resultados obtenidos, DAO4 constituye una comunidad bacteriana formada, como ya se ha mencionado, por dos cepas bacterianas; cada una de estas cepas independientemente era incapaz de utilizar el ácido *o*-anísico como fuente de carbono y energía. Los resultados obtenidos sugieren que es la cepa *Arthrobacter oxydans* la responsable de la degradación de los productos intermedios de la ruta una vez iniciado el metabolismo del ácido *o*-anísico, aunque aún no está claro el papel que desempeña la cepa *Pantoea agglomerans* ni cual de las dos cepas inicia la degradación del ácido *o*-anísico. De acuerdo con la clasificación anterior se podría tratar de interacciones basadas en ataque metabólico combinado donde la comunidad completa es necesaria para la degradación de un determinado compuesto. El principio básico de esta clase de comunidad es un ataque metabólico concertado, cada una de las componentes del consorcio por separado no tiene la total capacidad para transformar el compuesto, mientras que colectivamente se da el metabolismo completo del compuesto. Sin embargo también puede existir una relación de provisión de nutrientes específicos entre las cepas. Serían necesarios más estudios para determinar con detalle el papel que cada cepa juega en el consorcio.



R.6. CATABOLISMO DEL ÁCIDO *p*-HIDROXIFENIL-ACÉTICO

En el alpechín hay una gran variedad de compuestos químicos aromáticos que presentan como sustituyentes grupos hidroxilo, ácido y metoxilo. Se conoce un gran número de microorganismos que son capaces de utilizar compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía (Van der Meer y col., 1992). En esta sección se describen nuestros estudios sobre las rutas catabólicas para la degradación del ácido *p*-hidroxifenilacético, un compuesto típico del alpechín (Balice, V. y col., 1984).

En este caso se pretendía comenzar a estudiar la biodiversidad de los genes implicados en la degradación de este compuesto, ya que desde el punto de vista bioquímico esta ruta catabólica está bien caracterizada en diversas bacterias gram negativas (Figura R.6.1.) (Cooper, R. A. y col., 1980). Asimismo, la organización genética de esta ruta se ha elucidado en *E. coli* (Prieto y col., 1996).

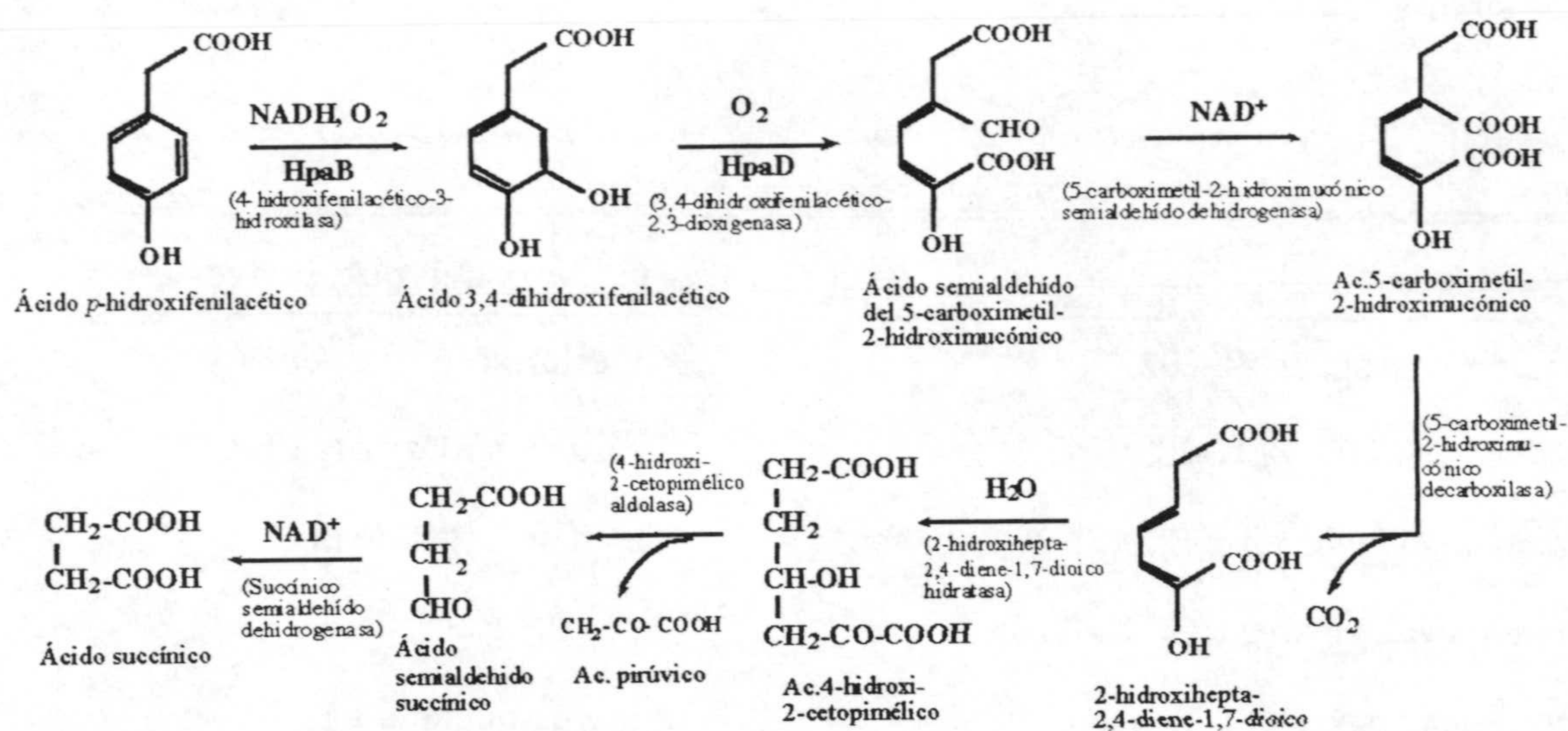


Figura R.6.1. Ruta catabólica para la degradación del ácido *p*-hidroxifenilacético en *E. coli*.

María Auxiliadora Prieto del Departamento de Microbiología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid nos cedió dos sondas correspondientes al gen que codifica el enzima *p*-hidroxifenilacético hidroxilasa en el

plásmido pAJ221 (*hpaB*) (Prieto y col., 1993), y un fragmento de ADN de 6 kb que contiene el gen que codifica el enzima 3,4-dihidroxifenilacético-2,3-dioxigenasa (*hpaD*) (Prieto y col., 1996) (ver sección de Materiales y Métodos B.7.). Los productos de estos genes están implicados en los dos primeros pasos de esta ruta catabólica (Figura R.6.1.).

R.6.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CAPACES DE UTILIZAR ÁCIDO *p*-HIDROXIFENILACÉTICO COMO FUENTE DE CARBONO

Con el objeto de aislar microorganismos que fueran capaces de utilizar ácido *p*-hidroxifenilacético como fuente de carbono se realizaron una serie de enriquecimientos como se describió en la Sección B.4. de Materiales y Métodos y cuyos resultados se muestran en la Sección R.6. de Resultados. Se aislaron 60 cepas diferentes que fueron capaces de utilizar ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono. La tabla R.6.1. relaciona las cepas identificadas taxonómicamente y utilizadas en este estudio, así como su origen de procedencia.

Tabla R.6.1. Estirpes bacterianas capaces de utilizar ácido *p*-hidroxifenilacético como fuente de carbono y energía utilizadas en el estudio de la ruta catabólica de este compuesto.

Organismo	Sustrato del que procede
<i>Acinetobacter</i> sp. DOT-202	Alpechín seco
<i>Bacillus circulans</i> DOT-203	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Enterobacter agglomerans</i> DOT-204	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Enterobacter agglomerans</i> DOT-205	Agua de depuradora
<i>Enterobacter</i> sp. DOT-206	Agua de depuradora
<i>Erwinia</i> sp. DOT-207	Agua de depuradora
<i>Escherichia coli</i> DOT-208	Agua de depuradora
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> DOT-209	Agua de depuradora
<i>Klebsiella oxytoca</i> DOT-210	Tierra de jardín de la EEZ

Cont.

Continuación de Tabla 1

<i>Klebsiella oxytoca</i> DOT-211	Agua de puradora
<i>Nocardia asteroides</i> GC DOT-212 (subgrupo B)	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DOT-213	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-214 (biotipo A)	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-215 (biotipo A)	Alpechín seco
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-216	Agua de depuradora
<i>Pseudomonas</i> sp. DOT-217	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Pseudomonas</i> sp. DOT-218	Alpechín seco
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DOT-219	Tierra de jardín de la EEZ
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> DOT-220	Agua de depuradora

R. 6. 2. HIBRIDACIÓN EN "SOUTHERN" PARA LOCALIZAR GENES DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO *p*-HIDROXIFENILACÉTICO

El aislamiento de ADN total de las cepas citadas en la Tabla R.6.1. se llevó a cabo siguiendo los dos métodos indicados en las Secciones B.9.1. y B.9.2. de Materiales y Métodos. El ADN se digirió con *EcoRI*, y tras su separación electroforética se transfirió a membranas de nylon como se describió en Materiales y Métodos.

Como sondas se utilizaron los genes *hpaB* y *hpaD* (Figura 2). El gen *hpaB* se extrajo del plásmido pAJ221 como un fragmento *HindIII-EcoRV* de 1,6 kb (ver figura 1 de la Sección B.7. de Materiales y Métodos), mientras que el gen *hpaD* se extrajo como un fragmento *BamHI* de 6 kb del plásmido pHCB1 (ver figura R.6.2. de la Sección B.7. de Materiales y Métodos). Estos fragmentos se marcaron con dioxigenina y se hibridaron bajo condiciones relajadas como se describió en Materiales y Métodos.



Figura R.6.2. Gel de agarosa correspondiente a la digestión de los plásmidos pAJ221 de 6,7 Kb y el plásmido pHCB1 de 8,7 Kb con las enzimas de restricción correspondientes en cada caso. Calle 1: marcador de peso molecular correspondiente a la digestión del fago lambda (λ) con el enzima de restricción *Hind*III. Calle 2: digestión del plásmido pAJ221 con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RV. Calle 3: digestión del plásmido pHCB1 con la enzima de restricción *Bam*HI.

La hibridación de los ADNs digeridos con cada una de las sondas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la Sección de Materiales y Métodos B.11.

En todos los casos se utilizó como control positivo el mismo fragmento de ADN empleado para hibridar, y como control negativo la cepa *Pseudomonas putida* 2440.

R.6.2.1. HIBRIDACIÓN CON *hpaB*

Sólo las cepas *Enterobacter agglomerans* DOT-204, *Pseudomonas putida* DOT-216 y *Pseudomonas* sp. DOT-217 mostraron hibridación en condiciones relajadas con el gen *hpaB* de *E. coli*. *Enterobacter agglomerans* DOT-204 y *Pseudomonas putida* DOT-216 mostraron dos bandas de 3 y 9 kb mientras que *Pseudomonas* sp. DOT-217 presentó una sola banda alrededor de 9 kb. Todas las bandas eran muy tenues por lo que no se llevó a cabo la hibridación en condiciones estrictas. En la figura R.6.3. se muestran los resultados obtenidos.

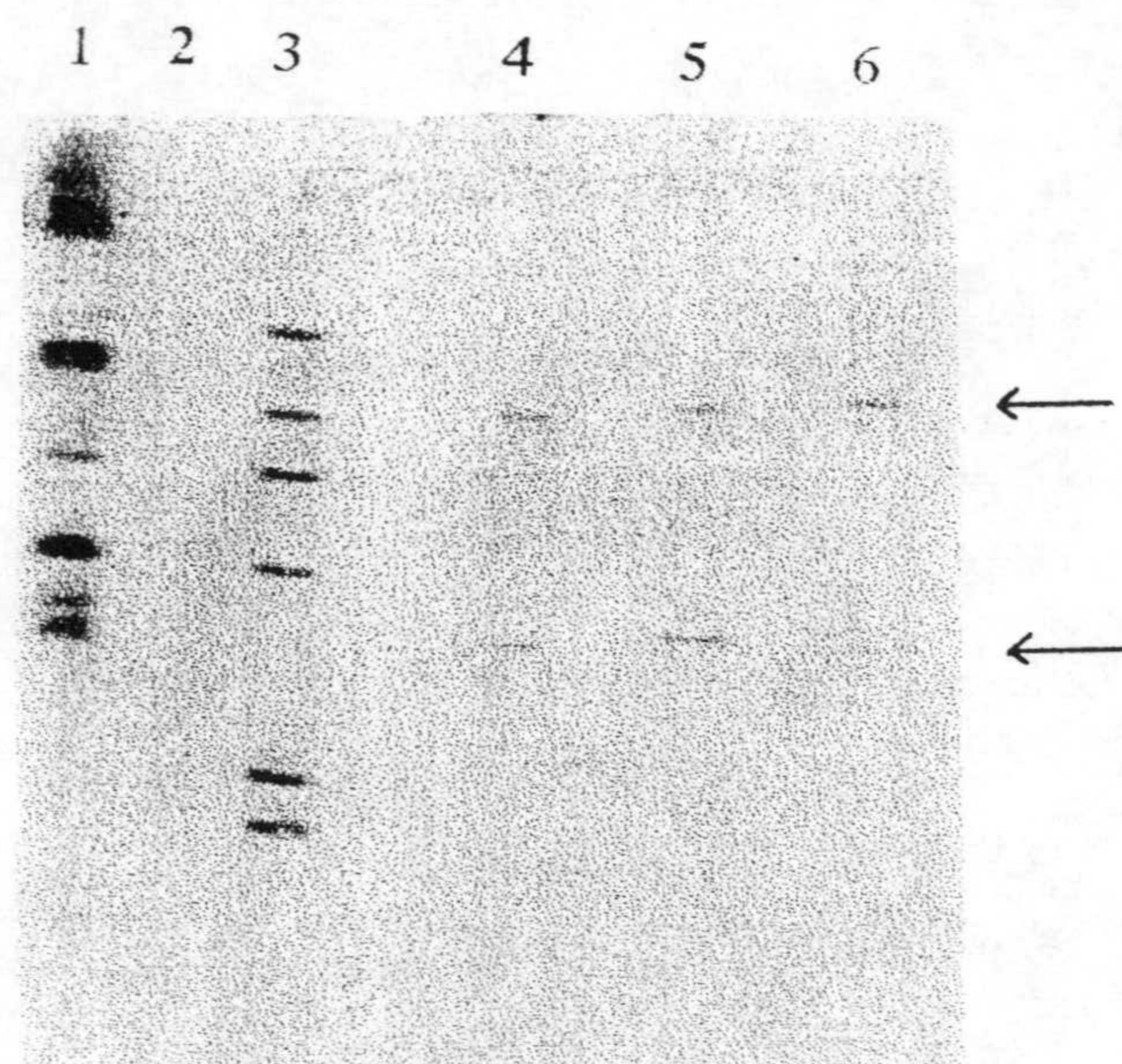


Figura R.6.3. Membrana de hibridación en condiciones relajadas (42°C y 30% (vol/vol) formamida) de las cepas citadas en la tabla R.6.1 con la sonda correspondiente al gen *hpaB*. Calle 1: control positivo que en este caso se trata del plásmido pAJ221. Calle 2: control negativo que es ADN de la cepa *Pseudomonas putida* 2440. Calle 3: marcador de peso molecular correspondiente a la digestión del fago lambda (λ) con la enzima de restricción *Hind*III. Calle 4: *Enterobacter agglomerans* DOT-204. Calle 5, *Pseudomonas putida* DOT-216. Calle 6: *Pseudomonas* sp. DOT-217.

R.6.2.2. HIBRIDACIÓN CON *hpaD*

El gen de la dioxigenasa *hpaD* de *E. coli* se utilizó como sonda contra ADN total de las cepas relacionadas en la Tabla R.6.1. Se observó que aparecieron bandas específicas en *Flavimonas oryzihabitans* DOT-209, *Enterobacter agglomerans* DOT-205, que presentaron dos bandas de alrededor de 4 y 3,8 kb. En la cepa *Sphingomonas paucimobilis* DOT-220 se detectó una banda de hibridación que pareció muy tenue y alrededor de 9 kb. *Acinetobacter* sp. DOT 202, *Bacillus circulans* DOT-203, *Erwinia* DOT-207, *Escherichia coli* DOT-208, *Klebsiella oxytoca* DOT-210 y *Pseudomonas putida* DOT-216 presentaron bandas de hibridación tenues. En el caso de *Enterobacter* sp. DOT-206, *Klebsiella oxytoca* DOT-211, *Pseudomonas fluorescens* DOT-213, *Pseudomonas putida* biotipo A DOT-214, *Pseudomonas putida* biotipo A DOT-215, *Pseudomonas* sp. DOT-217, *Rhodococcus rhodochrous* DOT-219 y *Pseudomonas* DOT-218, también se observó hibridación. En la figura R.6.4. se muestra la membrana en la que se presentan los resultados obtenidos.

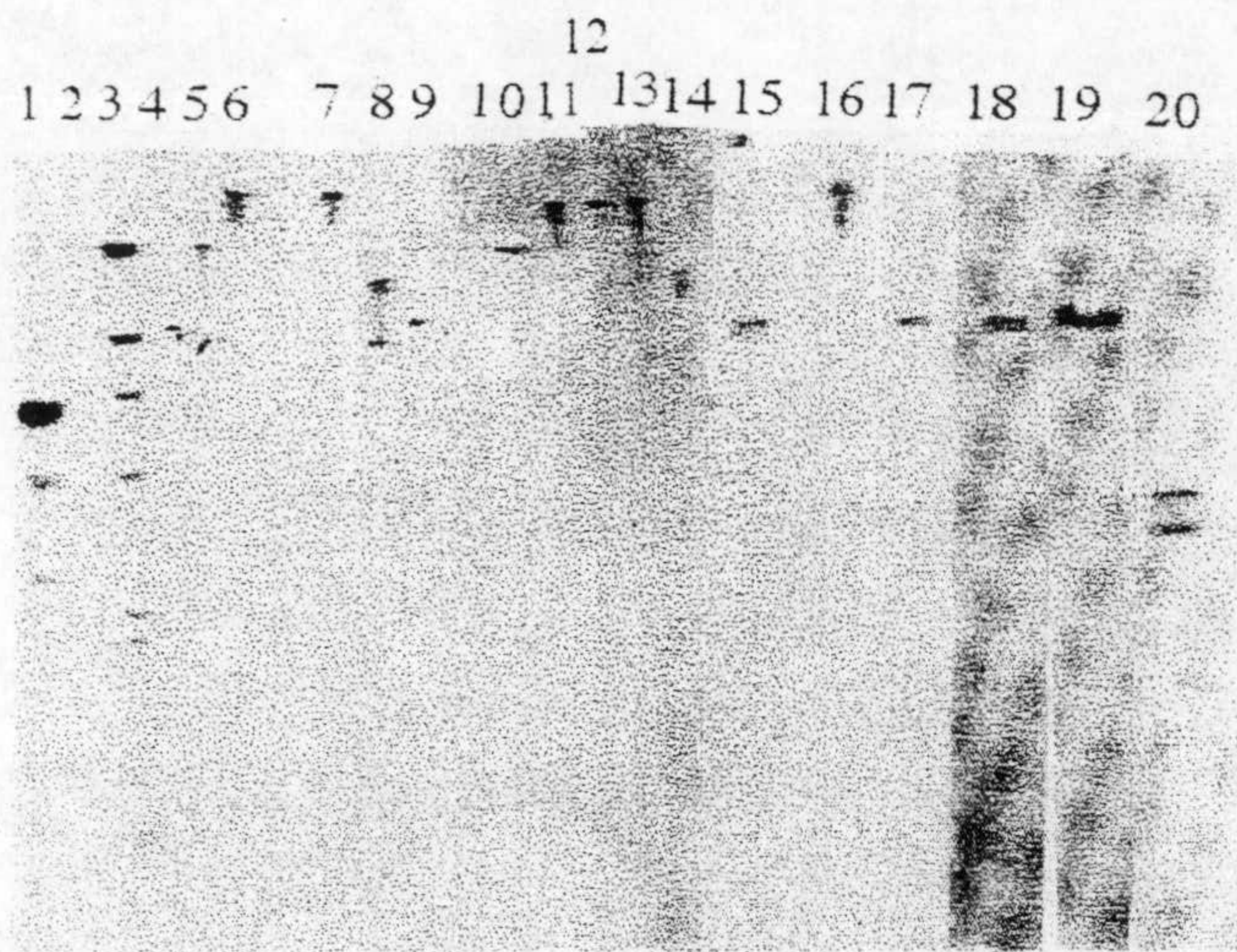


Figura R.6.4. Membrana de hibridación en condiciones relajadas (42°C y 30% (vol/vol) formamida) de las cepas citadas en la tabla 1 con la sonda correspondiente al gen *hpaD*. Calle 1: control positivo, que en este caso se trata del plásmido pHCB1. Calle 2: control negativo que es ADN de la cepa *Pseudomonas putida* 2440. Calle 3: marcador de peso molecular correspondiente a la digestión del fago lambda (λ) con la enzima de restricción *Hind*III. Calle 4: *Bacillus circulans* DOT-203. Calle 5: *Pseudomonas putida* biotipo A DOT-214. Calle 6: *Pseudomonas fluorescens* DOT-213. Calle 7: *Pseudomonas* sp. DOT-217. Calle 8: *Enterobacter* sp. DOT-206. Calle 9: *Pseudomonas putida* DOT-216. Calle 10: *Erwinia* DOT-207. Calle 11: *Klebsiella oxytoca* DOT-211. Calle 12: *Escherichia coli* DOT-208. Calle 13: *Pseudomonas* DOT-218. Calle 14: *Pseudomonas putida* biotipo A DOT-215. Calle 15: *Klebsiella oxytoca* DOT-210. Calle 16: *Rhodococcus rhodochrous* DOT-219. Calle 17: *Acinetobacter* sp. DOT 202. Calle 18: *Flavimonas oryzihabitans* DOT-209. Calle 19: *Sphingomonas paucimobilis* DOT-220. Calle 20: *Enterobacter agglomerans* DOT-205.

Con las cepas que presentaron una hibridación más clara en condiciones relajadas se realizó también una hibridación en condiciones estrictas, estas fueron: *Enterobacter agglomerans* DOT-205, *Flavimonas oryzihabitans* DOT-209 y *Sphingomonas paucimobilis* DOT-220. Solo apareció una banda muy tenue en *Sphingomonas paucimobilis* DOT-220. En la figura R.6.5. se muestra la membrana en la que se presentan los resultados obtenidos.

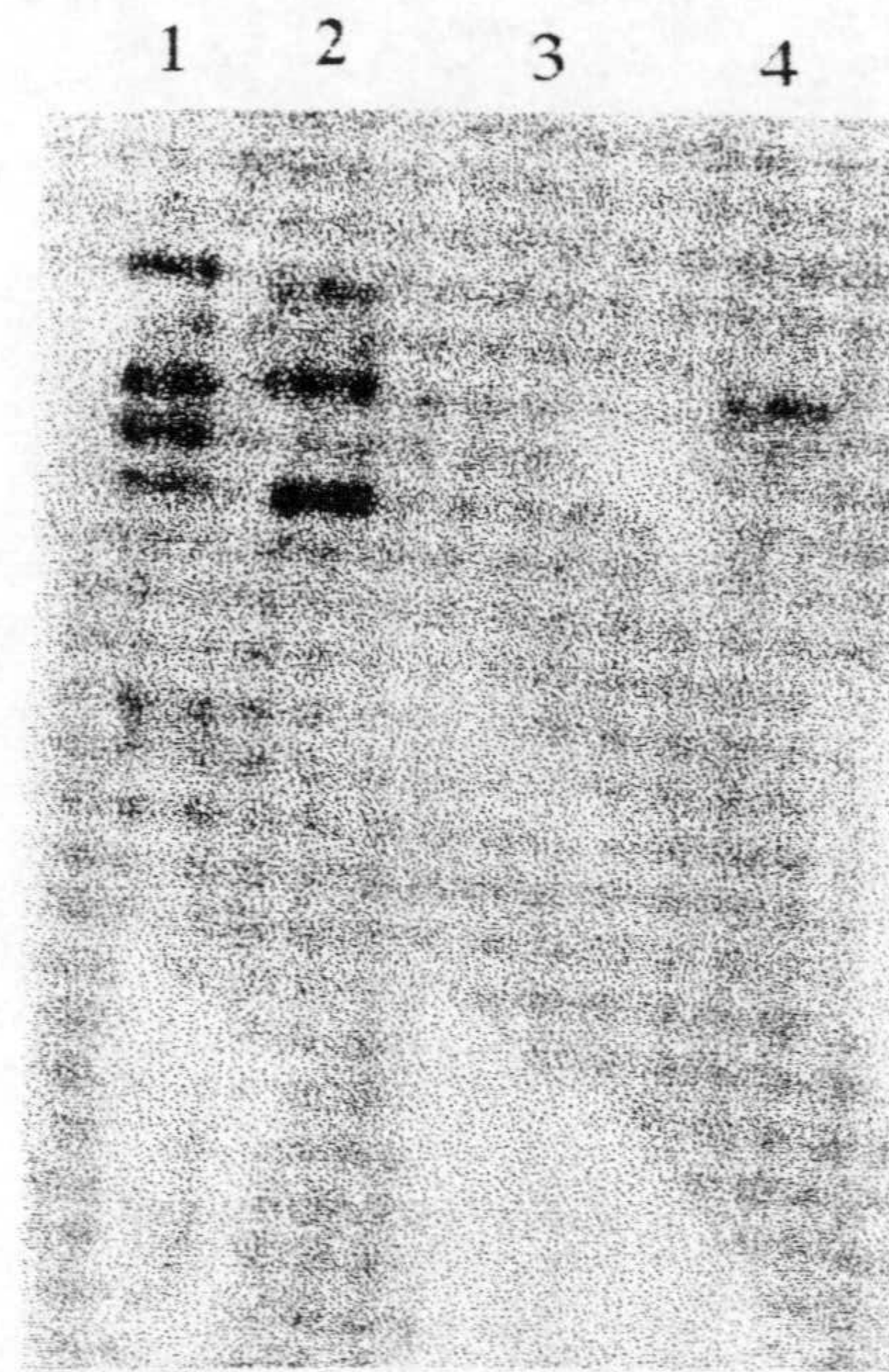
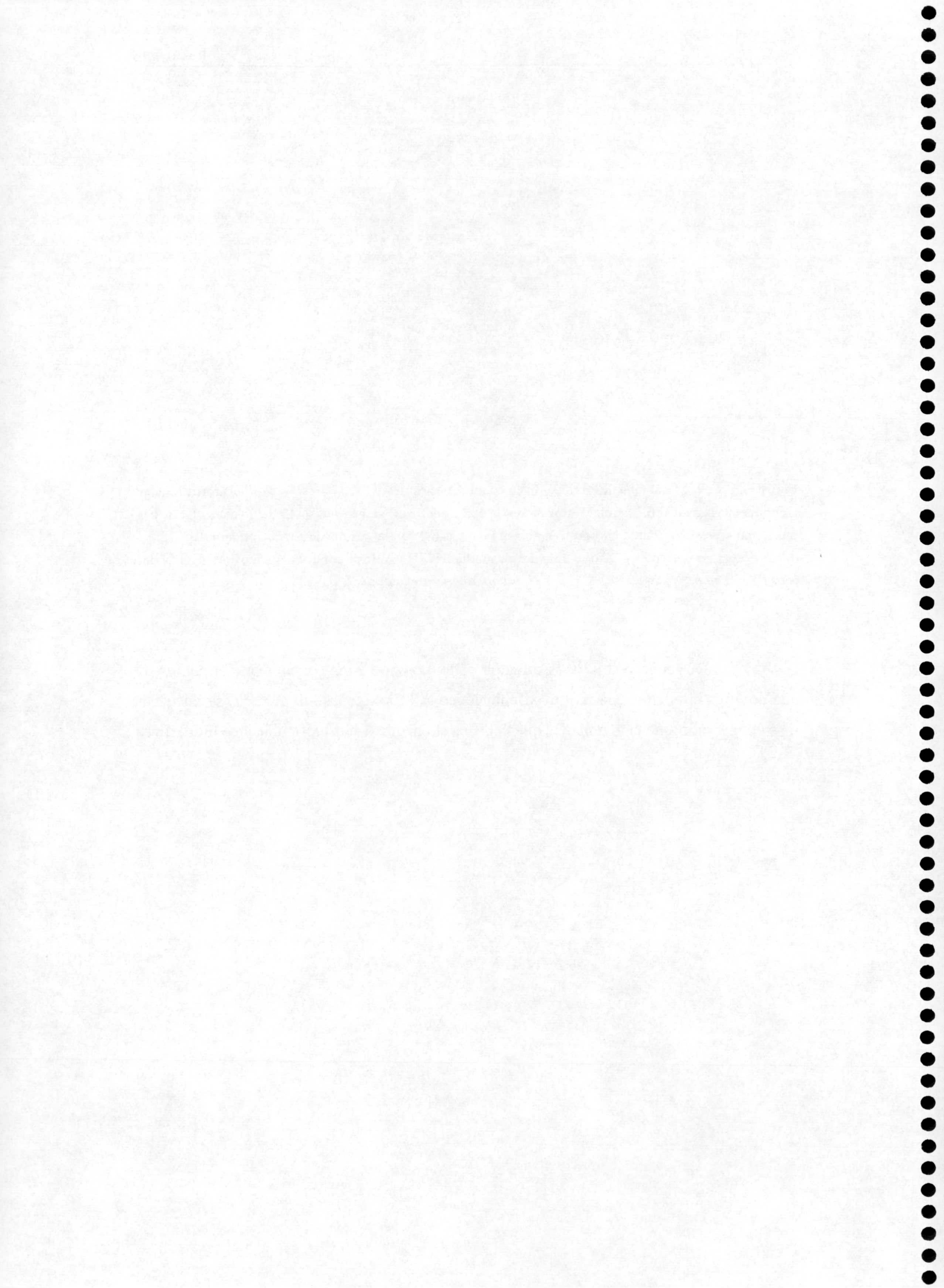
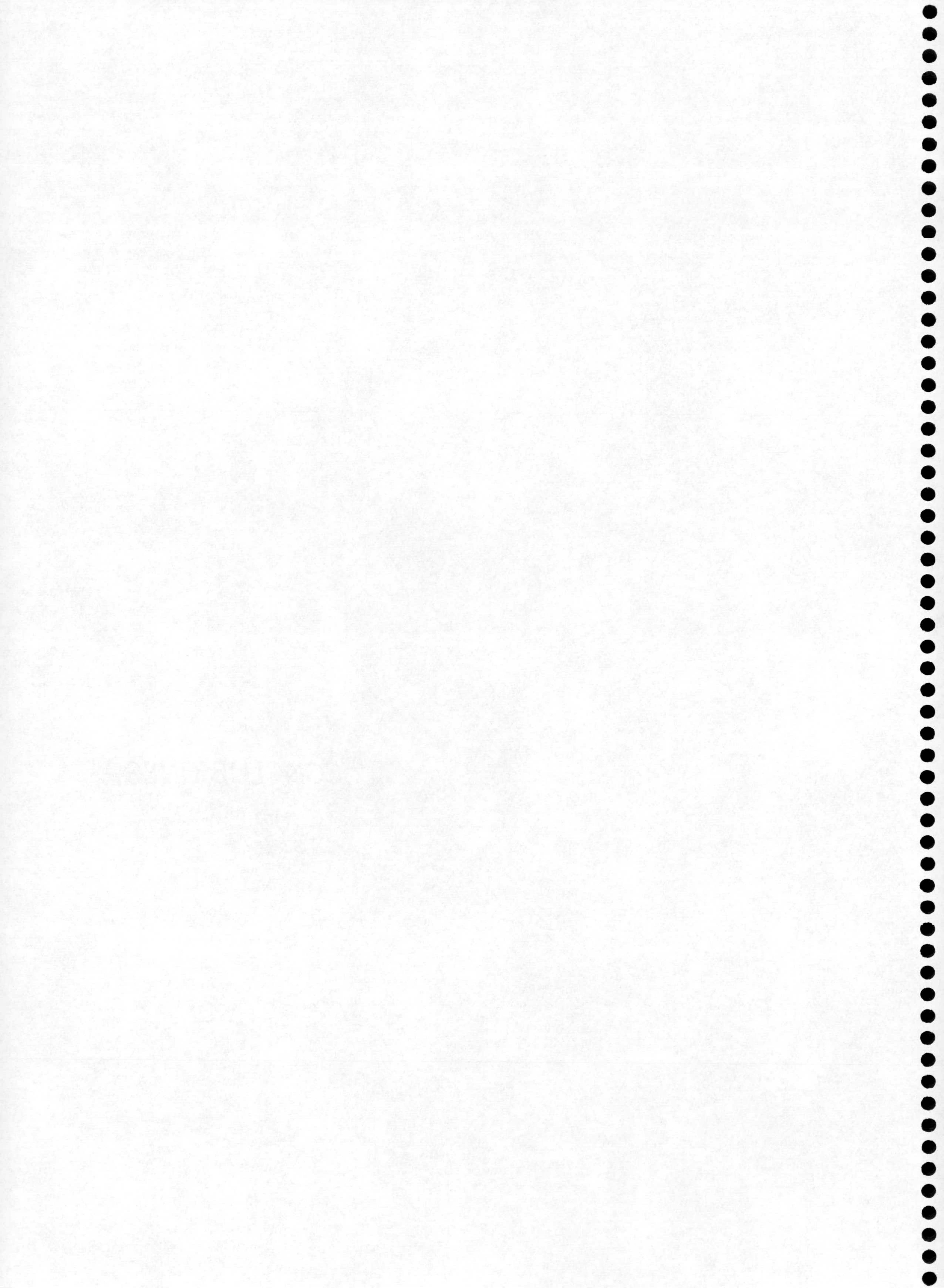


Figura R.6.5. Membrana de hibridación en condiciones estrictas (42°C y 50% (vol/vol) formamida) de algunas cepas citadas en la tabla 1 con la sonda correspondiente al gen *hpaD*. Calle 1: marcador de peso molecular correspondiente a la digestión del fago lambda (λ) con la enzima de restricción *Hind*III. Calle 2: control positivo que en este caso se trata del plásmido pHCB1. Calle 3: control negativo que es ADN de la cepa *Pseudomonas putida* 2440. Calle 4: *Sphingomonas paucimobilis* DOT-220.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que el gen *hpaD*, que codifica el enzima 3,4-dihidroxifenilacético-2,3-dioxigenasa de *E. coli*, se encuentra más conservado que el gen *hpaB*, que codifica el enzima 4-hidroxifenilacético hidroxilasa.



CONCLUSIONES



C. CONCLUSIONES

PRIMERA

En el proceso de extracción del aceite de oliva se obtienen básicamente 3 tipos de residuos en función del método de producción utilizado. Así, con el método tradicional y continuo de 3 fases se obtiene alpechín y orujo; mientras que con el método continuo de 2 fases se obtiene "alpeorujo".

SEGUNDA

La extracción con disolventes de distinta polaridad y a diferentes condiciones de pH de cada uno de los residuos tratados proporciona las cantidades que a continuación se detallan:

- 1250 ml de alpechín a pH: 3. Extracto de hexano: 5,496 g; extracto de cloruro de metileno: 2,347 g; extracto de éter: 1,349 g; extracto de acetato de etilo: 3,625 g; extracto de n-butanol: 3,743 g.

- 200 ml de alpechín a pH: 7. Extracto de hexano: 0,859 g; extracto de cloruro de metileno: 0,391 g; extracto de acetato de etilo: 0,121 g. Tras la acidificación de la fase acuosa a pH: 3 se obtiene: extracto de hexano: 0,258 g; extracto de cloruro de metileno: 0,168 g; extracto de acetato de etilo: 0,026 g.

- 4200 ml de alpechín a pH: 5,4. extracto de hexano: 1,223 g; extracto de cloruro de metileno: 3,456 g; extracto de éter: 1 g; extracto de acetato de etilo: 2,308 g. Tras la acidificación de la fase acuosa a pH: 3 se obtiene: extracto de acetato de etilo: 7,974 g.

- 5000 g de orujo macerados en etanol: extracto de hexano: 3,368 g.

- 1800 g de alpeorujo macerados en agua y fase acuosa acidificada a pH:3. Extracto de hexano: 2,892 g; extracto de cloruro de metileno: 3,819 g; extracto de éter: 3,673 g; extracto de acetato de etilo: 4,080 g

TERCERA

El análisis preliminar de cada uno de los extractos obtenidos de las diferentes muestras revela la presencia del mismo tipo de compuestos en función del disolvente utilizado, independientemente del sustrato de partida. Así, en el extracto de hexano se registran ácidos grasos esterificados con glicerol así como compuestos tipo terpenos; en el extracto de cloruro de metileno aparecen compuestos aromáticos tipo flavonas, así como compuestos aromáticos sustituidos con grupos aldehído y metoxilos; en el extracto de éter se observan señales de compuestos aromáticos con grupos aldehído, metoxilo, hidroxilo, y cadenas alquílicas con y sin dobles enlaces; en el extracto de acetato de etilo aparecen señales que corresponden a compuestos aromáticos con grupos hidroxilo, aldehído, ácido y, como el en caso anterior, cadenas alquílicas con y sin dobles enlaces; y en el extracto de n-butanol se observan señales que corresponden a azúcares y saponinas fundamentalmente.

CUARTA

La cromatografía sobre sílica gel en columna del extracto de hexano previamente esterificado proporciona 3 fracciones: A1 (75% del producto total cromatografiado), A2 (3,95% del producto total cromatografiado) y A3 (8,65% del producto total cromatografiado).

La saponificación de A1 y posterior esterificación de los ácidos grasos permite la identificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas de: ácido oleico (C18:1; 76,5% del total), ácido linoleico (C18:2; 17,6% del total), ácido palmítico (C16:0; 3,8% del total), ácido esteárico (C18:0; 0,9% del total) y ácido palmitoleico (C16:1; 0,8% del total).

La cromatografía sobre sílica gel en columna de las fracciones A2 y A3 acetiladas permite el aislamiento de dos productos puros: 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo (Compuesto 1, 0,7% del producto total cromatografiado) y 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo (Compuesto 2, 0,85% del producto total cromatografiado). La estructura de estos compuestos se ha establecido mediante métodos espectroscópicos y haciendo uso de correlaciones químicas.

QUINTA

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas del extracto de cloruro de metileno previa derivatización del mismo permite identificar como productos probables en este extracto: 1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol); ácido diisooctil-1,2-benzenodicarboxílico; tetradecametil heptasiloxano; éster metílico del ácido hexadecanoico; ácido 2,3-bis(trimetilsilil)-2-butenedioico; ácido 2-(trimetilsililoxi)-2-propenoico; ácido 2,3-dihidroxisuccínico; ácido 1-propen-1,2,3-tricarboxílico; ácido trimetilsililoxi propanodioico; siringaldehído; ácido 3,5-dimetoxibenzoico; ácido verátrico; 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol); ácido protocatéquico; ácido 3,4-dihidroxibenzoico; ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico; 3,4,5-trimetoxibenzaldehído.

SEXTA

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas del extracto de éter previa derivatización del mismo permite identificar como productos probables en este extracto: Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico; 4-hidroxibencenoetanol; 1,4-dimetilmetanol benceno; ciclododecano; 2-metil-5-(1-metil)-*trans* ciclohexanona; 2-metil-5-(1-metiletetil)-ciclohexanona; 1,4-dimetanol benceno; 2,6-dimetoxitolueno; éster metílico del ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico.

SÉPTIMA

Las diferentes cromatografía sobre sílica gel en columna de los extractos de acetato de etilo derivatizados o no permiten el aislamiento de una serie de productos puros cuyas estructuras son establecidas a partir de sus propiedades espectroscópicas y mediante correlaciones químicas en algunos casos y, en otros, sometiendo el producto a varias reacciones químicas. A continuación se citan estos productos y las cromatografía de procedencia:

Cromatografía C:

- 3,5-dihidroxifenil etanol (Compuesto 3, 2,3% del producto total cromatografiado), identificado por primera vez en residuos de la fabricación de aceite de oliva;

- β -D-glucopiranosido-*o*-tirosol (Compuesto 4, 0,63% del producto total cromatografiado), identificado por primera vez en estos residuos;

Cromatografía E:

- *p*-hidroxifenilpropanol (producto identificado en alpechín el ácido *p*-hidroxifenil propanoico) y 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) (Compuestos 5 y 6, 38,8% del producto total cromatografiado);

Cromatografía F:

- *p*-hidroxifeniletanol (tirosol) (Compuesto 7, 0,27% del producto total cromatografiado);

Cromatografía H:

- 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (Compuesto 8, 0,55% del producto total cromatografiado), producto probable en el residuo el 2,4,6-trihidroxibenzaldehído, identificado por primera vez en estos residuos;

Cromatografía I:

- 3-(*p*-acetoxifenil)-2-propen-1-al (Compuesto 9), producto probable en el residuo el 3-(*p*-hidroxifenil)-2-propen-1-al, identificado por primera vez en estos residuos;

Cromatografía J:

- *p*-acetoxicumarato de metilo (Compuesto 10, 0,068% del producto total cromatografiado), producto probable en el residuo el ácido *p*-hidroxicumárico;

Cromatografía L:

- ácido 3-[1-(formil)-(*E*) 1-propenil] glutárico (Compuesto 11, 1,27% del producto total cromatografiado) y ácido 3-[1-(hidroximetil)-(*E*) 1-propenil] glutárico (Compuesto 12, 1,54% del producto total cromatografiado), identificados ambos por primera vez en estos residuos. La estructura de estos compuestos se confirma tras la saponificación del compuesto 12 dando la lactona derivada que tras su esterificación nos da el compuesto 11 metilado. La reducción del compuesto 11 resulta el compuesto 12 junto con la lactona derivada resultante de la saponificación de los ésteres de los grupos ácido;
- ácido *p*-hidroxifenilpropanoico (Compuesto 13) y éster metílico del ácido *p*-hidroxifenilpropanoico (Compuesto 14), 0,91 % del producto total cromatografiado;
- 4-metil éter cumarina, 2-cetona-4-metoxi benzopireno (2-cetona-4-metoxicromeno) (Compuesto 15, 2,54% del producto total cromatografiado), derivado no

hidroxilado y metilado en posición 4 de la esculetina, identificado por primera vez en estos residuos.

Por análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas de algunas fracciones de estas cromatografías se identifican los siguientes productos como probables compuestos contenidos en estos extractos: hidroxitolueno butilado; alcohol oleico; octadeciléster del ácido acético; 1,13-tetradecadieno; decano; ácido 1,2-dicarboxílico benzoico; 1,2-dimetilbenceno; eicosano; metil éster del ácido 3-(3-hidroxifenil)-2-propenoico ó metil éster del ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico; 2,3,4,5,6-pentaacetato D-glucosa; ácido 2-hidroxifenilacético; ácido 3,4-dimetoxibenzoico; ácido 2-hidroxibenzoico; metil éster del ácido hexadecanoico; Nonadecano; 1,3-dimetilbenceno; 1-octadecano; 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico; 3-hexin-1-ol; E,Z)-5,7-dodecadieno; 2-metil-5-(1-metil)ciclohexanona; *p*-hidroxibenzaldehído; ácido *p*-hidroxibenzoico; ácido vanílico; ácido 3,4-dihidroxibenzoico; diácido 1,4-benceno; diácido 1,4-dietanoicobenceno; hexadecano; tricosano; *p*-xileno; ácido *o*-hidroxifenilacético; ácido *p*-hidroxifenilacético; ácido *p*-hidroxifenilpropiónico; hidroxitirosol; ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico; ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído; ácido verátrico; ácido gálico; ácido protocatéquico; vanillina; ácido sirínico; ácido ferúlico; ácido verátrico; ácido 2,4- y 2,3-dihidroxibenzoico; ácido 3,5-dimetilbenzoico; ácido 2,3-dimetilbenzoico; ácido *m*-anísico; ácido *p*-anísico; ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico; ácido cinámico; *p*-hidroxifeniletanol (tirosol); ácido diisooctil 1,2-bencenodicarboxílico; ácido 2,3-bis(trimetilsiloxi) succínico; ácido 2-propenoico.

OCTAVA

Se aislan 456 cepas bacterianas mediante una serie de enriquecimientos microbianos en los que se utiliza como fuente de carbono 14 compuestos aromáticos presentes en el alpechín, éstos son los ácidos *o*-anísico, *p*-anísico, benzoico, cafeico, *p*-hidroxifenilacético, 2,6-dihidroxibenzoico, ferúlico, sirínico, vanílico, verátrico, *p*-cumárico, 3,4,5-trimetoxigalato de metilo, tirosol y floroglucinol. Los sustratos utilizados son alpechín seco, tierra de jardín de la EEZ, aguas de la depuradora de Granada y aguas residuales de una industria de producción de amoniaco en la provincia de Huelva.

De alpechín seco se aislan: 1 cepa en ácido benzoico; 1 en ácido cafeico; 9 en ácido *p*-hidroxifenilacético; 1 en ácido ferúlico; 9 en ácido vanílico y 4 en ácido verátrico.

De tierra de jardín de la EEZ se aíslan: 4 cepas en ácido *o*-anísico; 9 en ácido *p*-anísico; 5 en ácido cafeico; 16 en ácido *p*-hidroxifenilacético; 8 en ácido 2,6-dihidroxibenzoico; 10 en ácido ferúlico; 23 en floroglucinol; 15 en ácido siríngico; 87 en ácido vanílico; 64 en ácido verátrico; 53 en tirosol y 8 en 3,4,5-trimetoxigalato de metilo.

De aguas de la depuradora de Granada se aíslan: 16 cepas en ácido *p*-anísico; 1 en ácido benzoico; 19 en ácido *p*-hidroxifenilacético y 2 en ácido siríngico.

De aguas residuales de una industria de producción de amoníaco en la provincia de Huelva se aíslan: 15 cepas en ácido *p*-anísico; 10 en ácido benzoico; 16 en ácido *p*-hidroxifenilacético; 2 en ácido ferúlico; 8 en ácido siríngico; 29 en ácido vanílico y 11 en ácido verátrico.

En ácido *p*-cumárico no se aísla ninguna cepa bacteriana capaz de utilizar este compuesto como fuente de carbono.

NOVENA

Se aíslan 3 cepas bacterianas que se identifican taxonómicamente como *Arthrobacter oxydans* (DAO1, DAO2, DAO3) y un consorcio bacteriano (DAO4) formado por 2 cepas identificadas taxonómicamente como *Arthrobacter oxydans* y *Pantoea agglomerans*, que son capaces de utilizar el ácido *o*-anísico como fuente de carbono y energía.

La ruta catabólica para la degradación del ácido *o*-anísico por estas 3 cepas y el consorcio bacteriano es la *o*-demetilación e hidroxilación del ácido *o*-anísico a ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), hidroxilación de éste a ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y ruptura del anillo aromático del ácido gentísico a metabolitos que se incorporan en el ciclo de Krebs. Estas cepas y el consorcio bacteriano son capaces de crecer a expensas de los ácidos intermedios de la ruta catabólica.

El consorcio bacteriano no es capaz de utilizar otros ácidos dihidroxibenzoicos diferentes del ácido gentísico como fuente de carbono y energía y la proporción en la que se encuentra cada una de las cepas constituyentes del mismo es importante respecto a la utilización de ácido *o*-anísico como fuente de carbono y energía.

Las bacterias constituyentes del consorcio bacteriano aisladas no son capaces de utilizar ácido *o*-anísico como fuente de carbono.

La cepa *Arthrobacter oxydans*, constituyente del consorcio bacteriano, juega un papel más activo en la ruta catabólica del ácido *o*-anísico que la cepa *Pantoea agglomerans*.

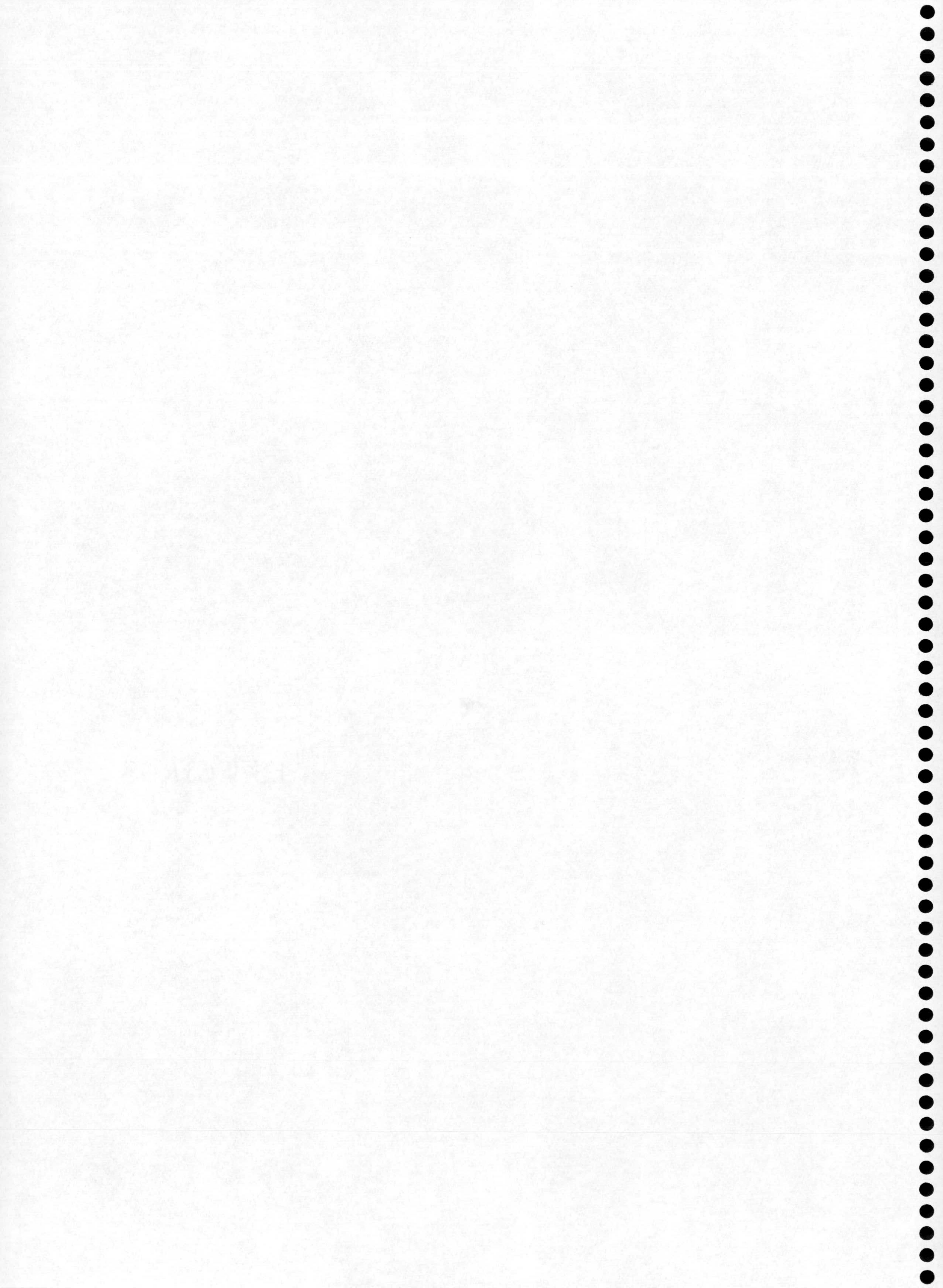
DÉCIMA

Se aislan 19 cepas bacterianas capaces de utilizar ácido *p*-hidroxifenilacético como fuente de carbono y energía. Éstas se identifican taxonómicamente como *Acinetobacter* sp. DOT-202, *Bacillus circulans* DOT-203, *Enterobacter agglomerans* DOT-204, *Enterobacter agglomerans* DOT-205, *Enterobacter* sp. DOT-206, *Erwinia* sp. DOT-207, *Escherichia coli* DOT-208, *Flavimonas oryzihabitans* DOT-209, *Klebsiella oxytoca* DOT-210, *Klebsiella oxytoca* DOT-211, *Nocardia asteroides* GC DOT-212 (subgrupo B), *Pseudomonas fluorescens* DOT-213, *Pseudomonas putida* DOT-214 (biotipo A), *Pseudomonas putida* DOT-215 (biotipo A), *Pseudomonas putida* DOT-216, *Pseudomonas* sp. DOT-217, *Pseudomonas* sp. DOT-218, *Rhodococcus rhodochrous* DOT-219, *Sphingomonas paucimobilis* DOT-220.

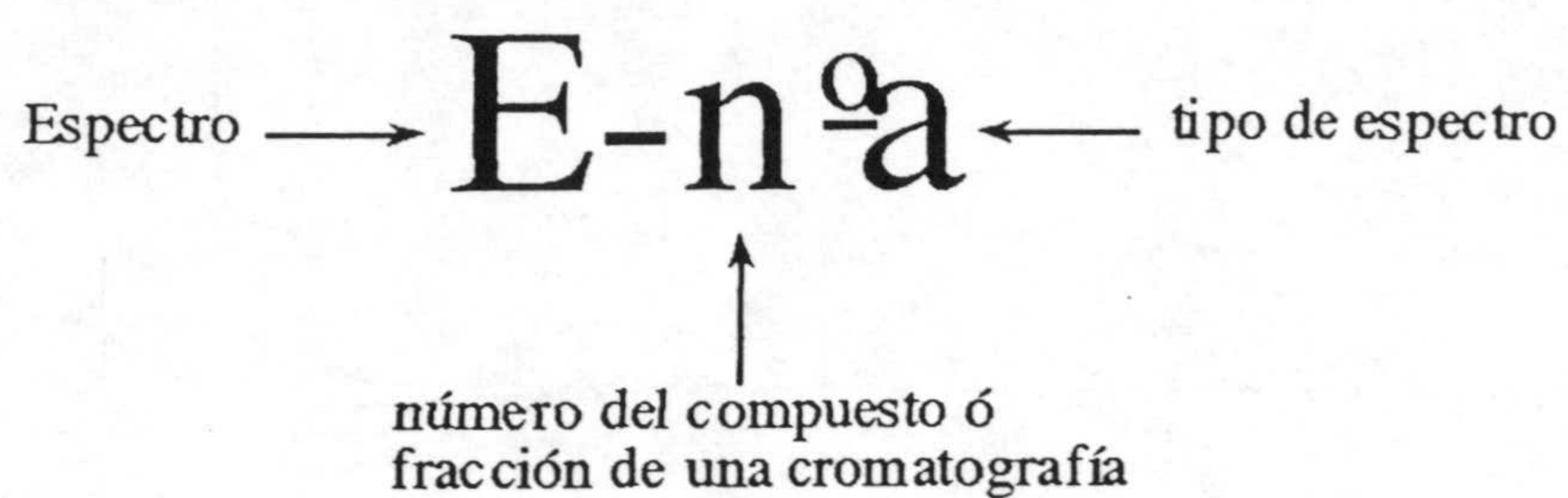
Se estudia la organización de los genes implicados en la ruta catabólica del ácido *p*-hidroxifenilacético por *E. coli*, utilizando sondas correspondientes a los genes *hpaB* y *hpaD*. El gen *hpaB* que codifica la enzima 4-hidroxifenilacetato-3-hidroxisasa, que cataliza el primer paso de la ruta catabólica para la degradación del ácido *p*-hidroxifenilacético en *E. coli*, está conservado en las cepas *Enterobacter agglomerans* DOT-204, *Pseudomonas putida* DOT-216 y *Pseudomonas* sp. DOT-217. El gen *hpaD* que codifica el enzima 3,4-dihidroxifenilacético-2,3-dioxigenasa, que cataliza el segundo paso de la ruta de degradación del ácido *p*-hidroxifenilacético de *E. coli*, está conservado en las cepas bacterianas *Acinetobacter* sp. DOT-202, *Bacillus circulans* DOT-203, *Enterobacter agglomerans* DOT-205, *Enterobacter* sp. DOT-206, *Erwinia* sp. DOT-207, *Escherichia coli* DOT-208, *Flavimonas oryzihabitans* DOT-209, *Klebsiella oxytoca* DOT-210, *Klebsiella oxytoca* DOT-211, *Pseudomonas fluorescens* DOT-213, *Pseudomonas putida* DOT-214 (biotipo A), *Pseudomonas putida* DOT-215 (biotipo A), *Pseudomonas putida* DOT-216, está los dos, *Pseudomonas* sp. DOT-217, están los dos, *Pseudomonas* sp. DOT-218, *Rhodococcus rhodochrous* DOT-219, *Sphingomonas paucimobilis* DOT-220.

En las cepas *Pseudomonas putida* DOT-216 y *Pseudomonas* sp. DOT-217 están conservados ambos genes.

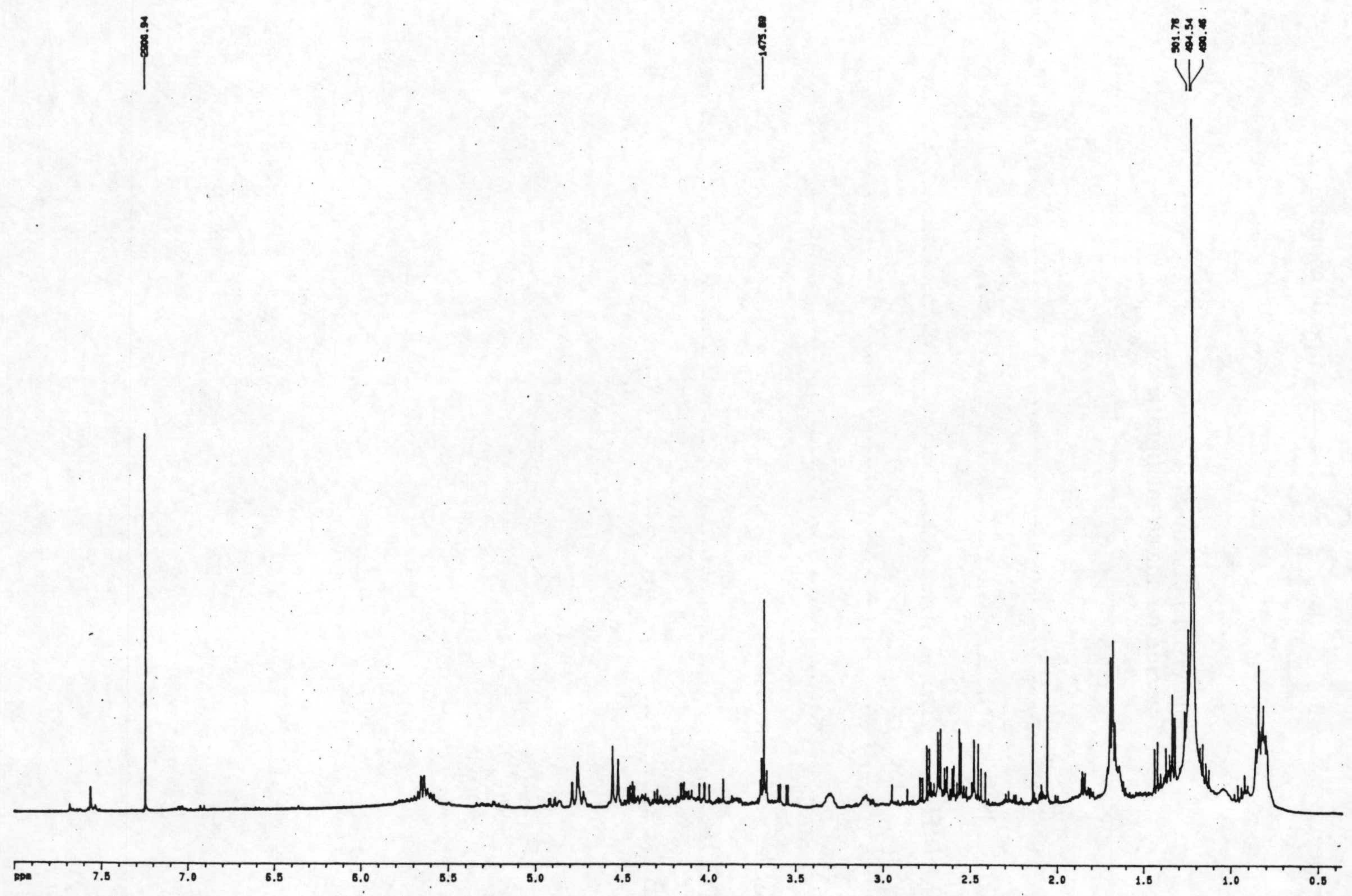
ESPECTROS



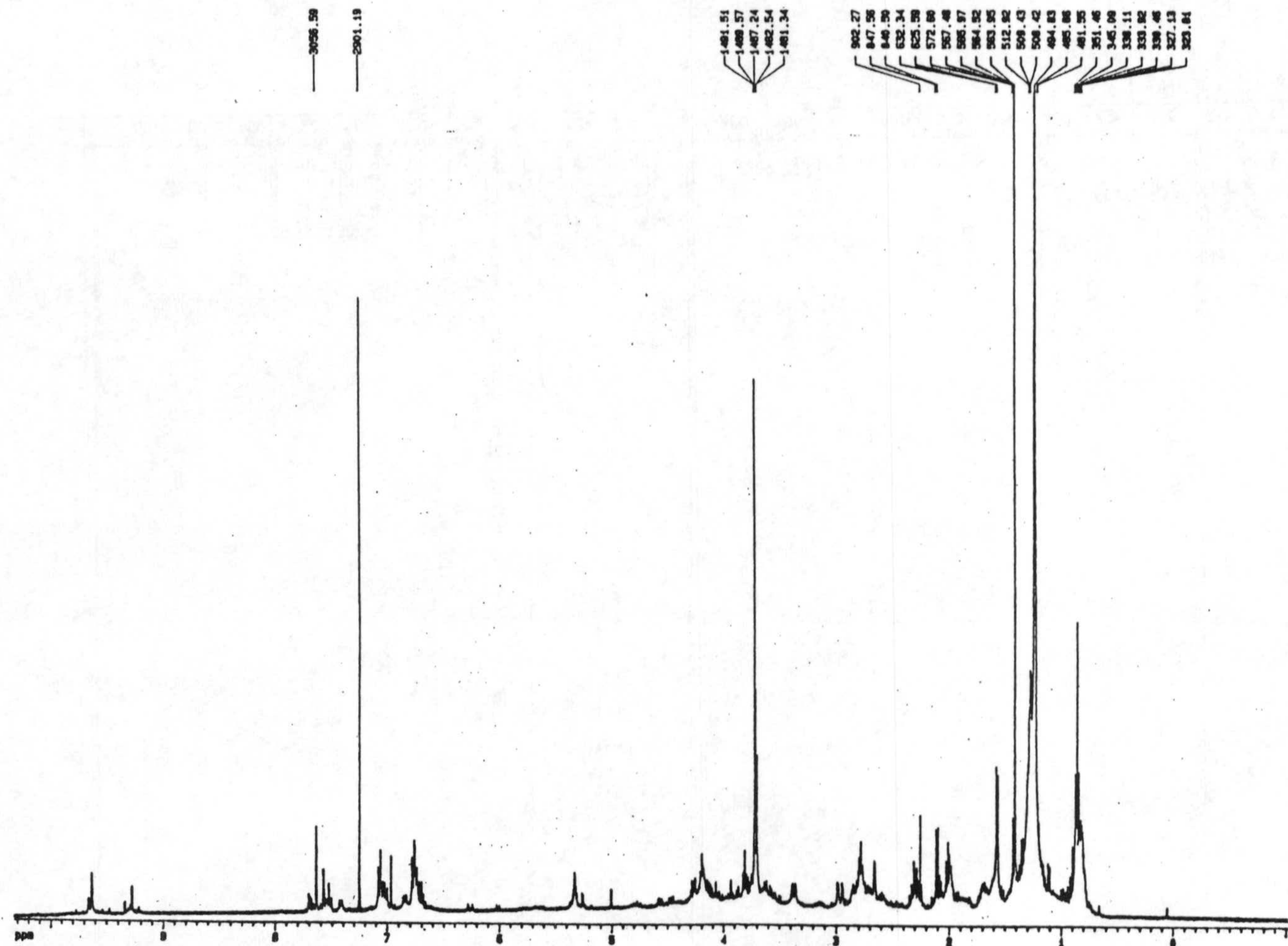
CLAVE PARA LOS ESPECTROS



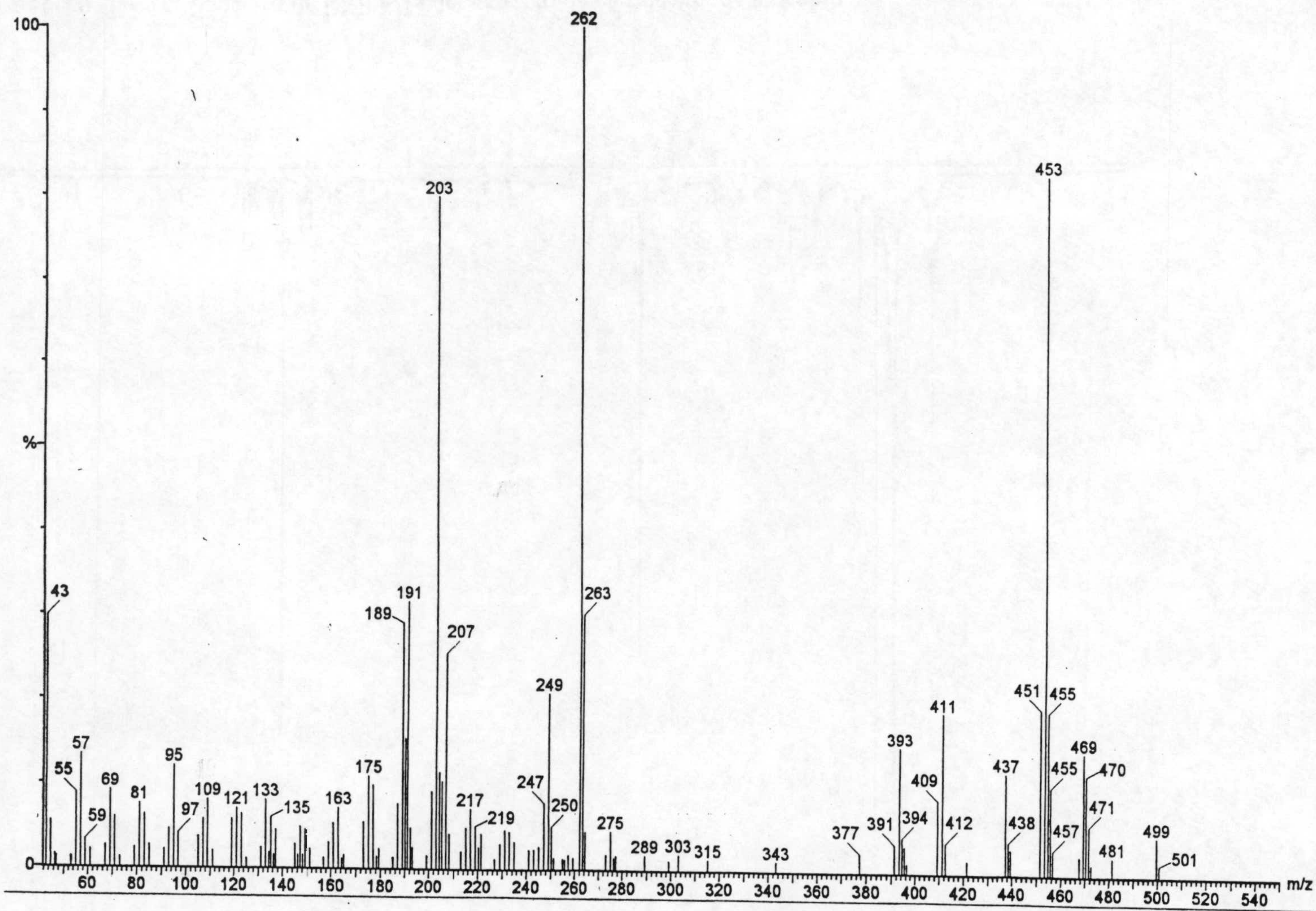
Espectro de masas.....	a
Espectro de IR.....	b
Espectro de RMN- ¹ H.....	c
Espectro de RMN- ¹³ C.....	d
Espectro COSY.....	e
Espectro NOESY.....	f
Espectro HETCOR.....	g
Espectro HMBC.....	h



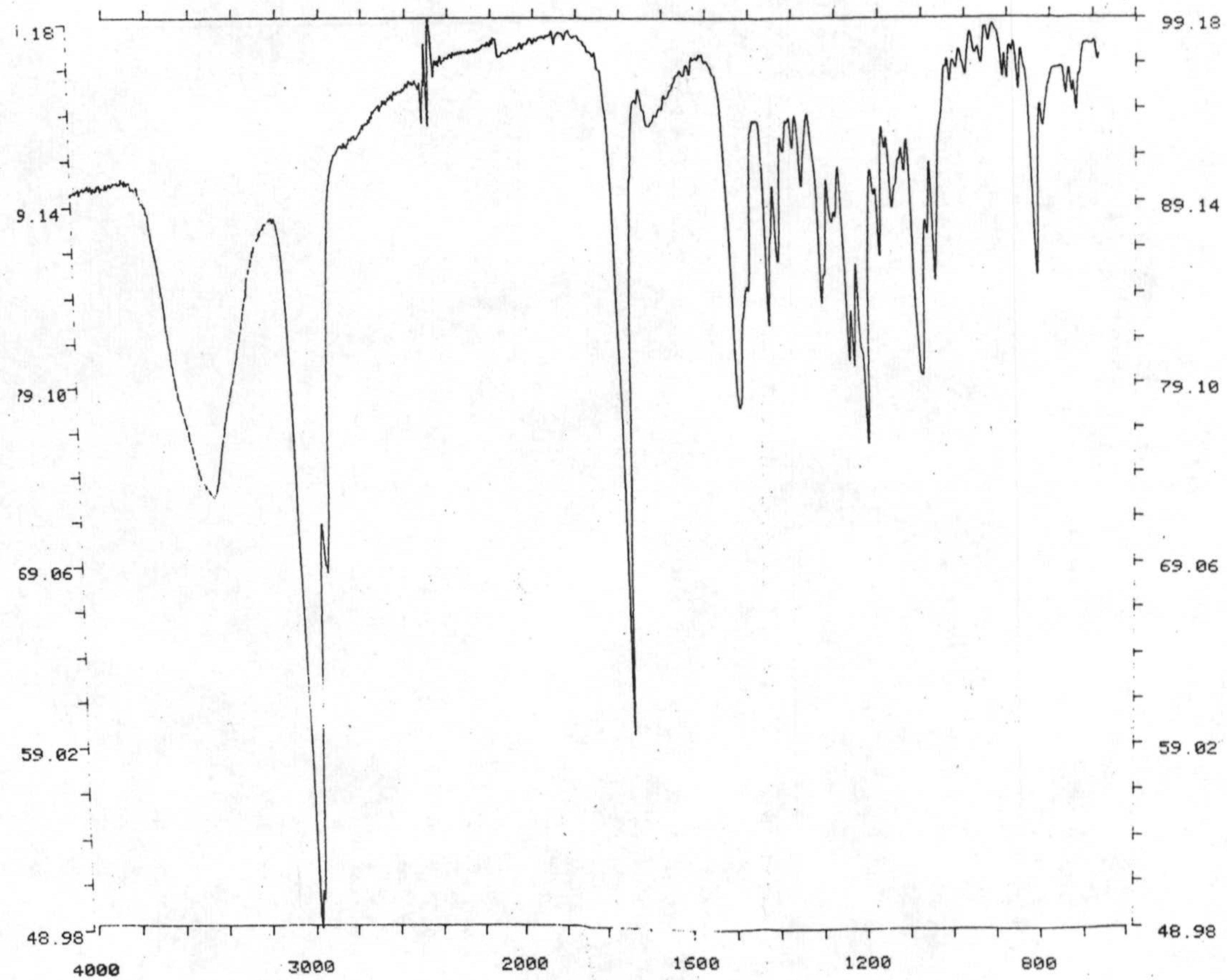
Espectro E-b-c: Espectro de RMN-¹H del extracto de cloruro de metileno de alpechín



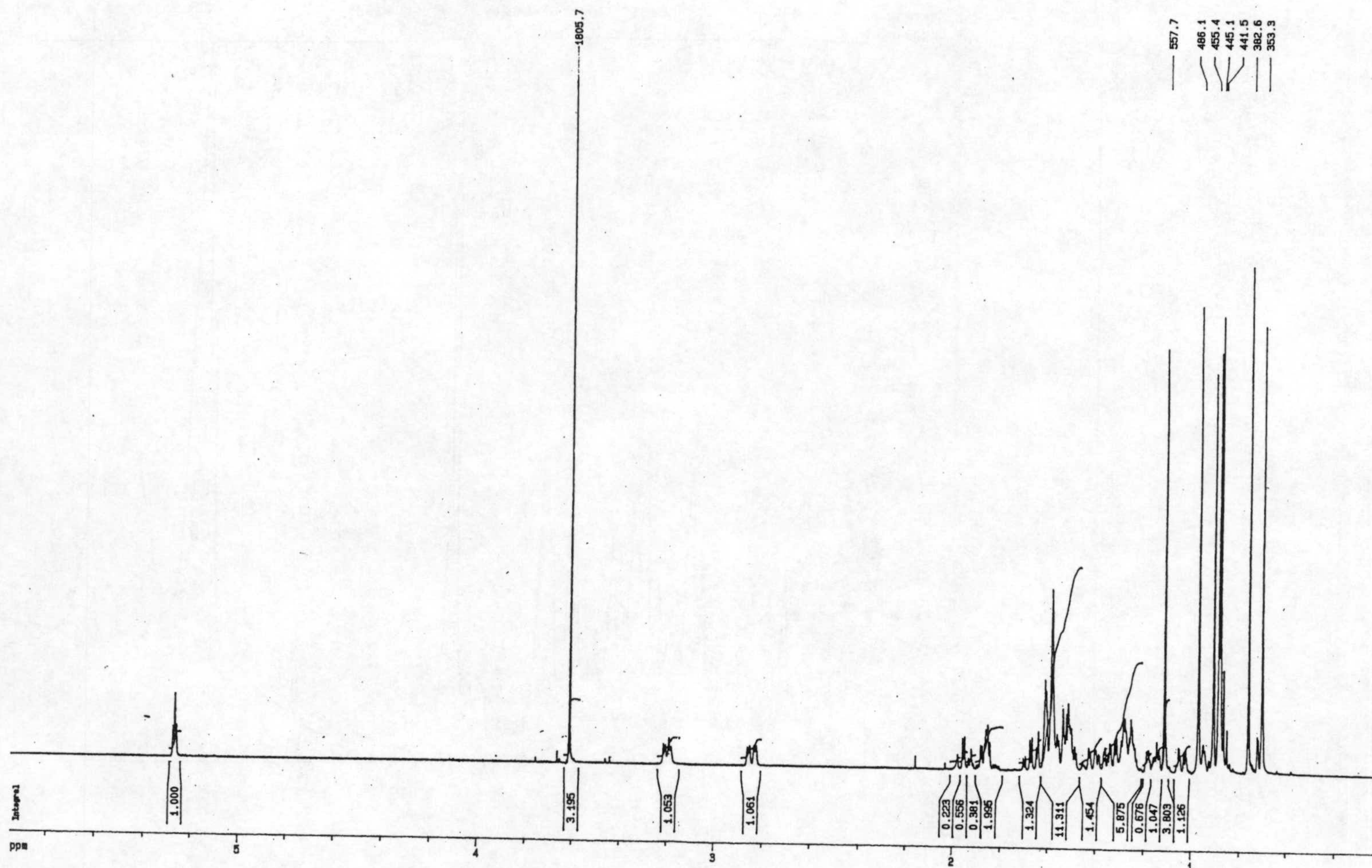
Espectro E-c-c: Espectro de RMN-¹H del extracto de éter de éter de alpechín



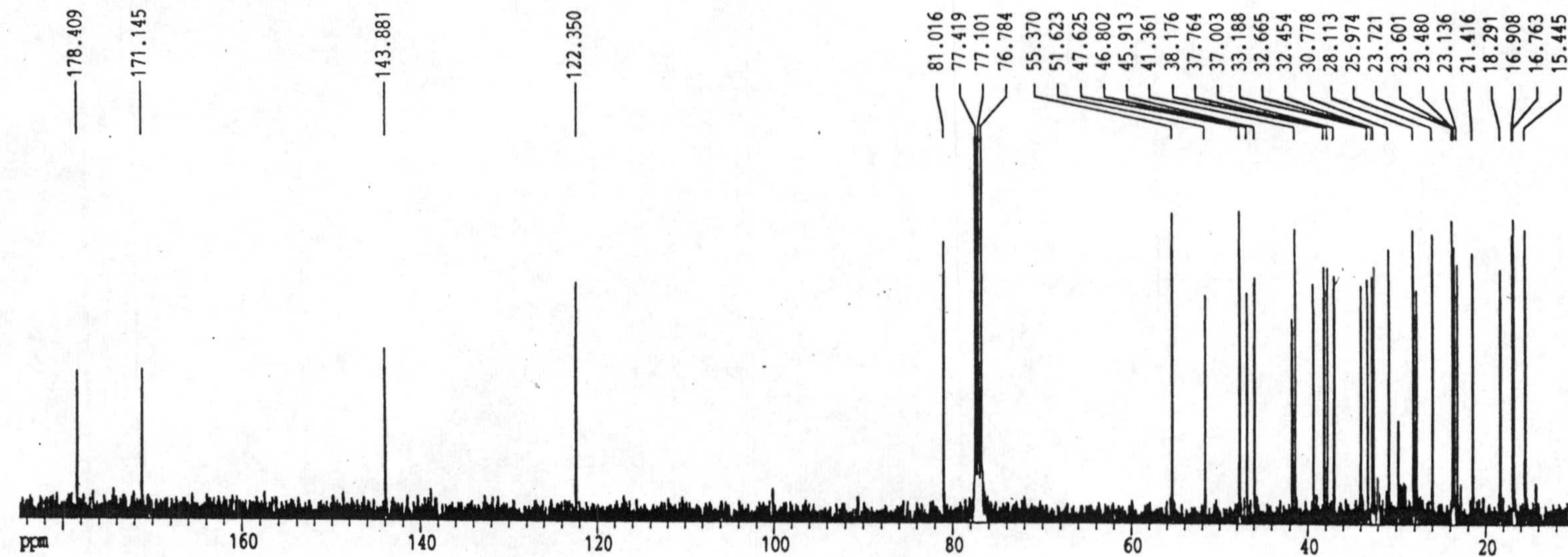
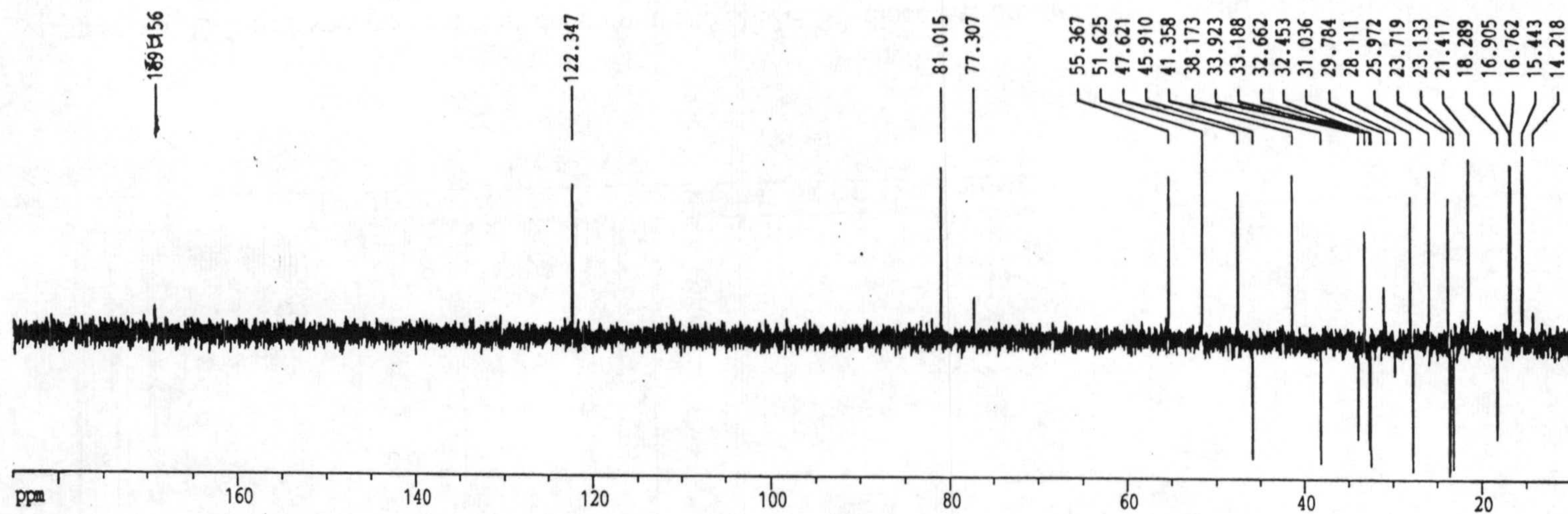
Espectro E-1-a: Espectro de masas del compuesto 1, 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo



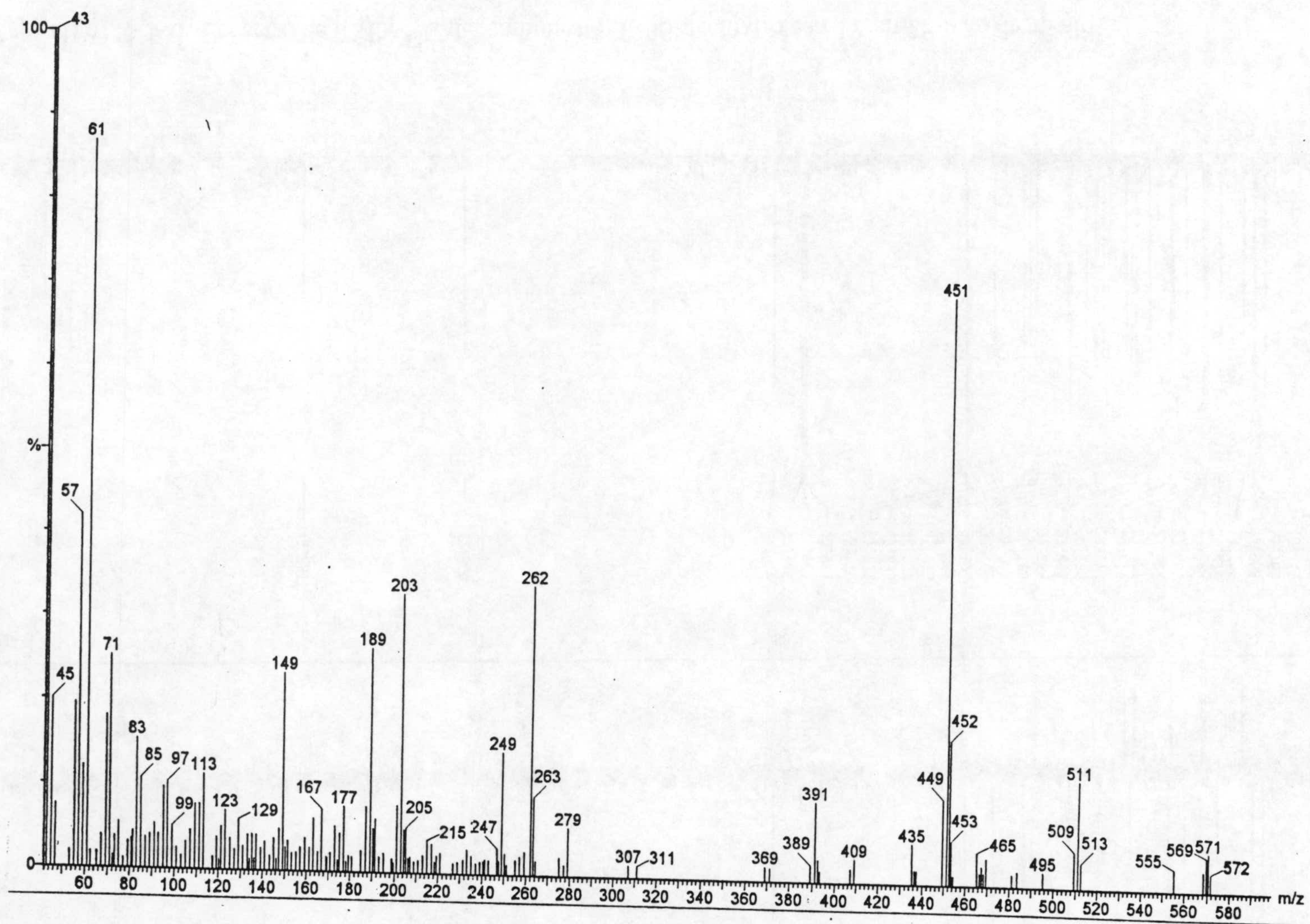
Espectro E-1-b: Espectro de IR del compuesto 1, 3β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo



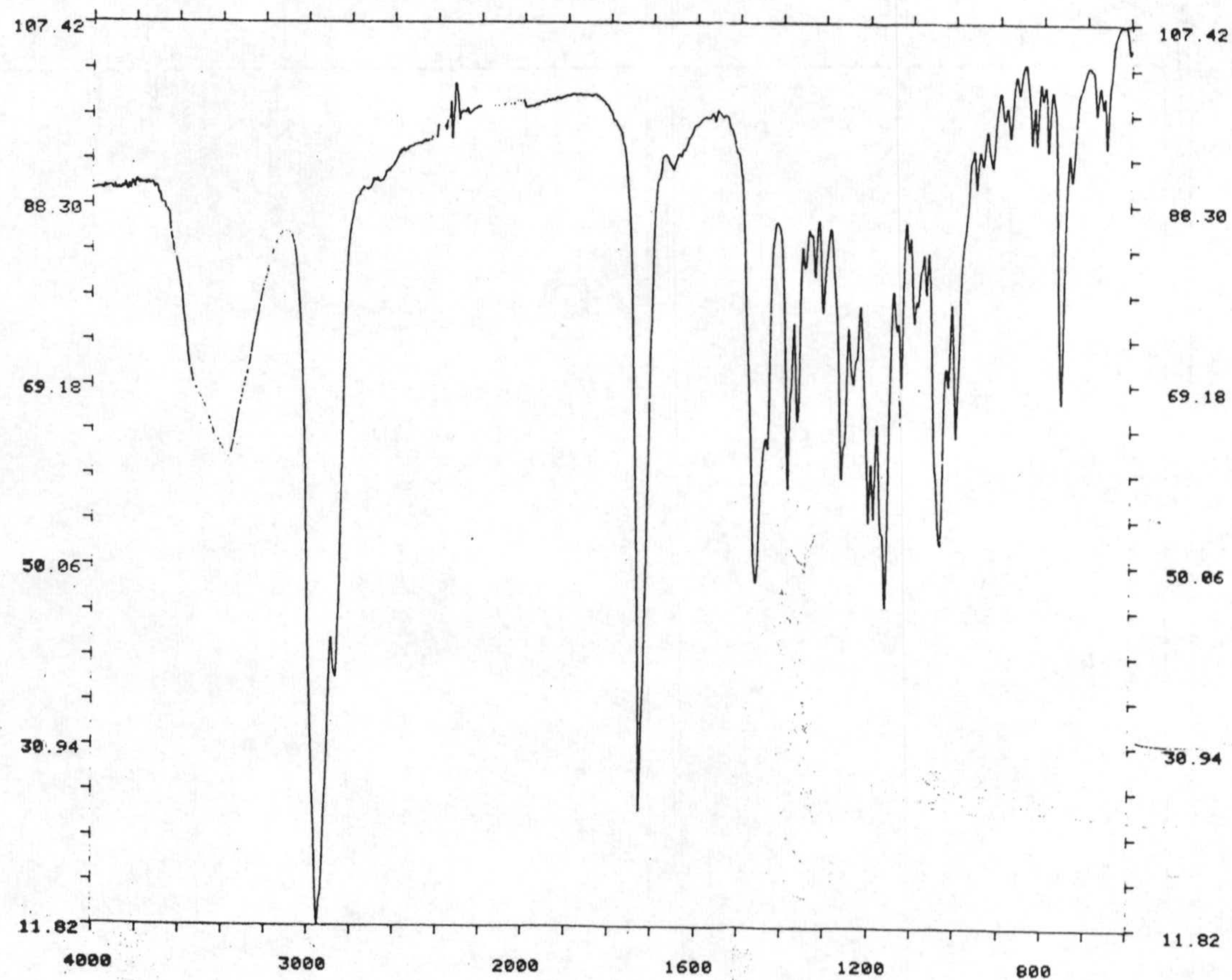
Espectro E-1-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 1, 3β-acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo



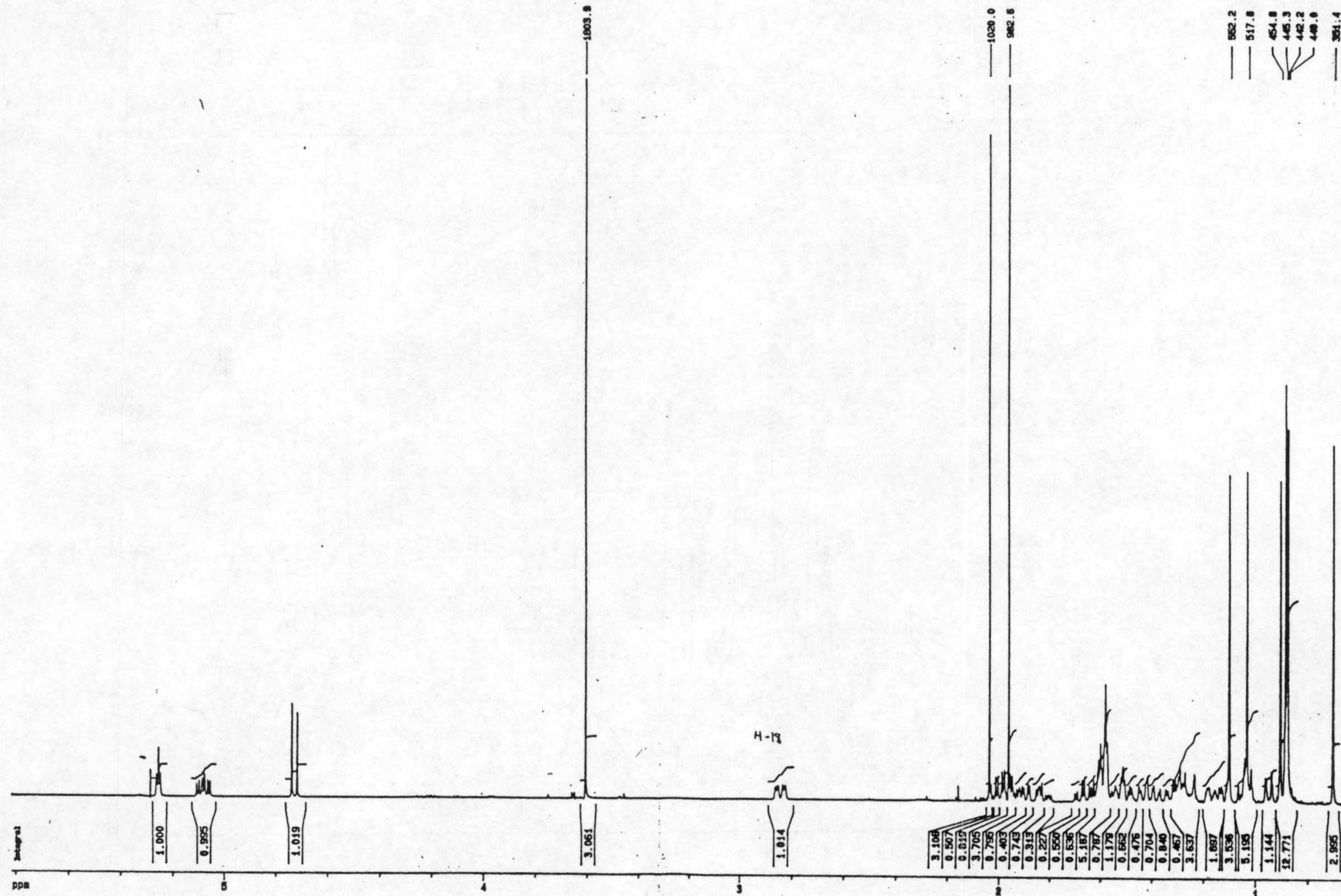
Espectro E-1-d: Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 1, 3 β -acetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo



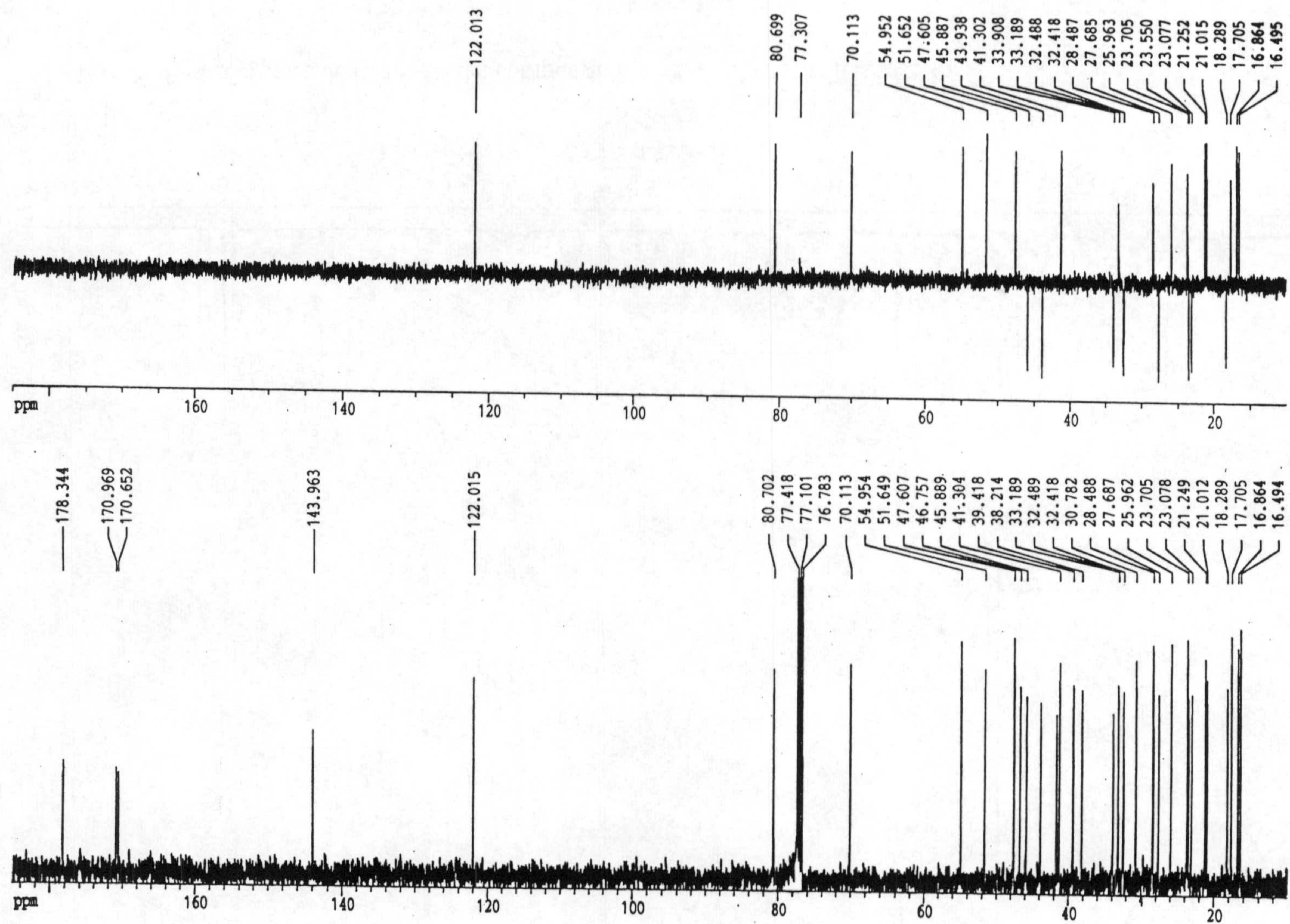
Espectro E-2-a: Espectro de masas del compuesto 2, 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo



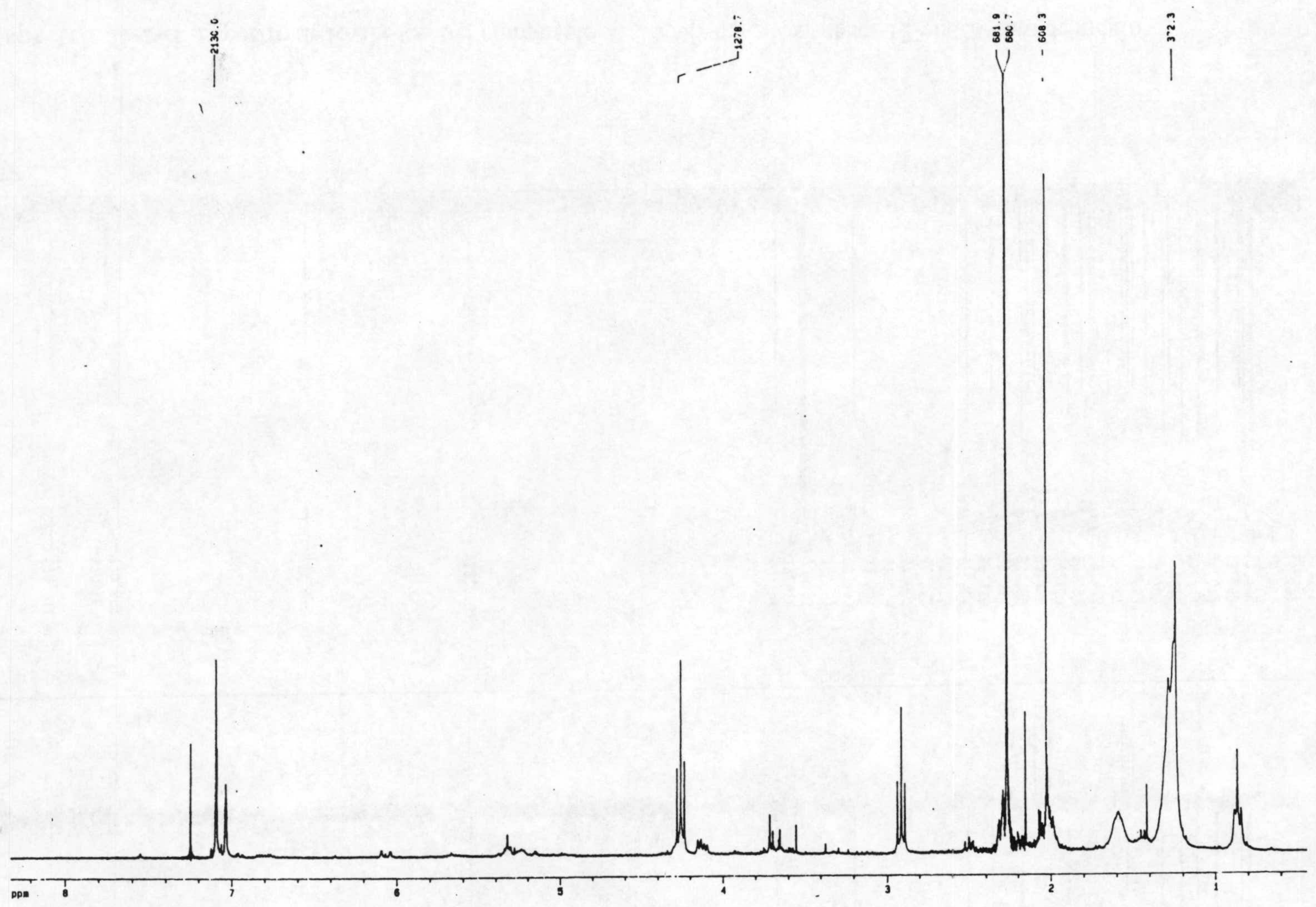
Espectro E-2-b: Espectro de IR del compuesto 2, $2\alpha,3\beta$ -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo



Espectro E-2-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 2, 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo

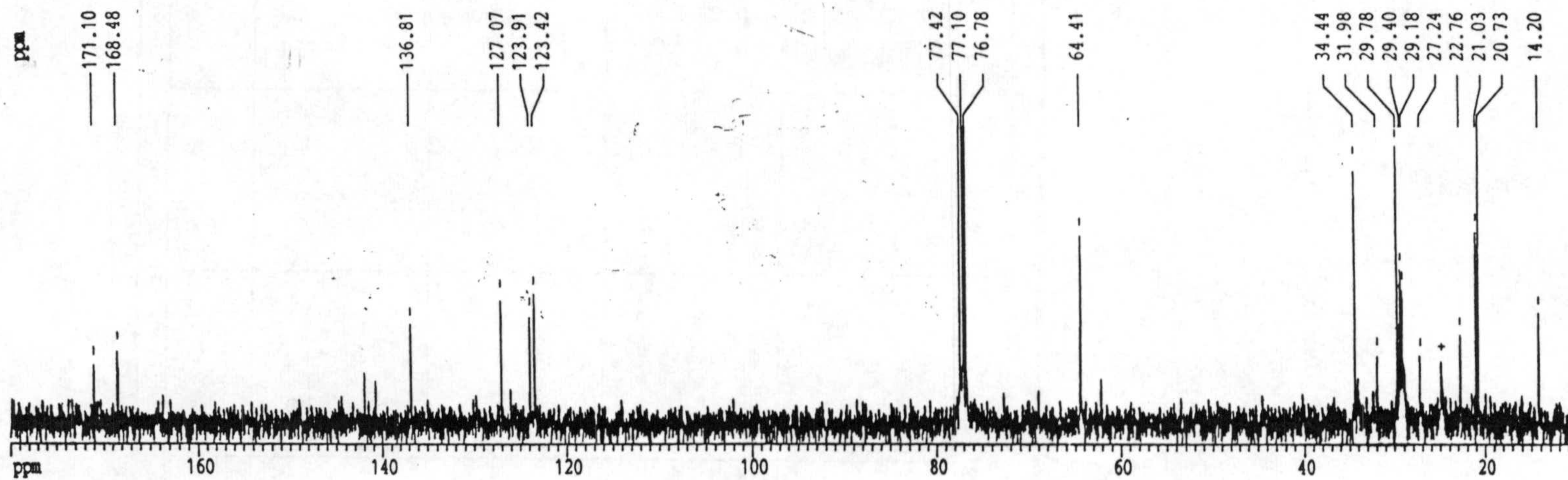
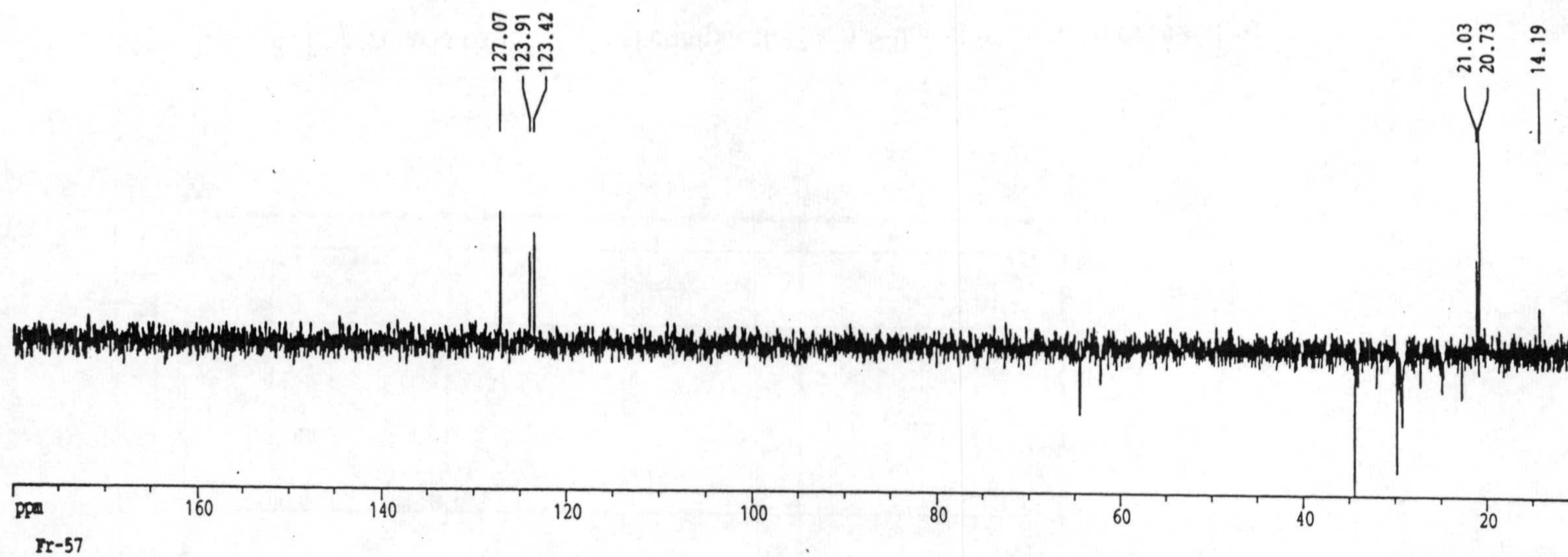


Espectro E-2-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 2, 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oato de metilo

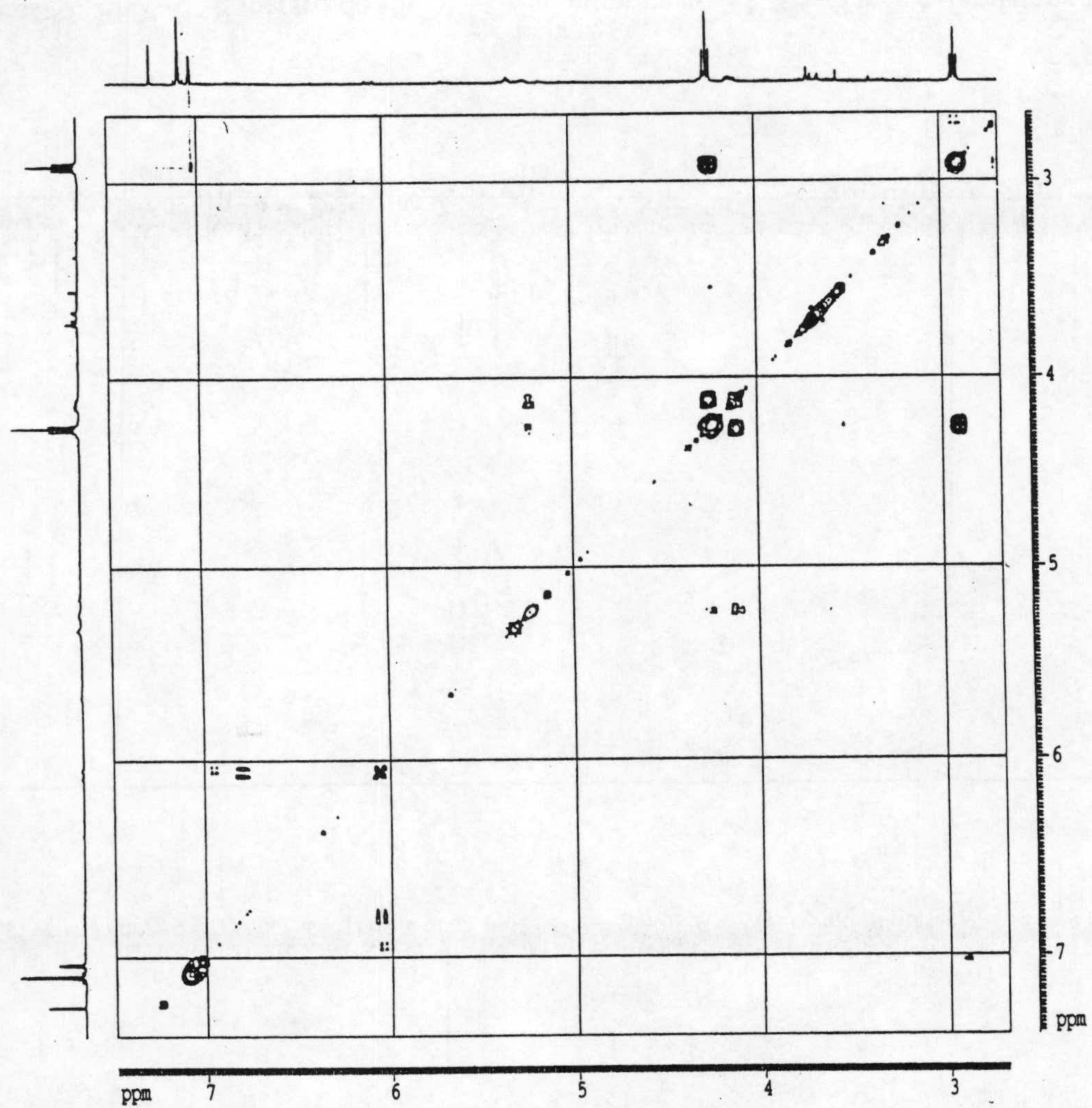


220

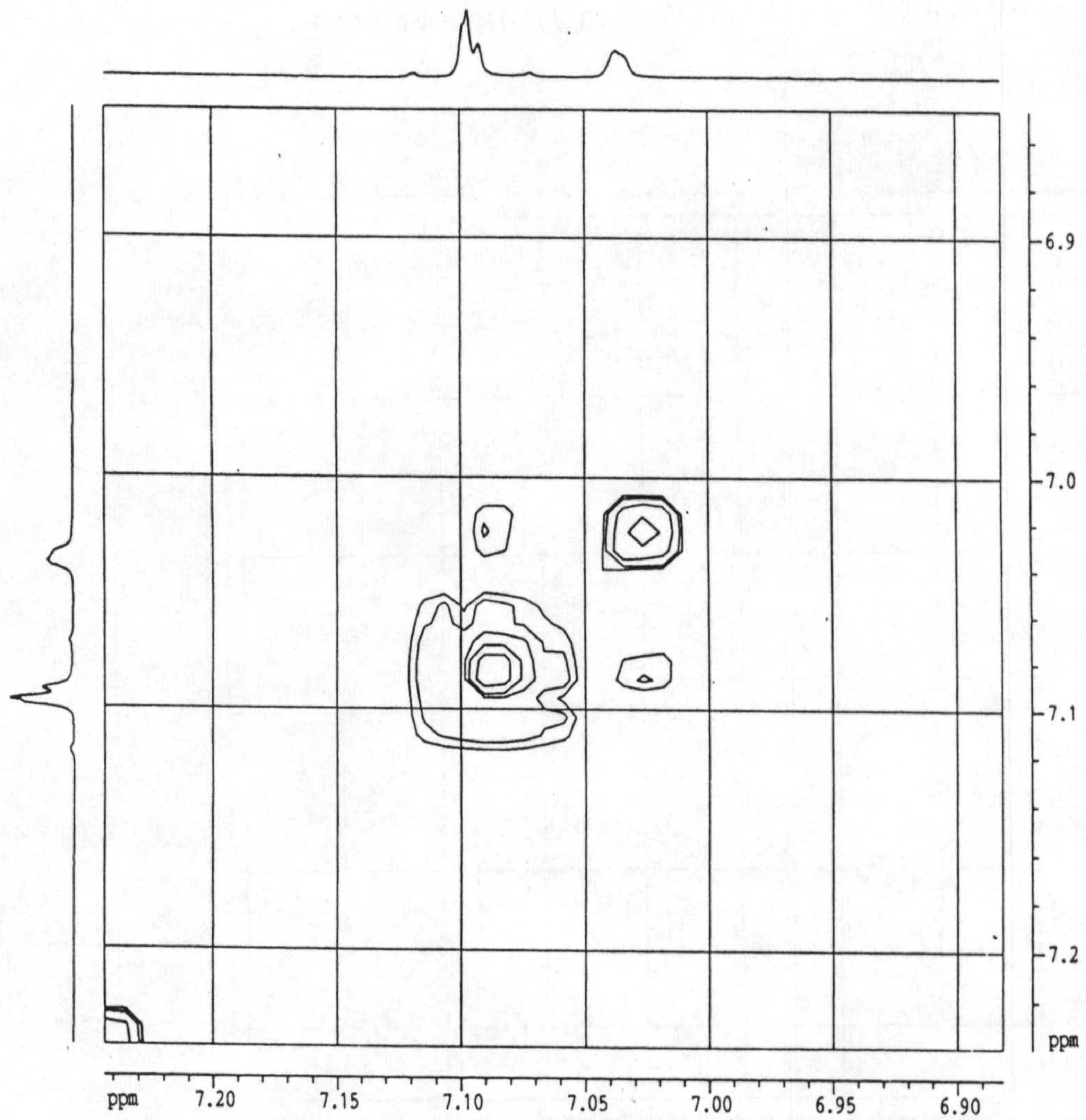
Espectro E-3'-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 3', 3,5-diacetoxifenilacetoxi



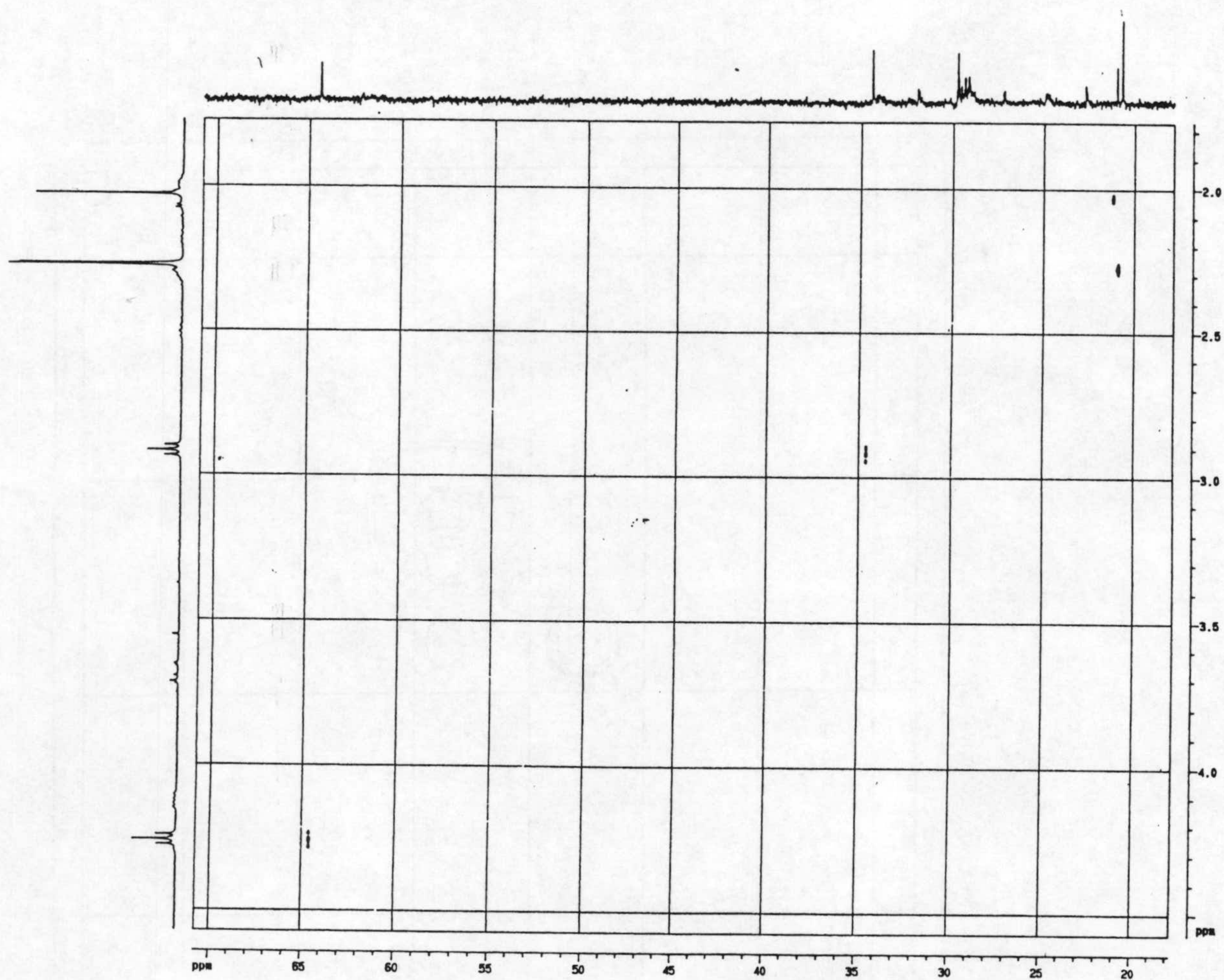
Espectro E-3'-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 3', 3,5-diacetoxifeniletanoacetoxi



Espectro E-3'-e: Experiencia COSY 90° del compuesto 3', 3,5-diacetoxifeniletanoacetoxi



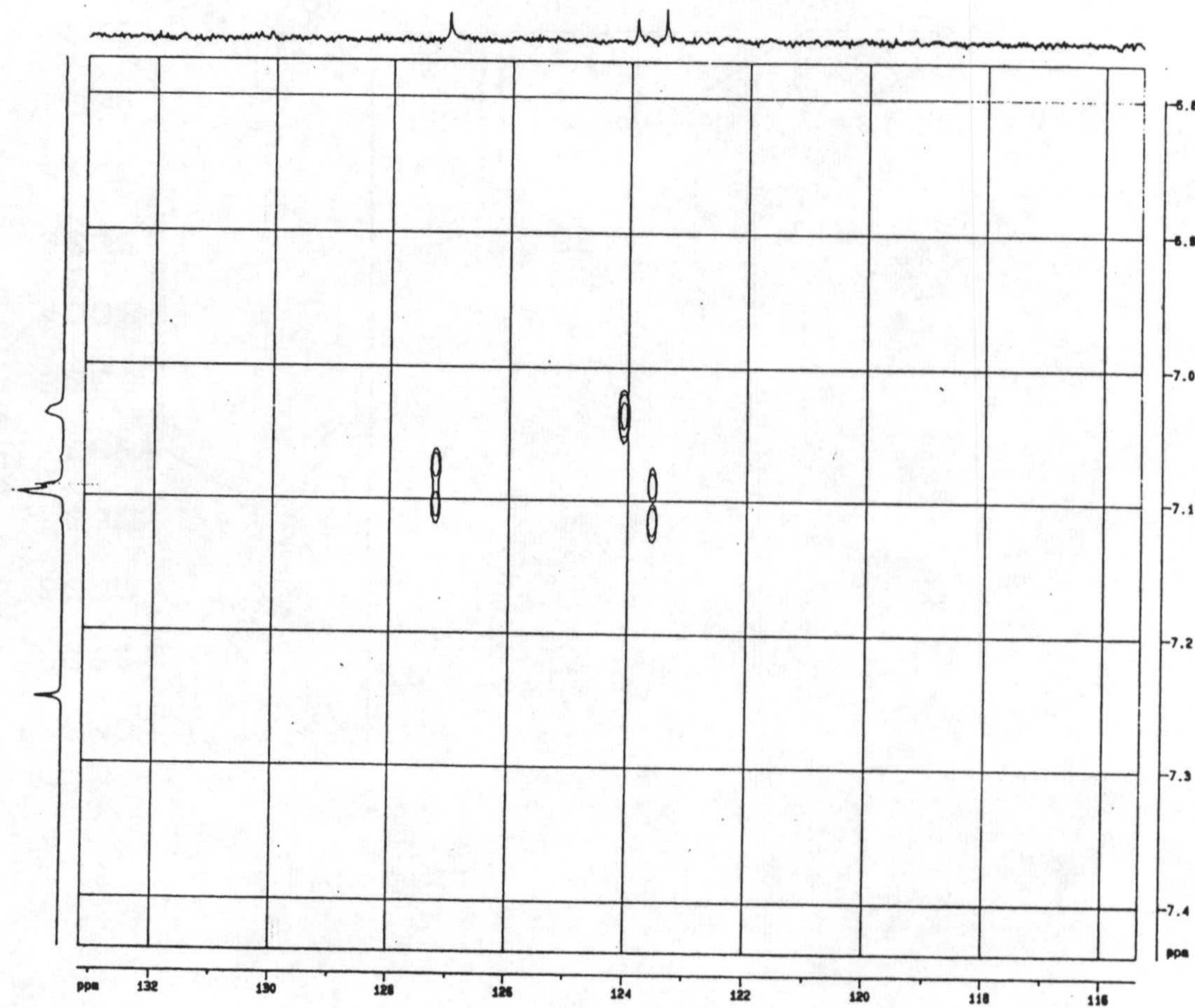
Espectro E-3'-e: Experiencia COSY 90° del compuesto 3', 3,5-diacetoxifeniletanoacetoxi



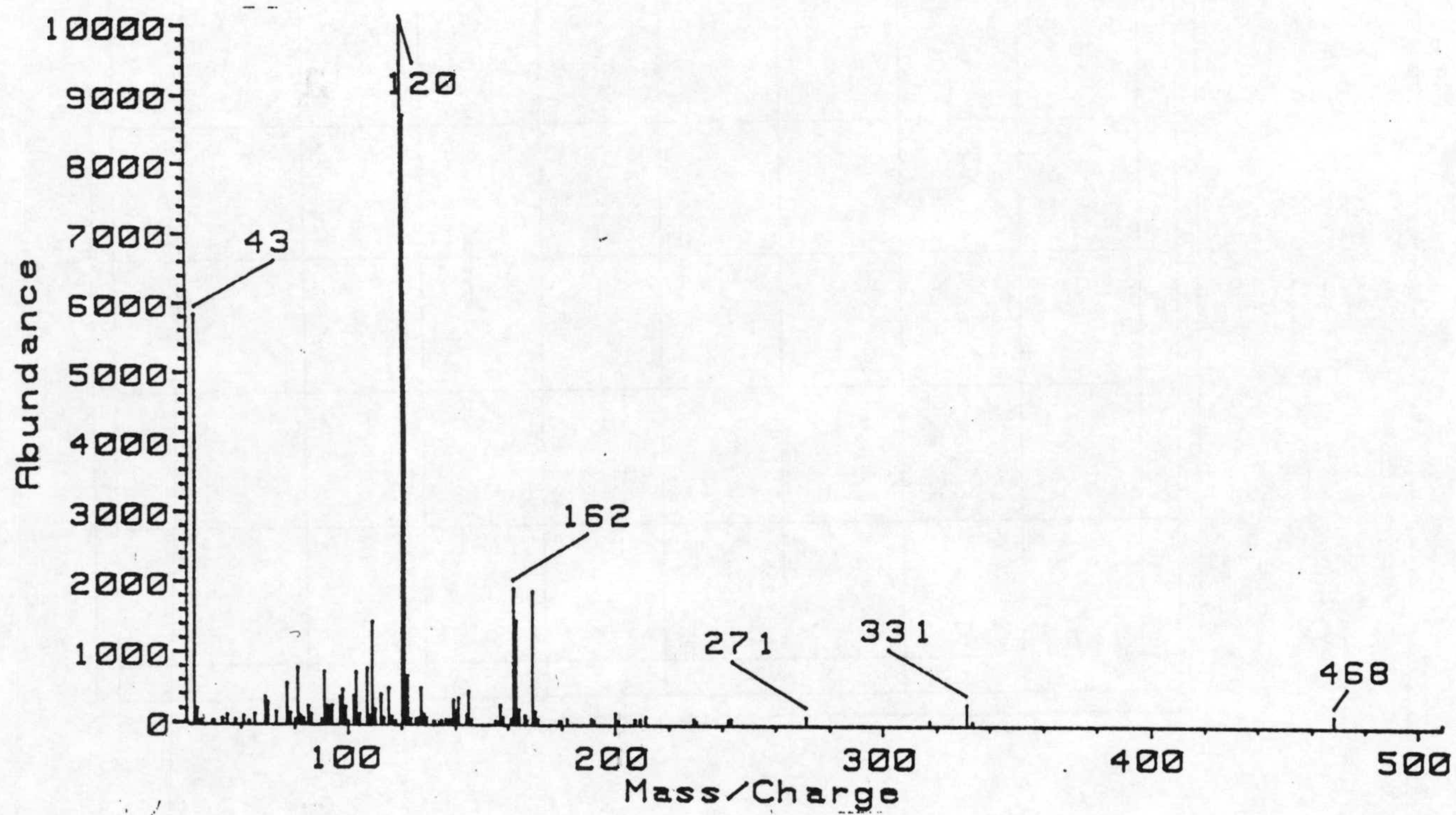
224

Espectro E-3'-g:Experiencia HETCOR del compuesto 3', 3,5-diacetoxifeniletanoacetoxi

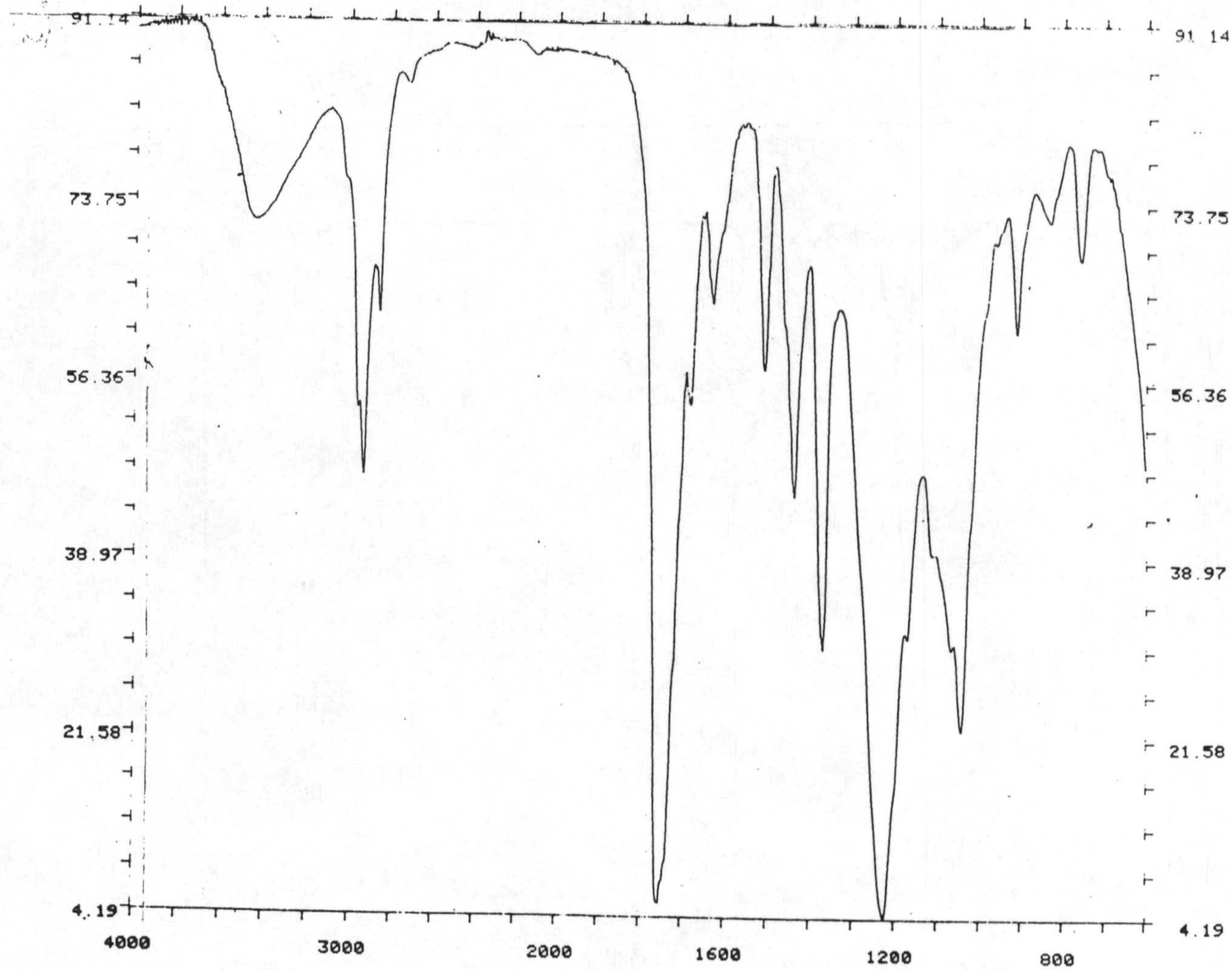
225



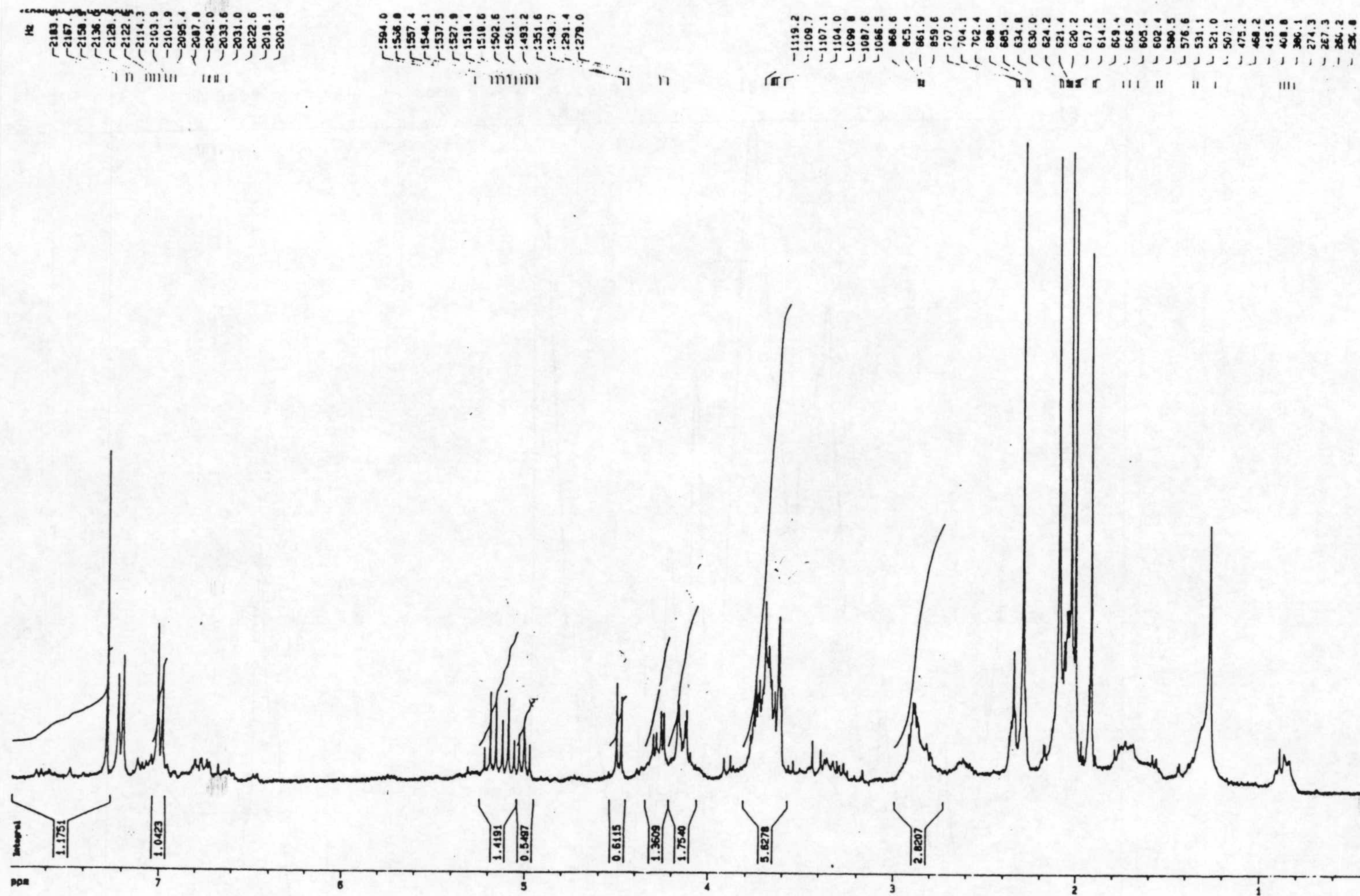
Espectro E-3'-g: Experiencia HETCOR del compuesto 3', 3,5-diacetoxifeniletanoacetoxi



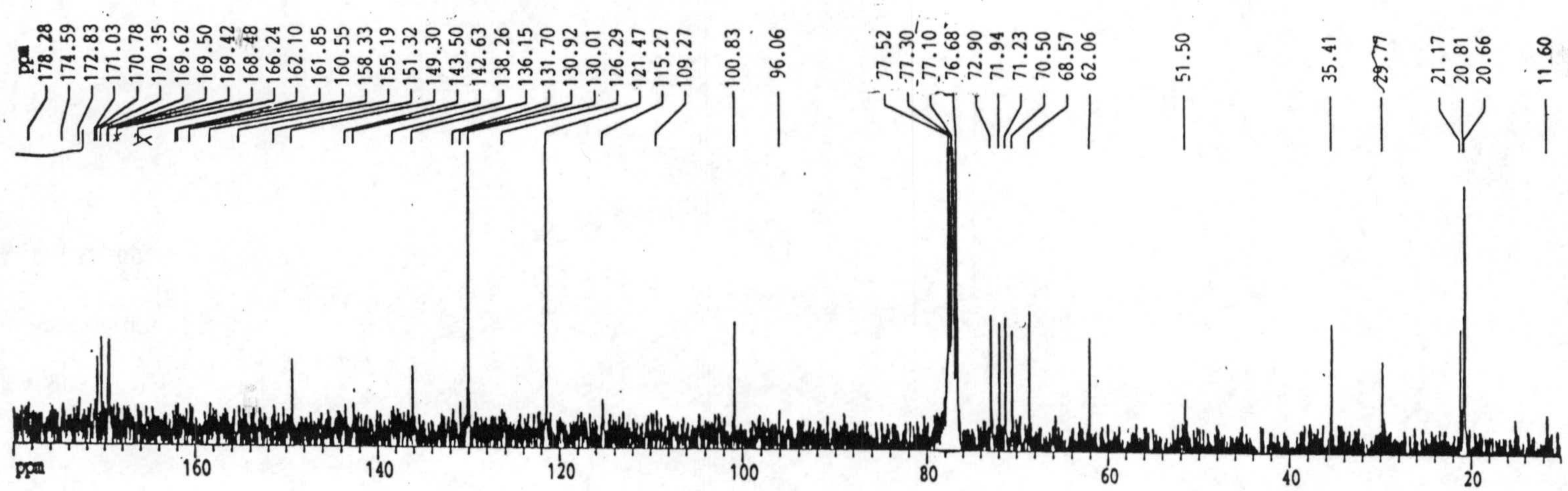
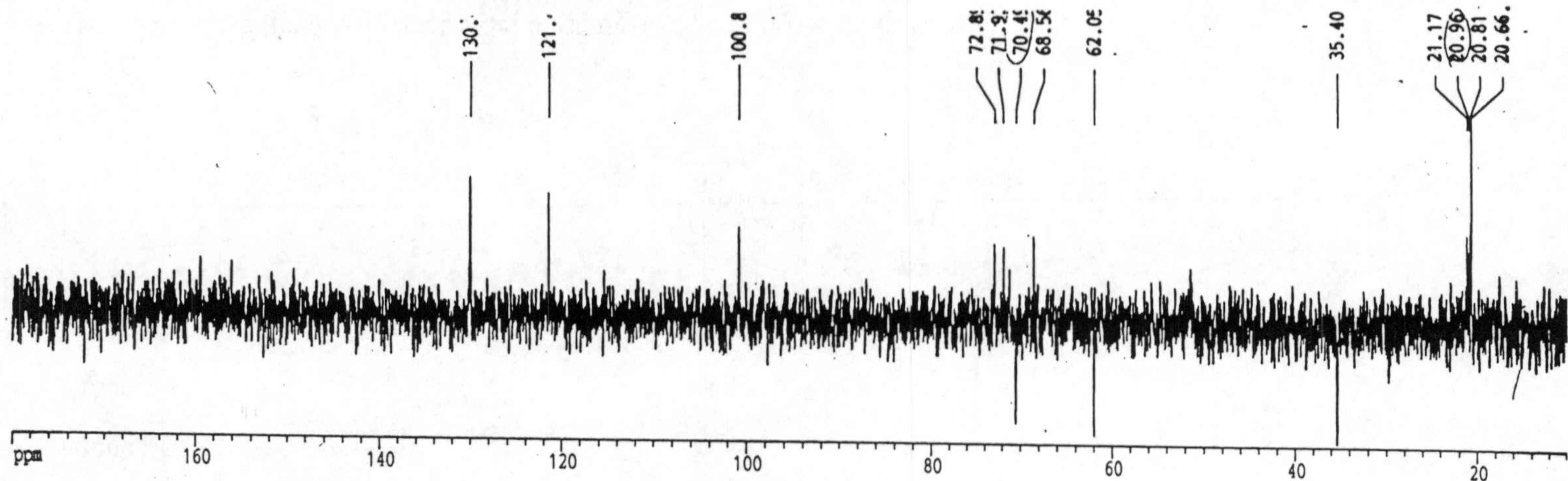
Espectro E-4'-a: Espectro de masas del compuesto 4', tetraacetoxi β -D-glucopiranosido-*o*-(*p*-acetoxifeniletanol)



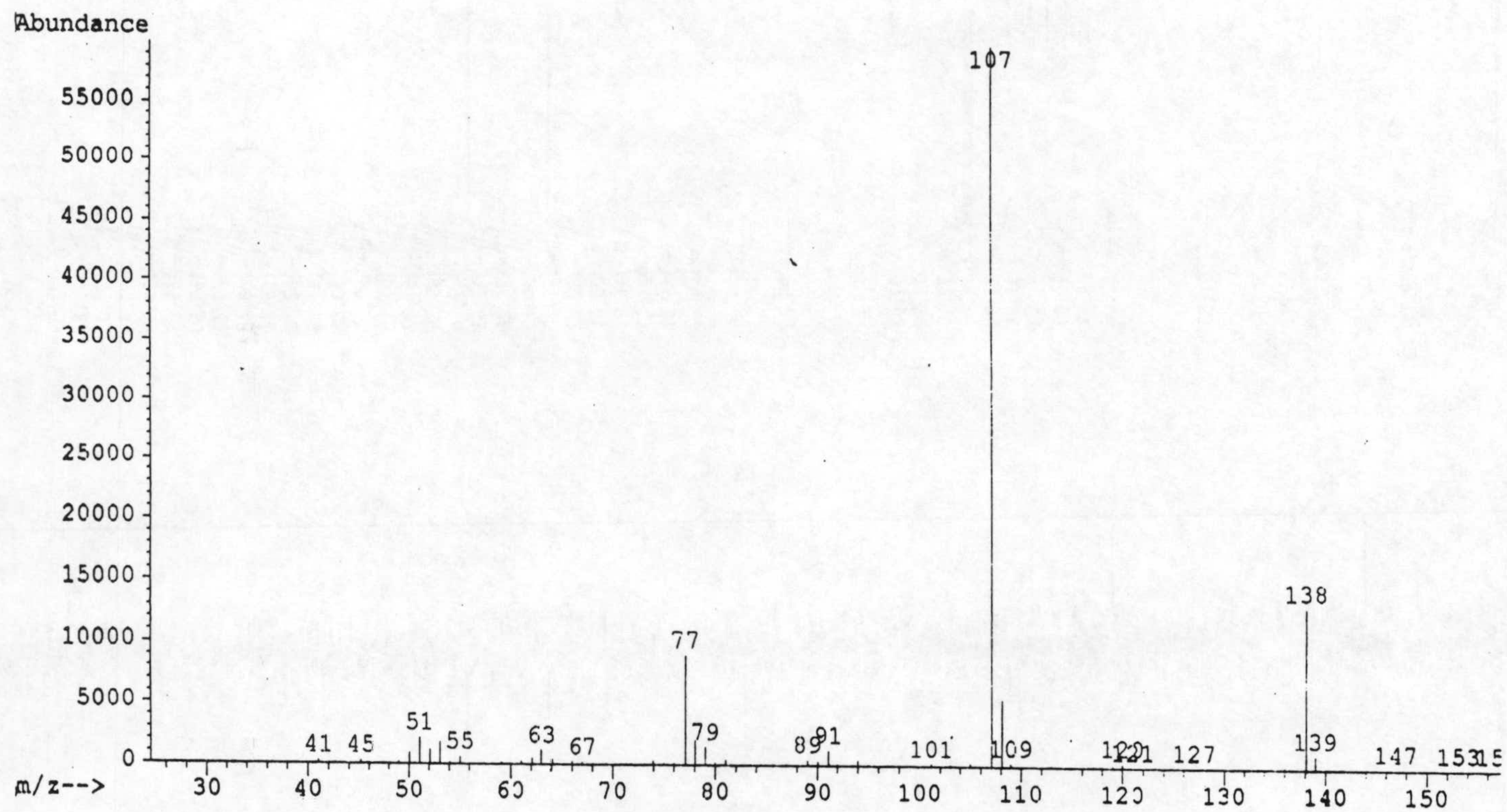
Espectro E-4'-b: Espectro de IR del compuesto 4', tetraacetoxi β -D-glucopiranosido-*o*-(*p*-acetoxifeniletanol)

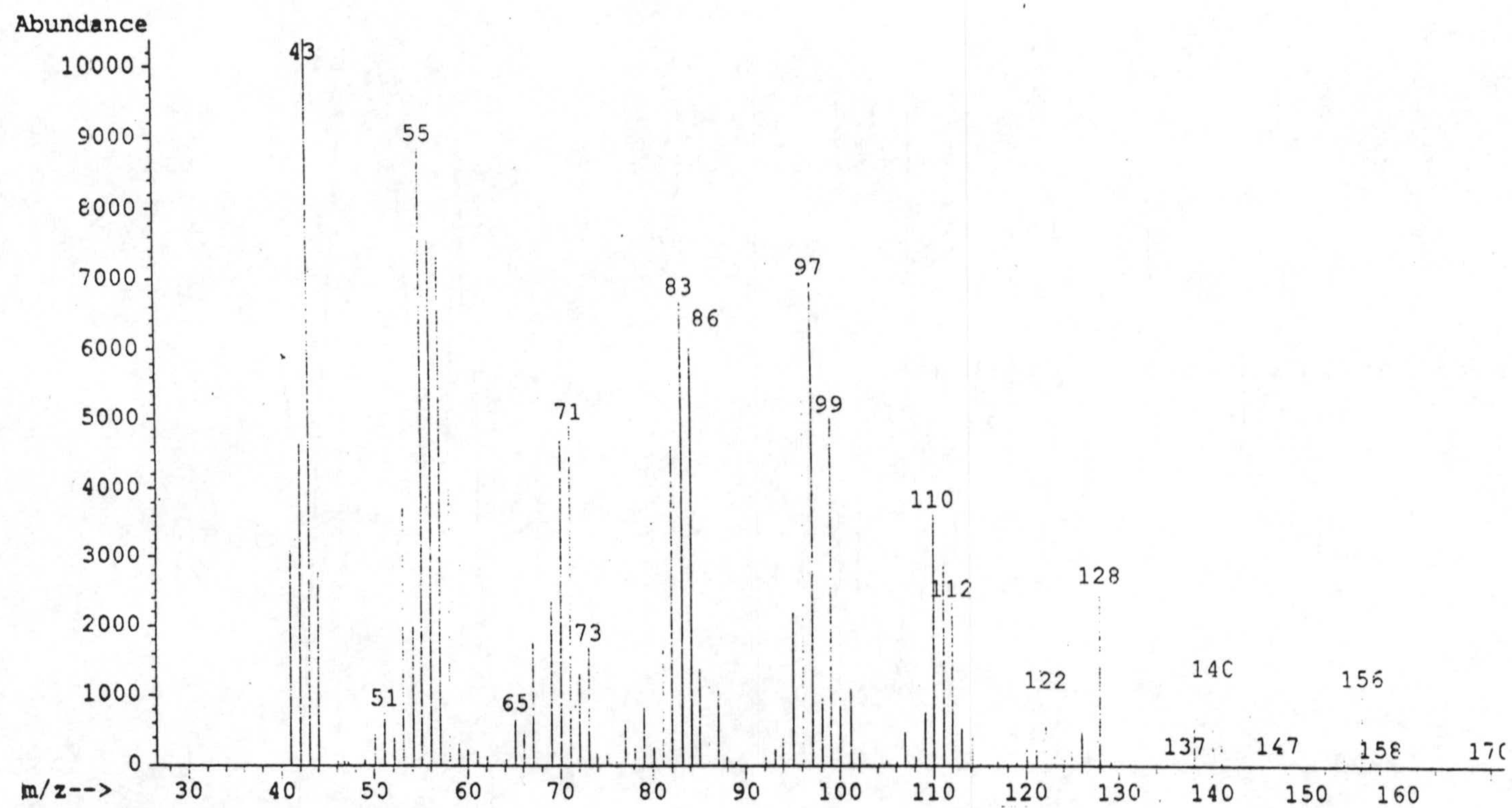


Espectro E-4'-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 4', tetraacetoxi β-D-glucopiranosido-*o*-(*p*-acetoxifeniletanol)

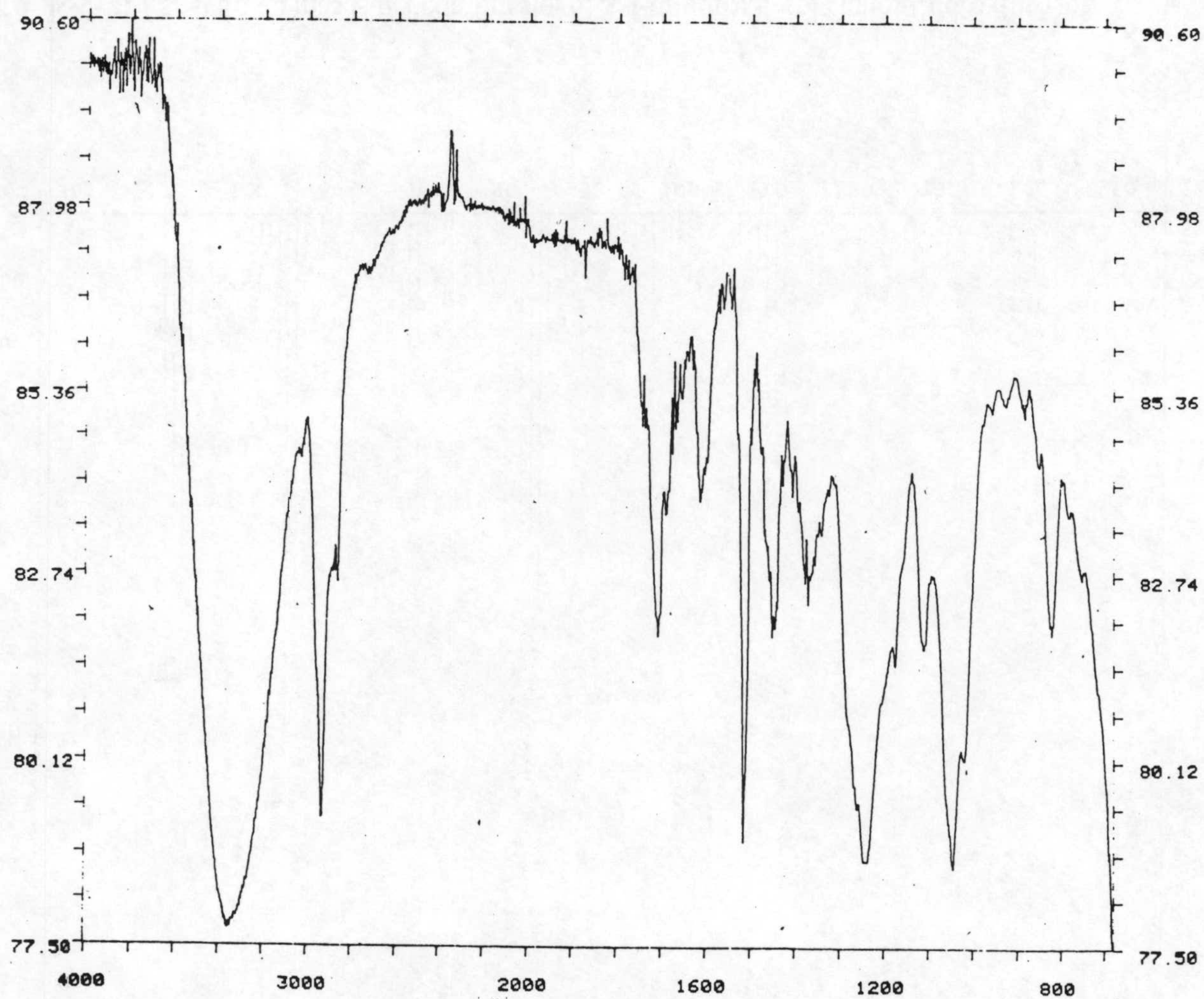


Espectro E-4'-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 4', tetraacetoxi β-D-glucopiranosido-*o*-(*p*-acetoxifeniletanol)

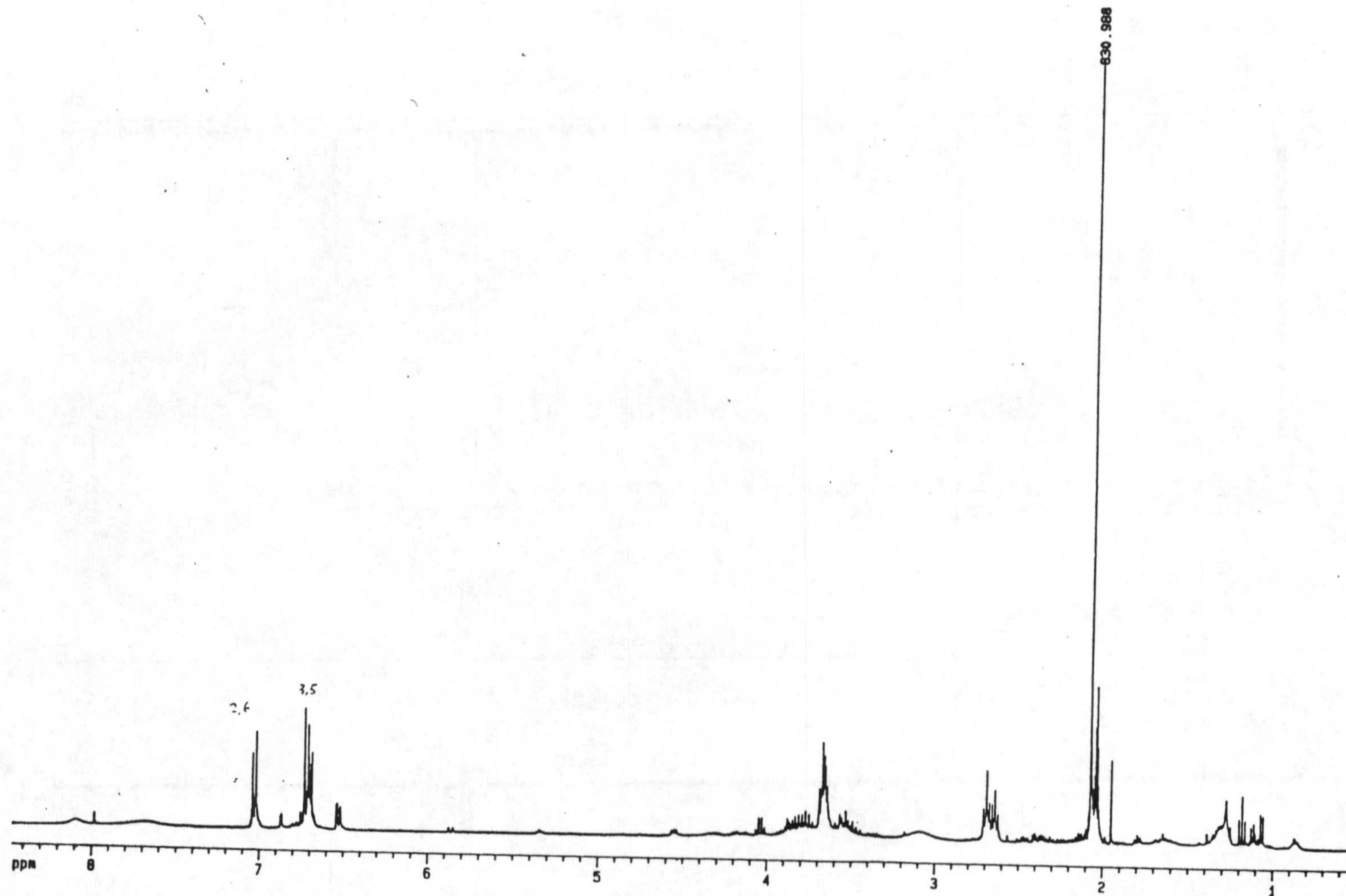
Espectro E-5-a: Espectro de masas del compuesto 5, *p*-hidroxifenilpropanol



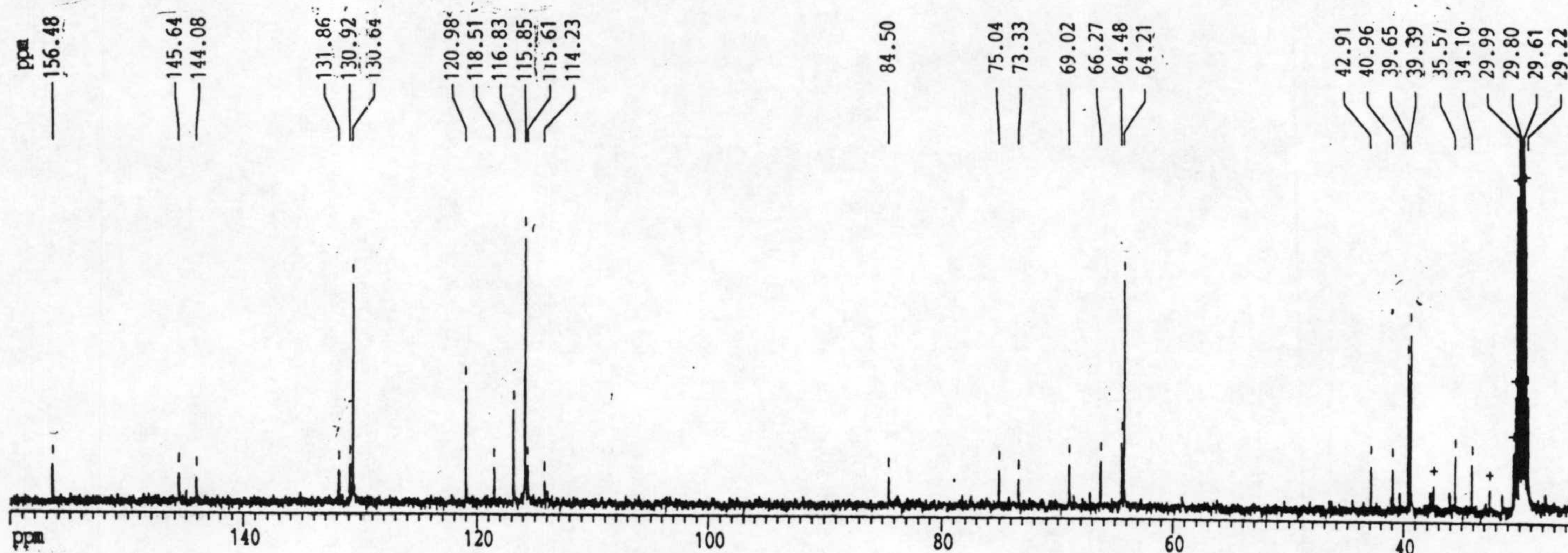
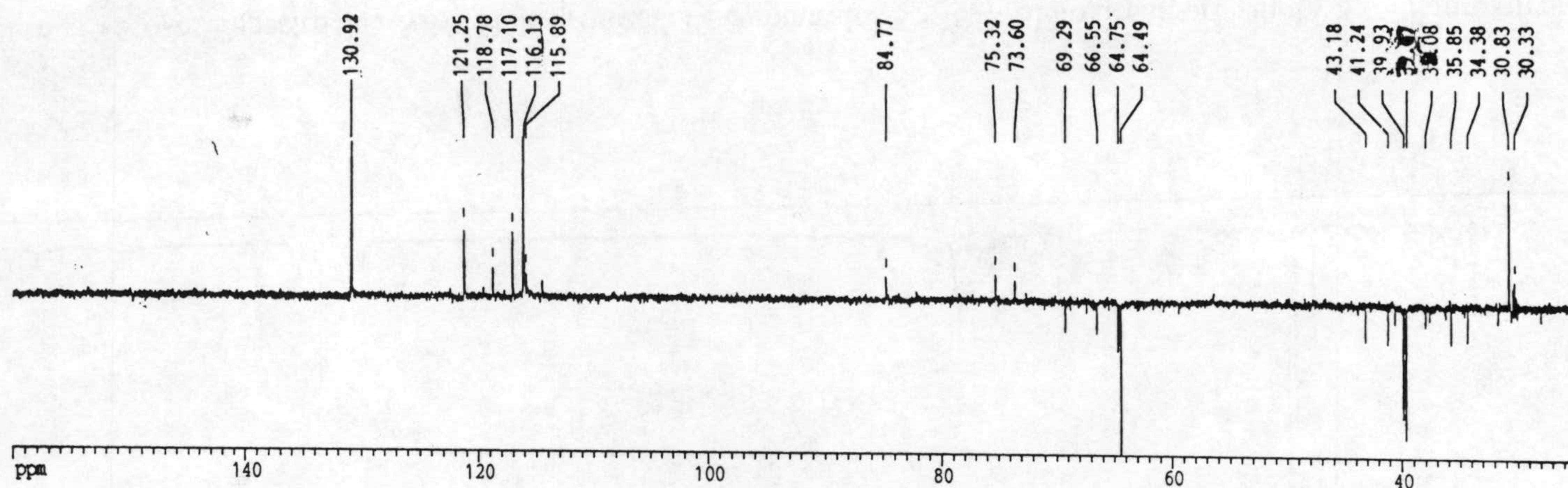
Espectro E-6-a: Espectro de masas del compuesto 6,3,4-dihidroxifenil etanol (hidroxitirosol)



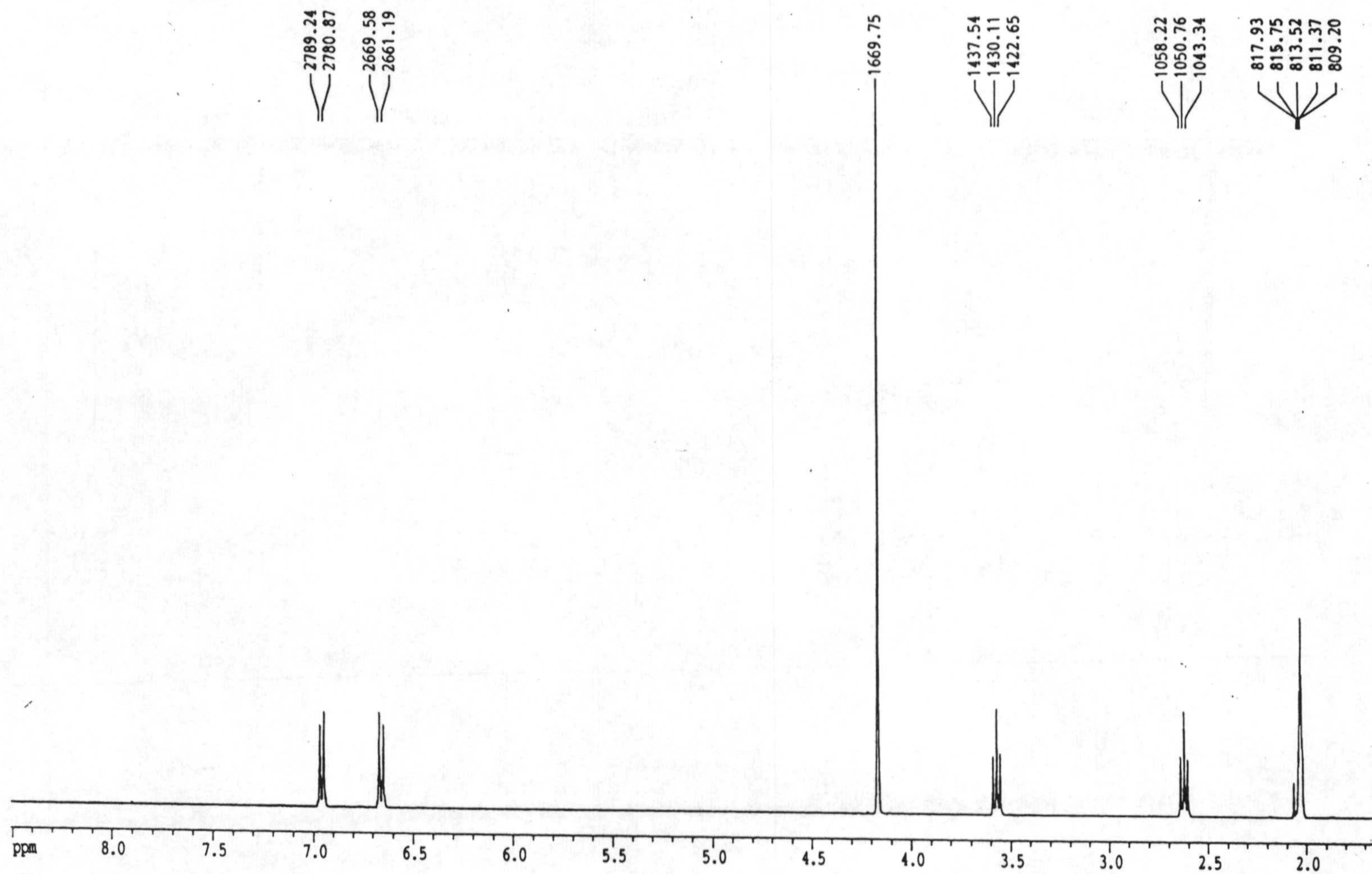
Espectro E-5,6-b: Espectro de IR de la mezcla de compuestos 5 y 6, *p*-hidroxifenil propanol y 3,4-dihidroxifenil ertanol (hidroxitirosol)



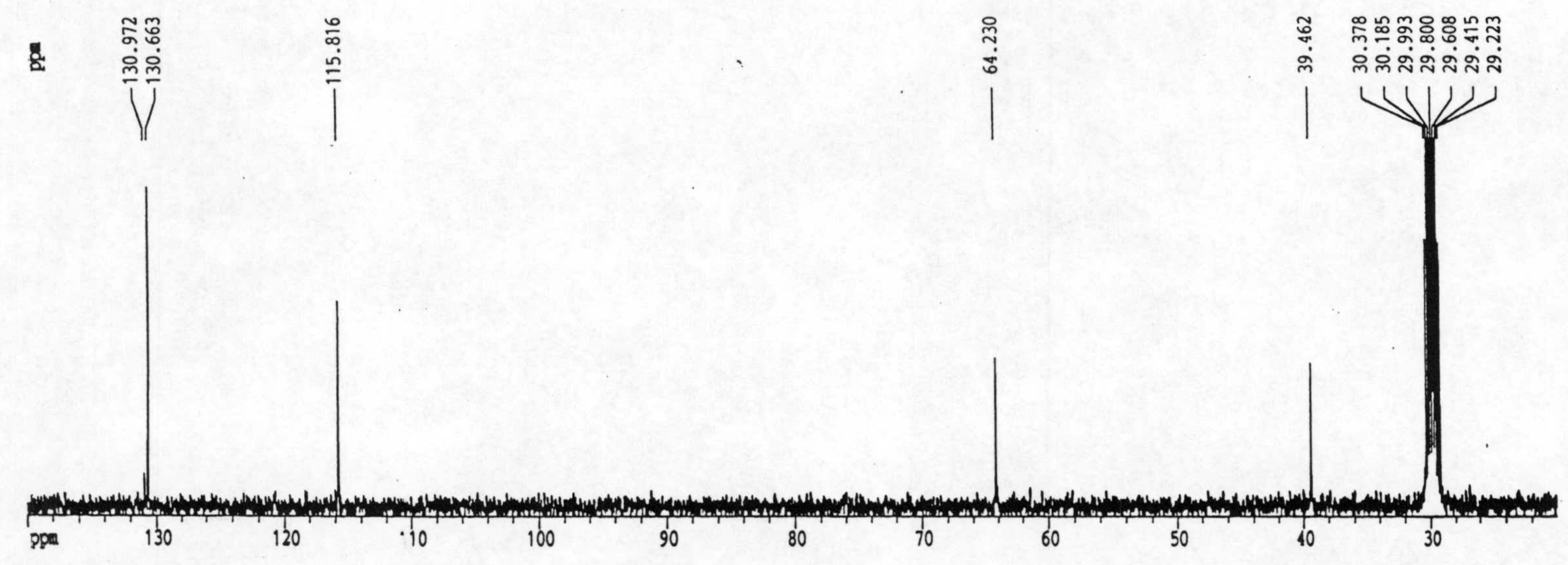
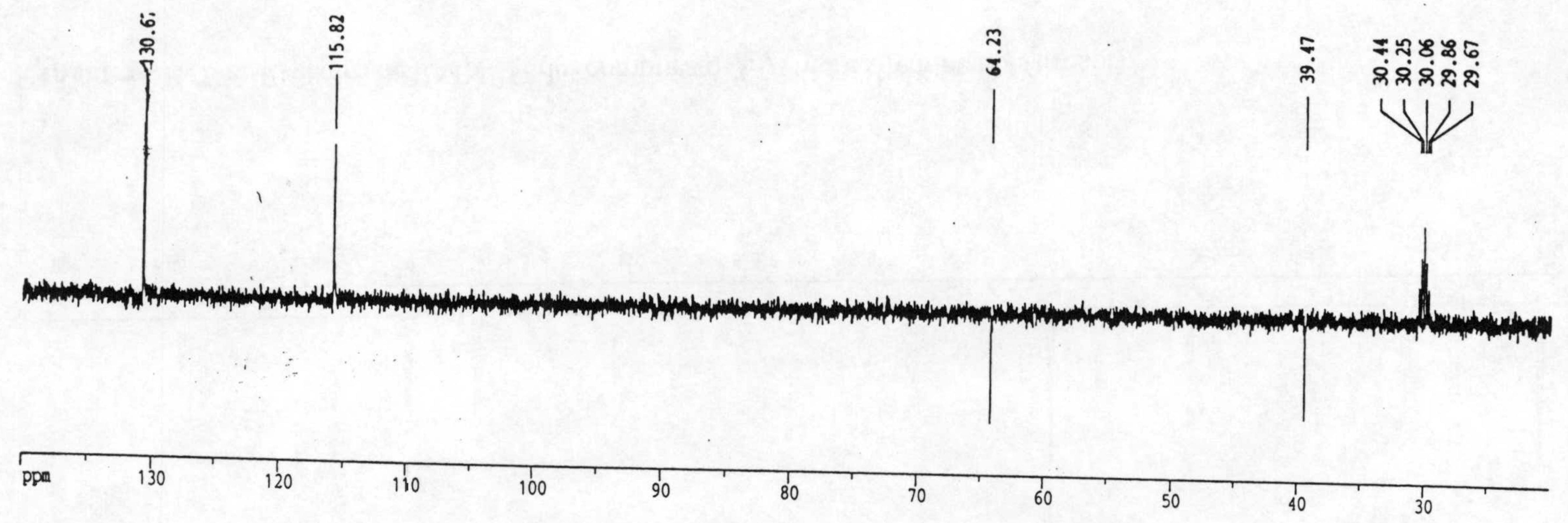
Especto E-5,6-c: Espectro de RMN-¹H de la mezcla de compuestos 5 y 6, *p*-hidroxifenil propanol y 3,4-dihidroxifenil ertanol (hidroxitirosol)



Espectro E-5,6-d: Espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla de compuestos 5 y 6, *p*-hidroxifenil propanol y 3,4-dihidroxifenil ertanol (hidroxitirosol)

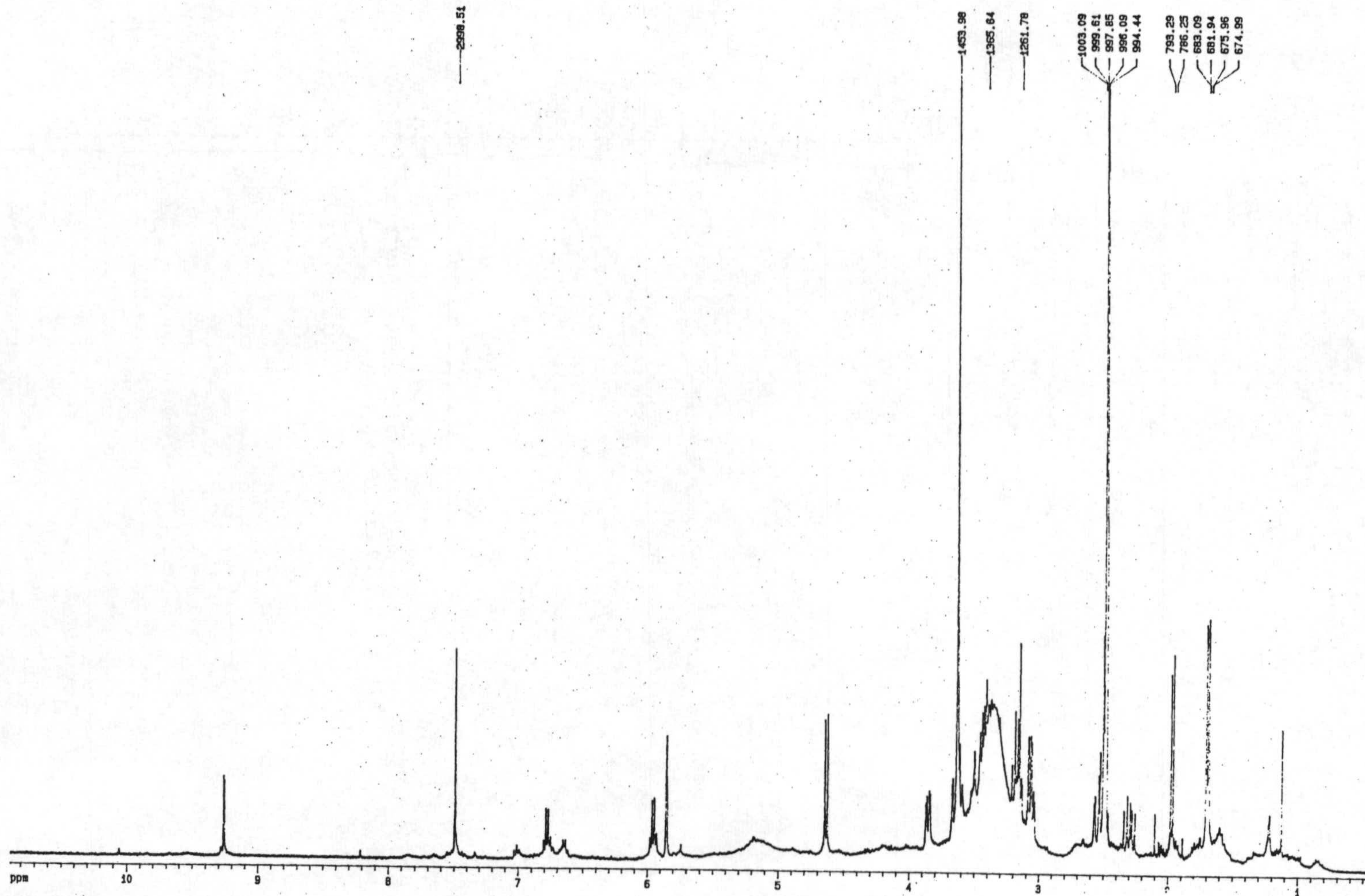


Espectro E-7-c: Espectro de RMN- ^1H del compuesto 7, *p*-hidroxifeniletanol (tirosol)

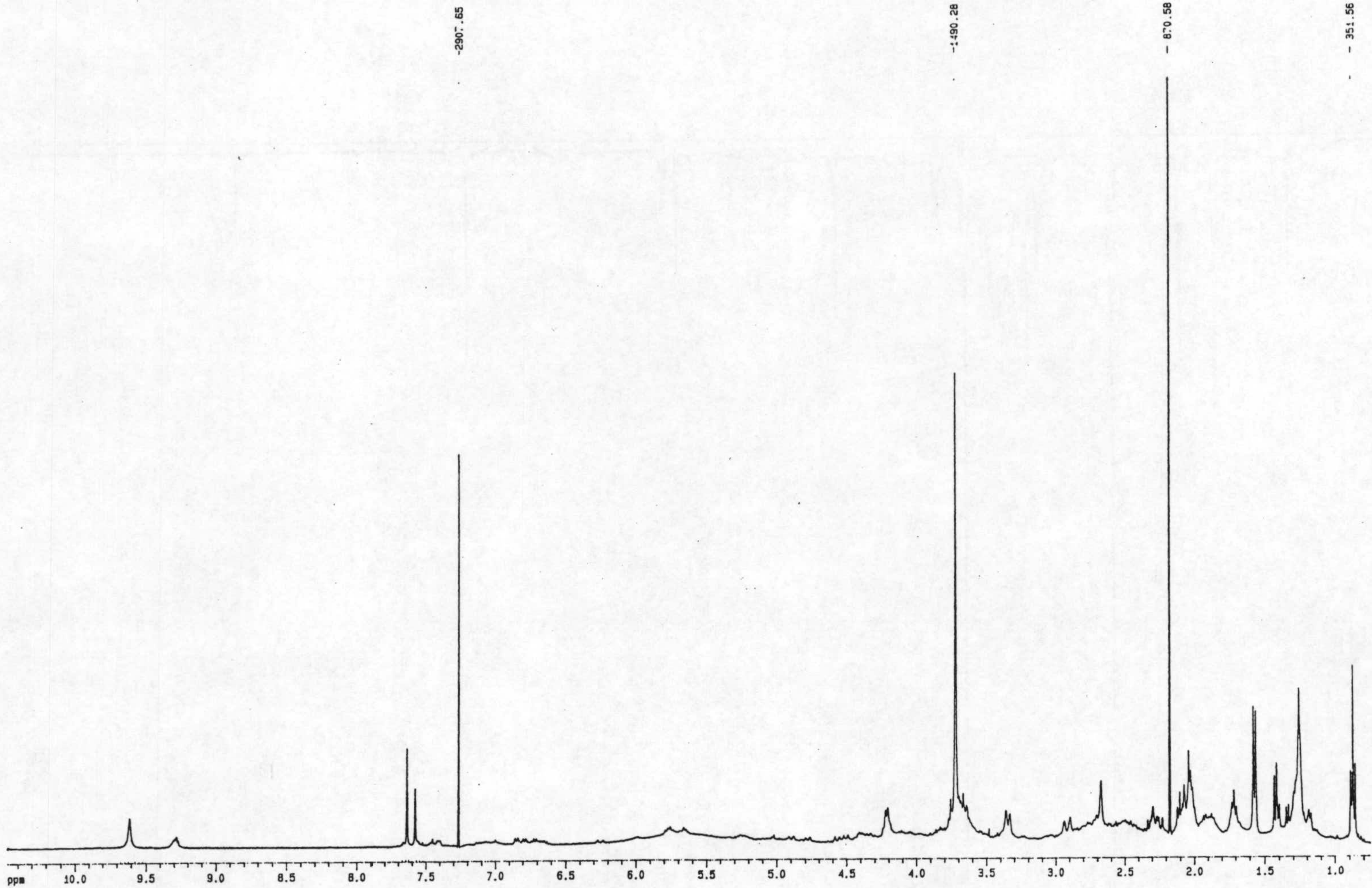


236

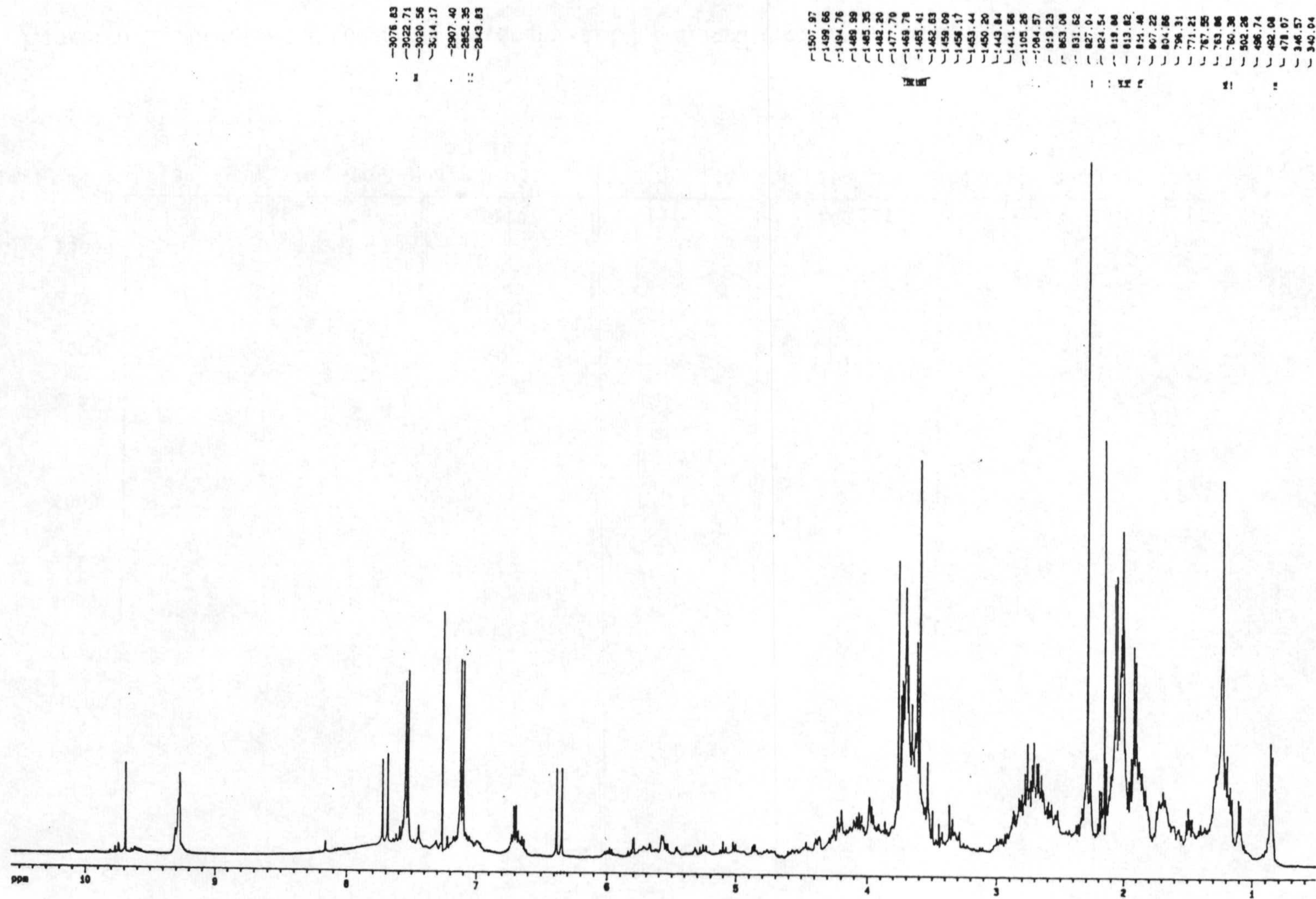
Espectro E-7-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 7, *p*-hidroxifeniletanol (tirosol)



Espectro E-G12-c: Espectro de RMN-¹H de la fracción G 12 de la cromatografía G

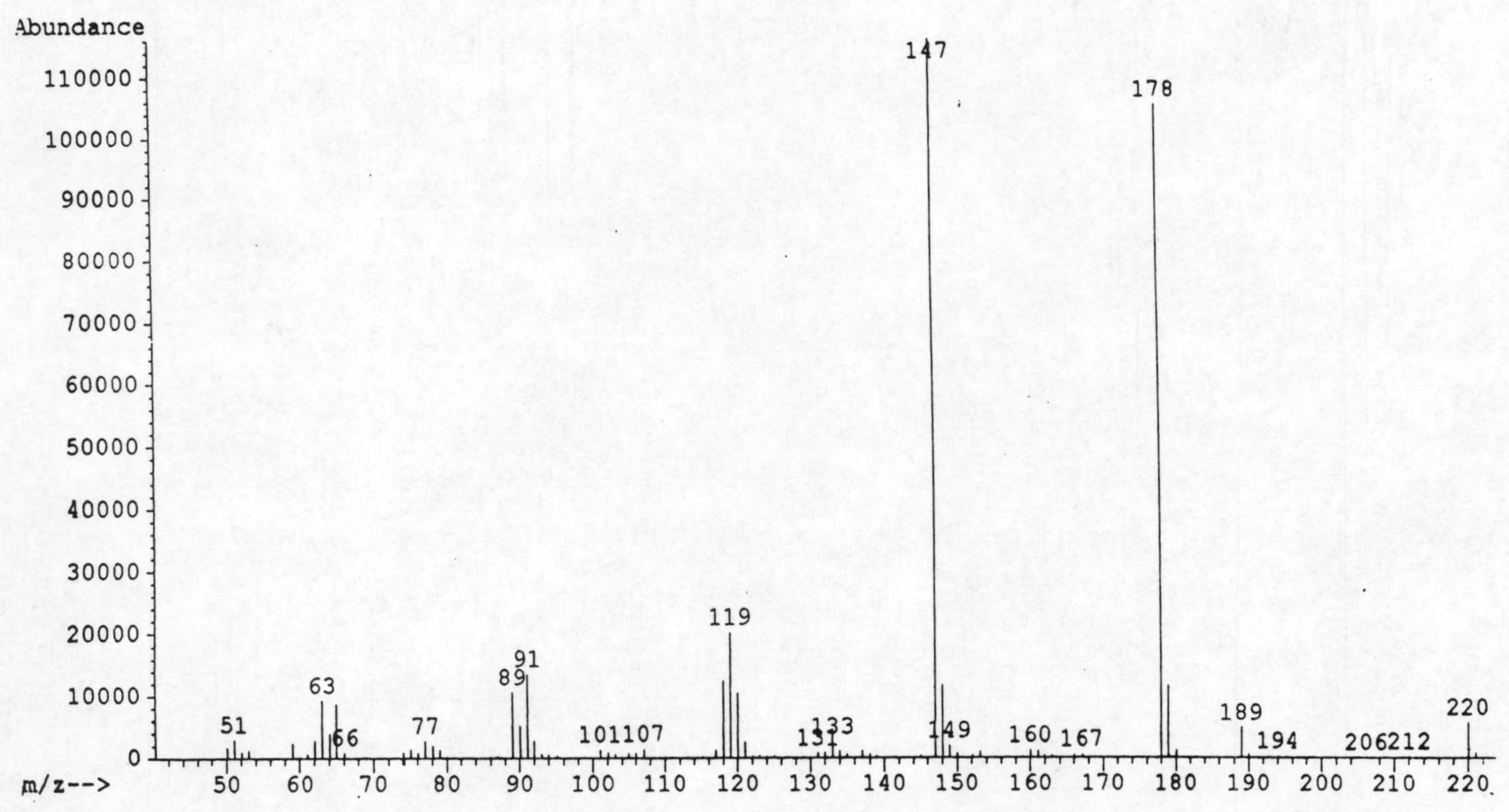


Espectro E-8-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 8, 2,4,6-trimetoxibenzaldehído

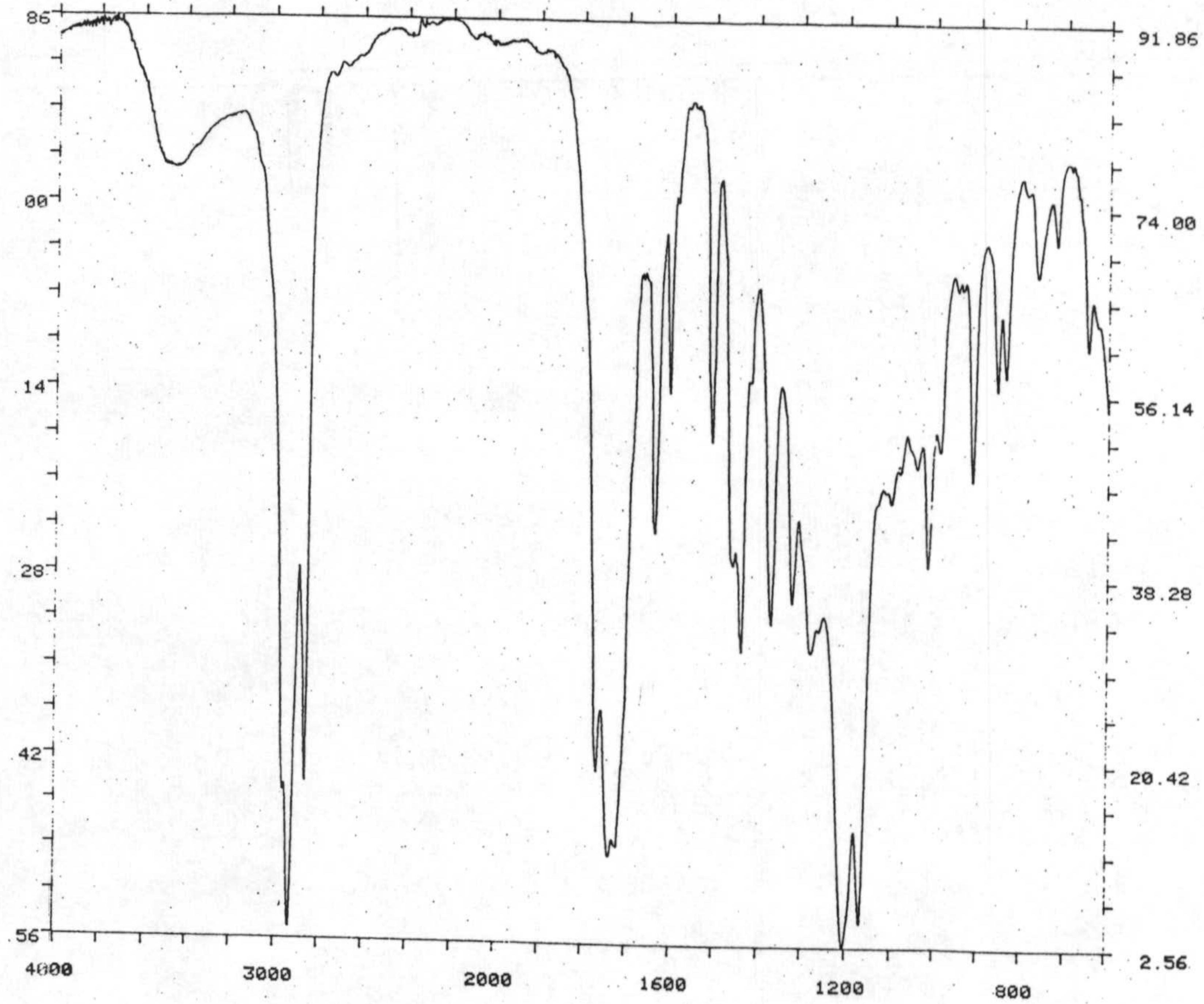


Espectro E-9-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 9, 3-(*p*-acetoxifenil)-2-propen-1-al

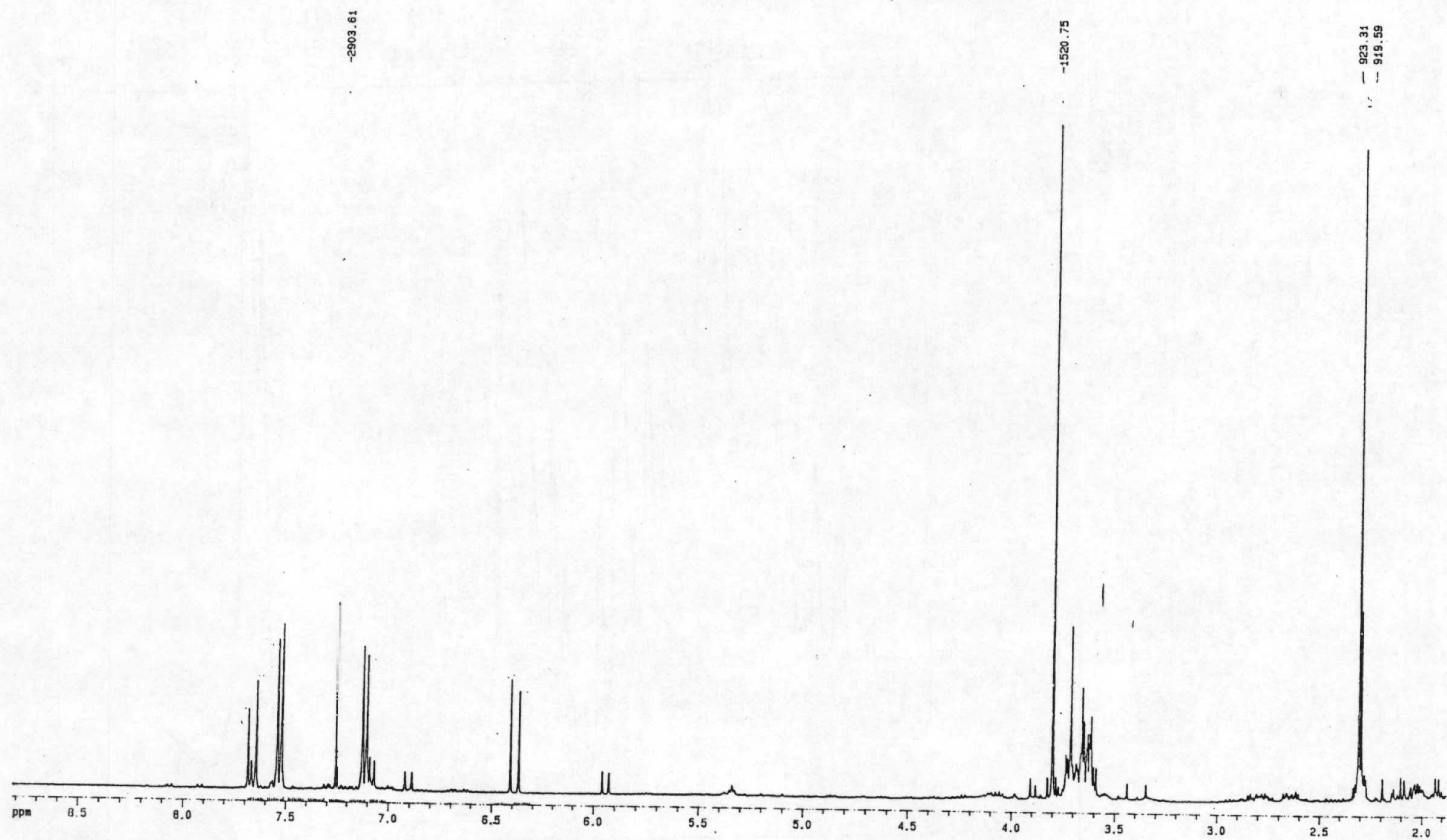
240



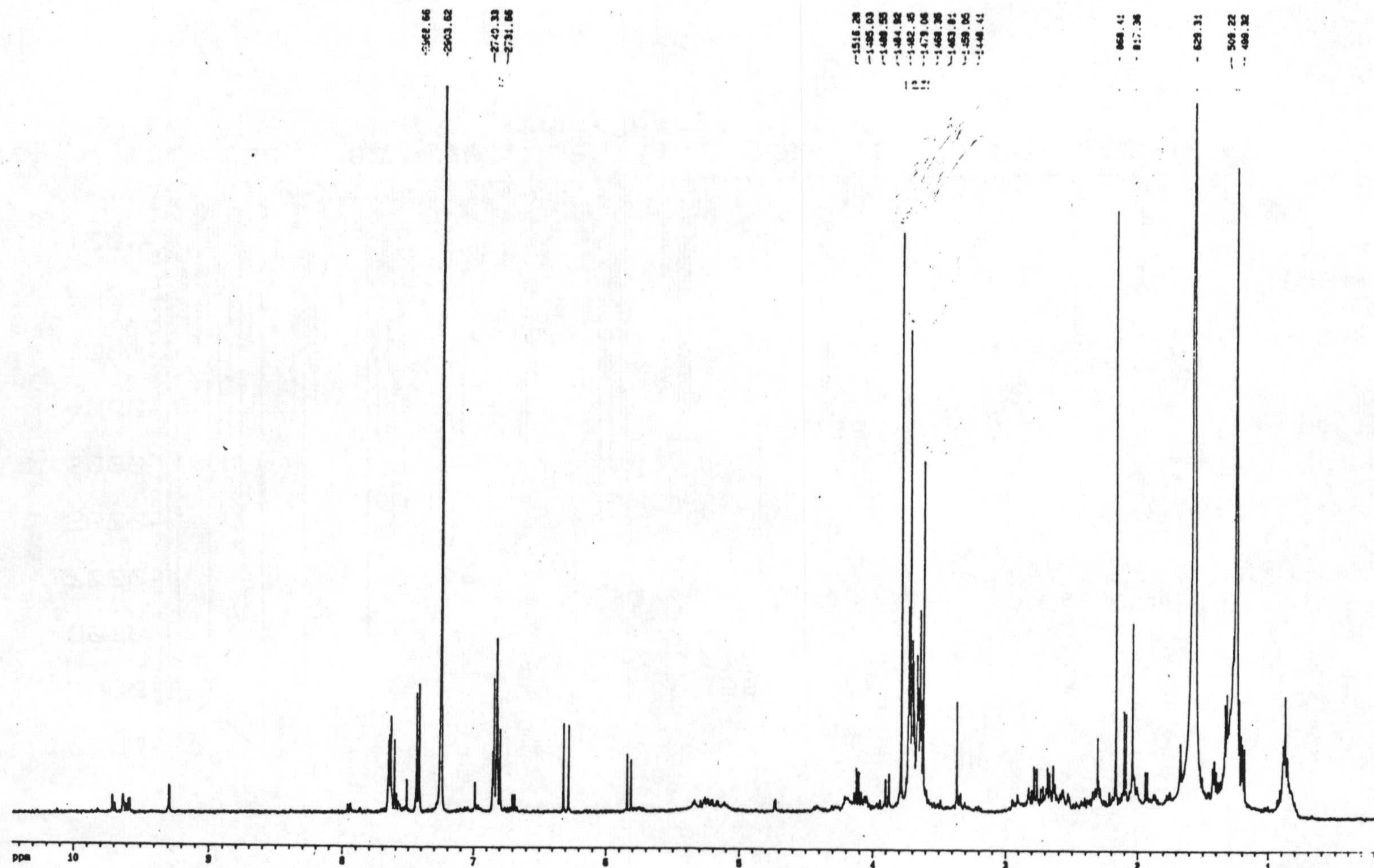
Espectro E-10-a: Espectro de masas del compuesto 10, *p*-acetoxicumarato de metilo



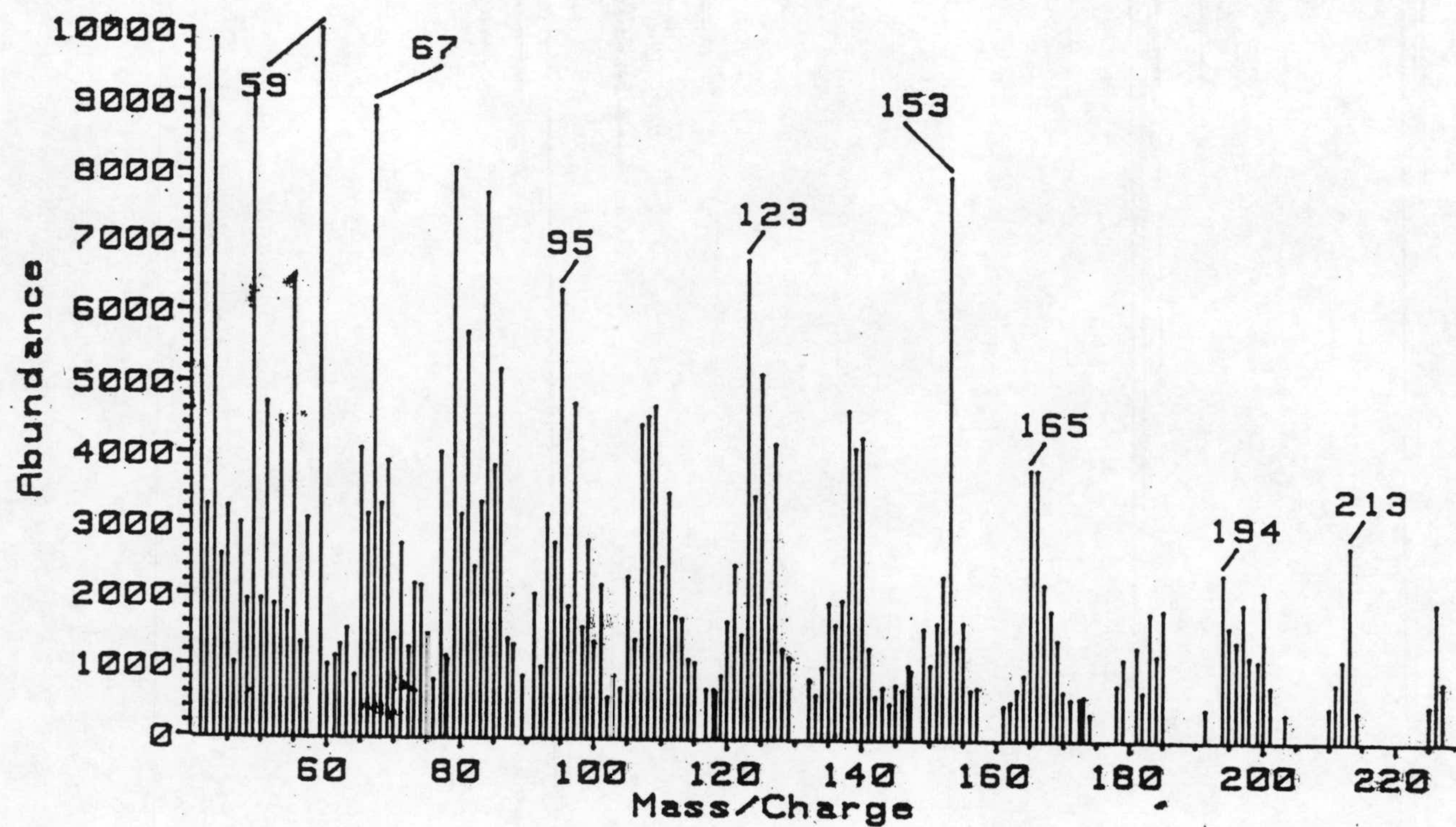
Espectro E-10-b: Espectro de IR del compuesto 10, *p*-acetoxicumarato de metilo



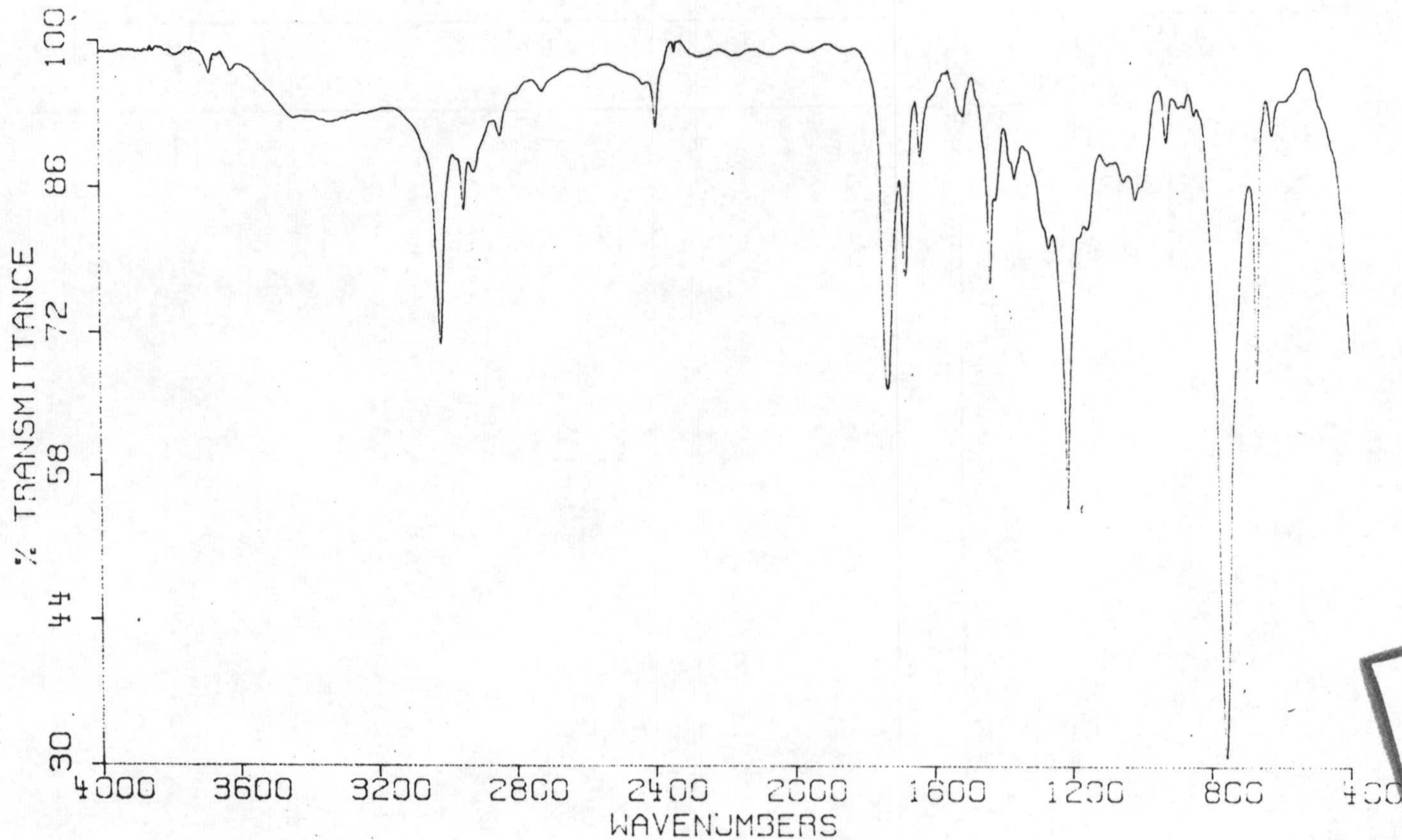
Espectro E-10-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 10, p-acetoxicumarato de metilo



Espectro E-K2-c: Espectro de RMN-¹H de la mezcla del compuesto 10 y posiblemente el *cis-p*-metoxicumarato de metilo

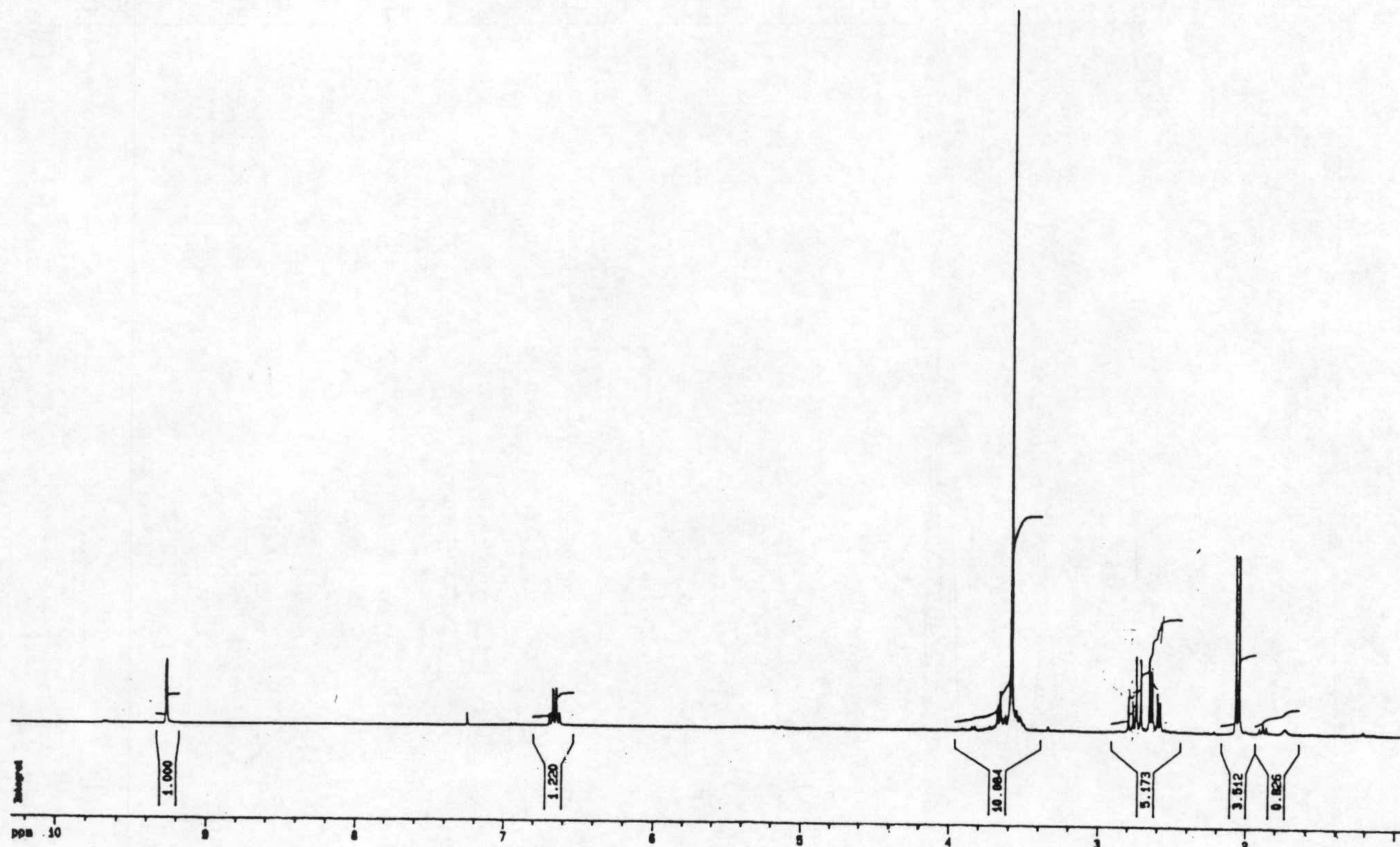


Espectro E-11-a: Espectro de masas del compuesto 11, ácido 3-[1-(formil)-(E)1-propenil] glutárico

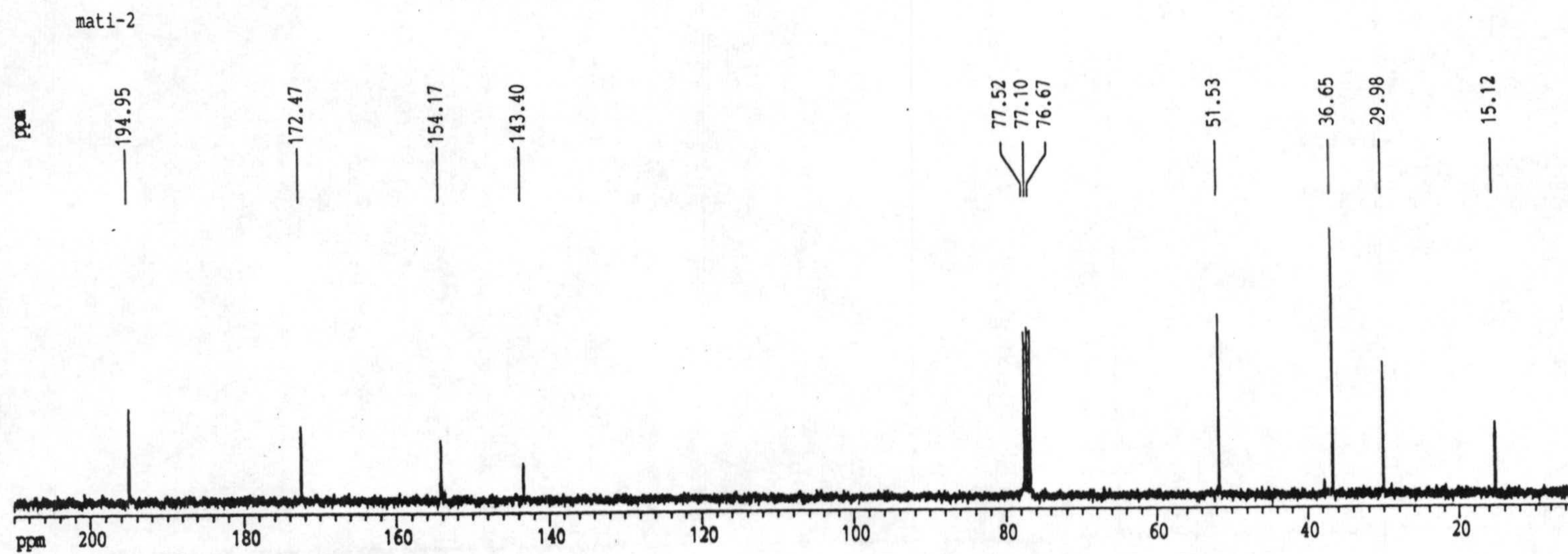
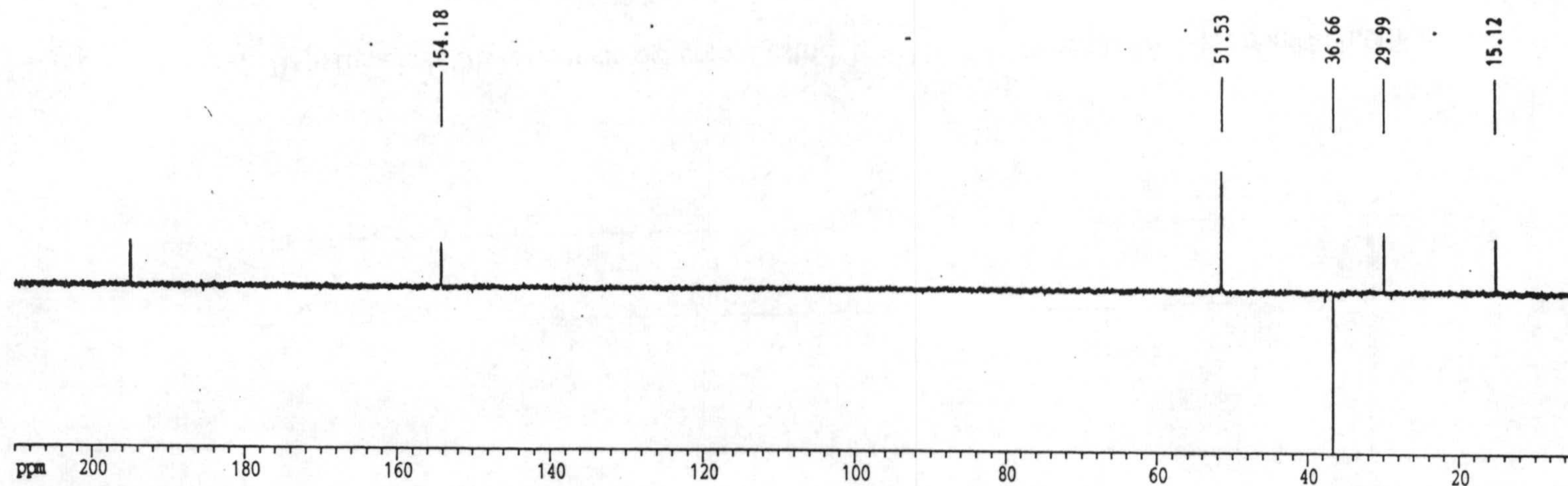


Espectro E-11-b: Espectro de IR del compuesto 11, ácido 3-[1-(formil)-(E)1-propenil] glutárico

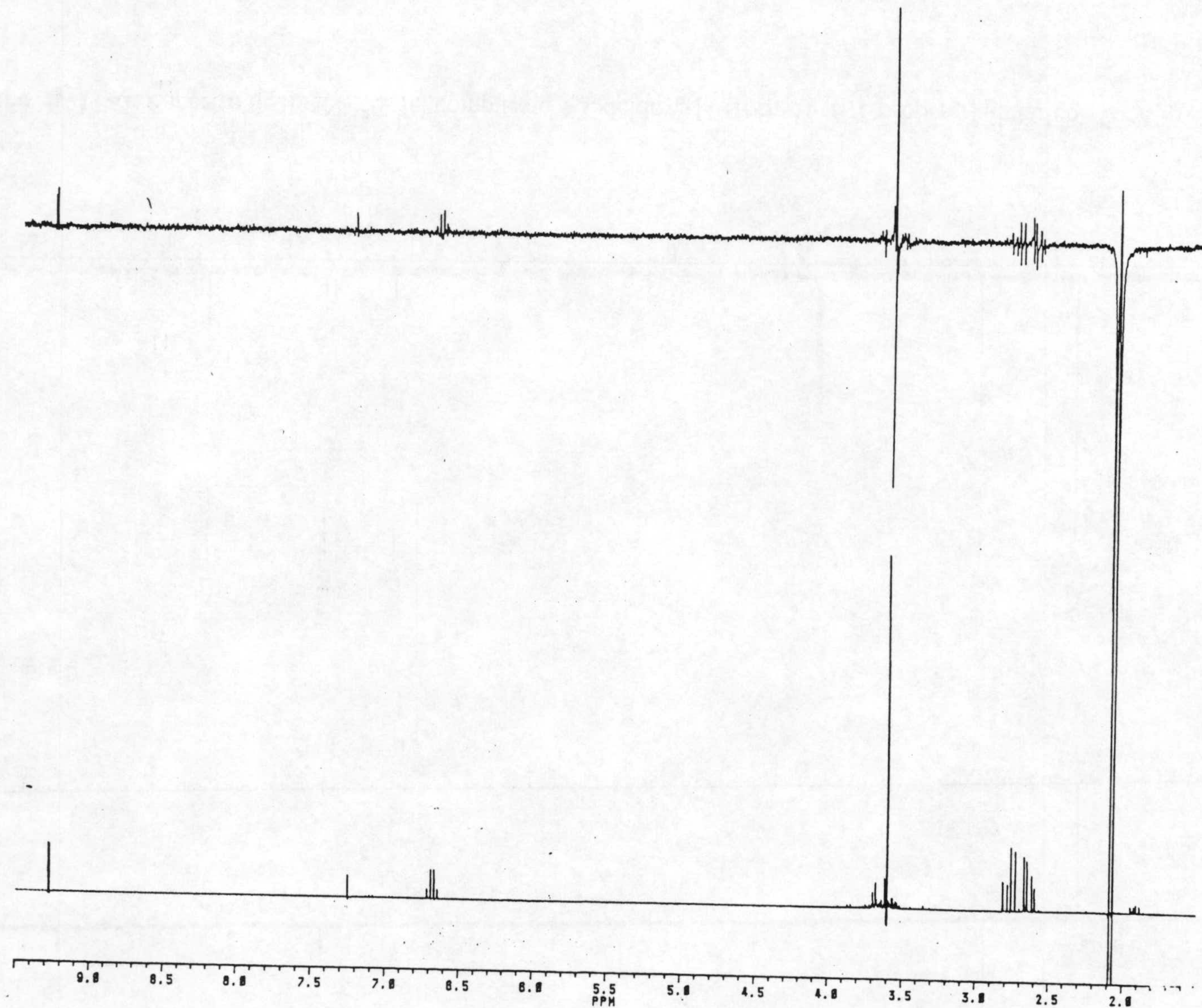
UNIVERSIDAD DE GRANADA
18 JUL. 1999
COMISION DE DOCTORADO



Espectro E-11-c: Espectro de RMN- ^1H del compuesto 11, ácido 3-[1-(formil)-(E)1-propenil] glutárico

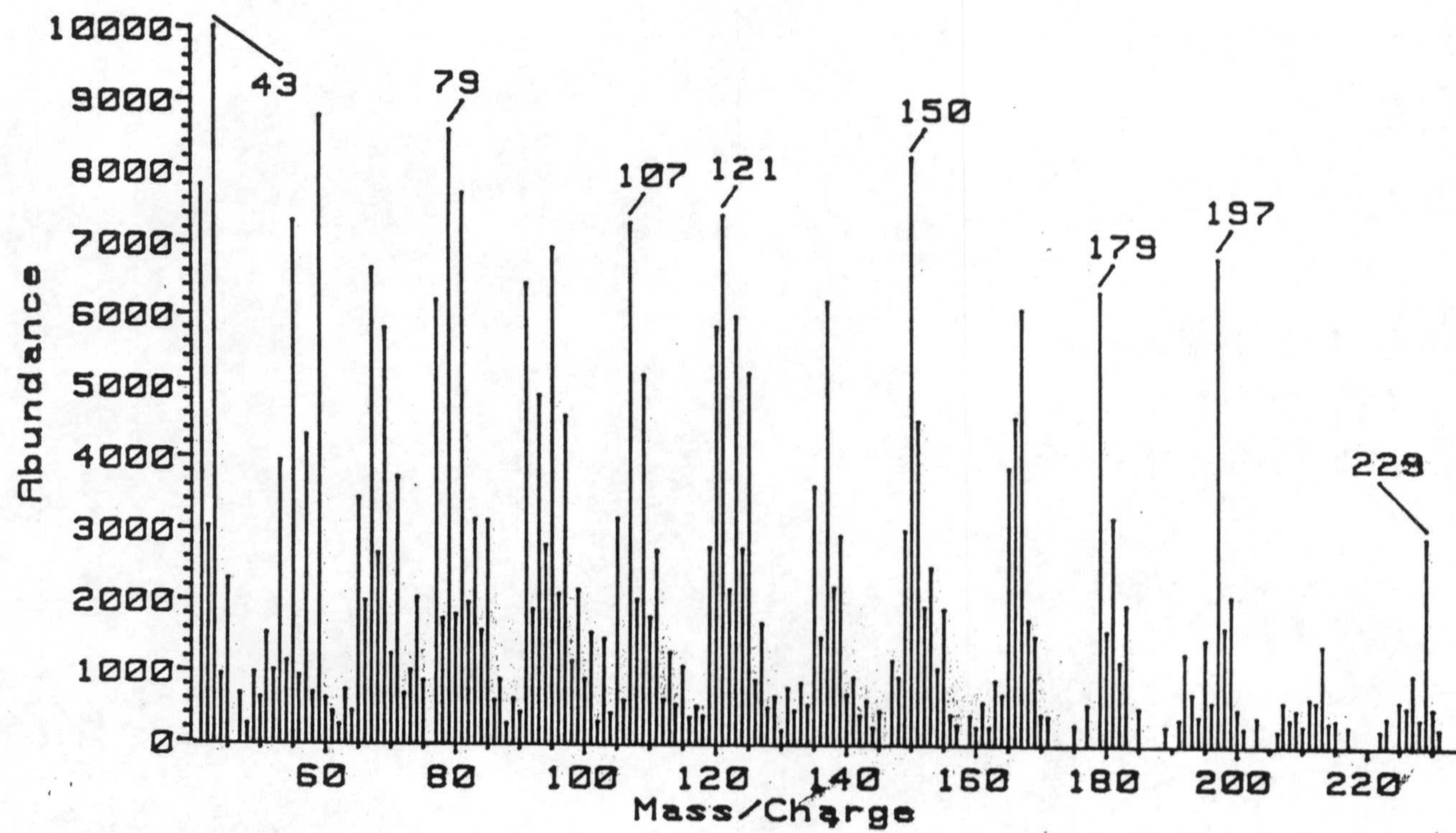


Espectro E-11-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 11, ácido 3-[1-(formil)-(E)1-propenil] glutárico

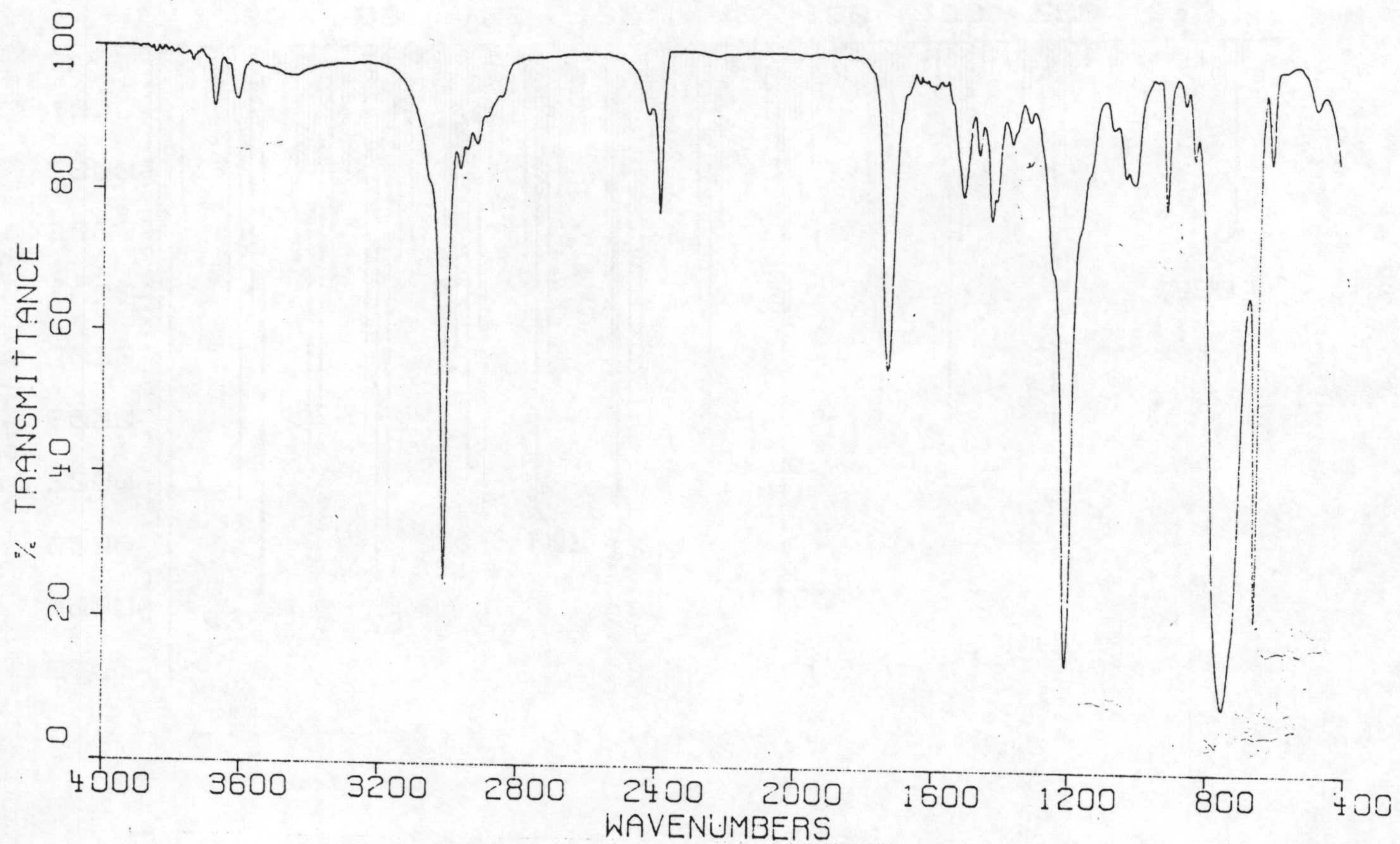


248

Espectro E-11-f: Experiencia NOE diferencia del compuesto 11, ácido 3-[1-(formil)-(E)1-propenil] glutárico

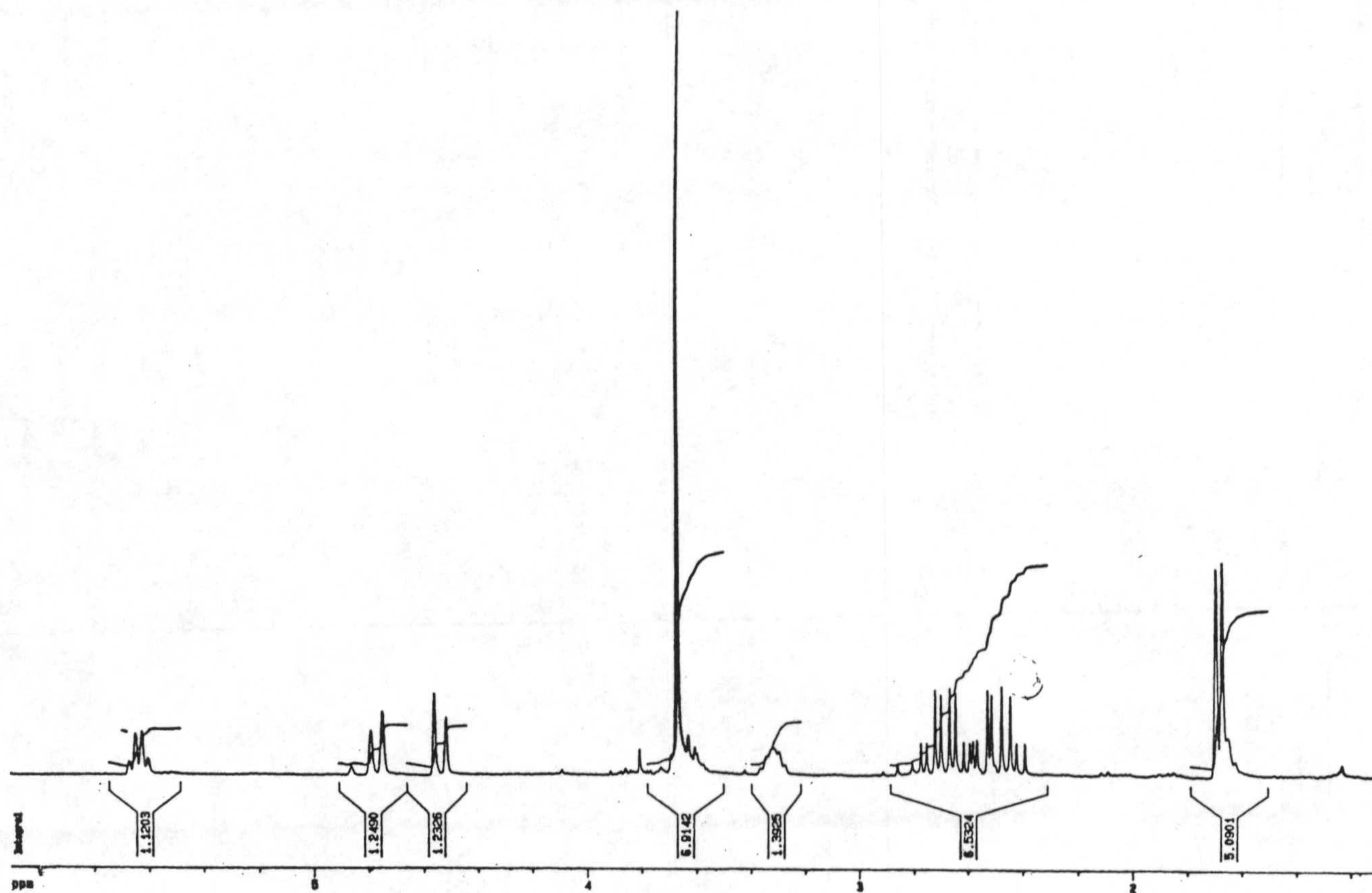


Espectro E-12-a: Espectro de masas del compuesto 12, ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E)1-propenil] glutárico

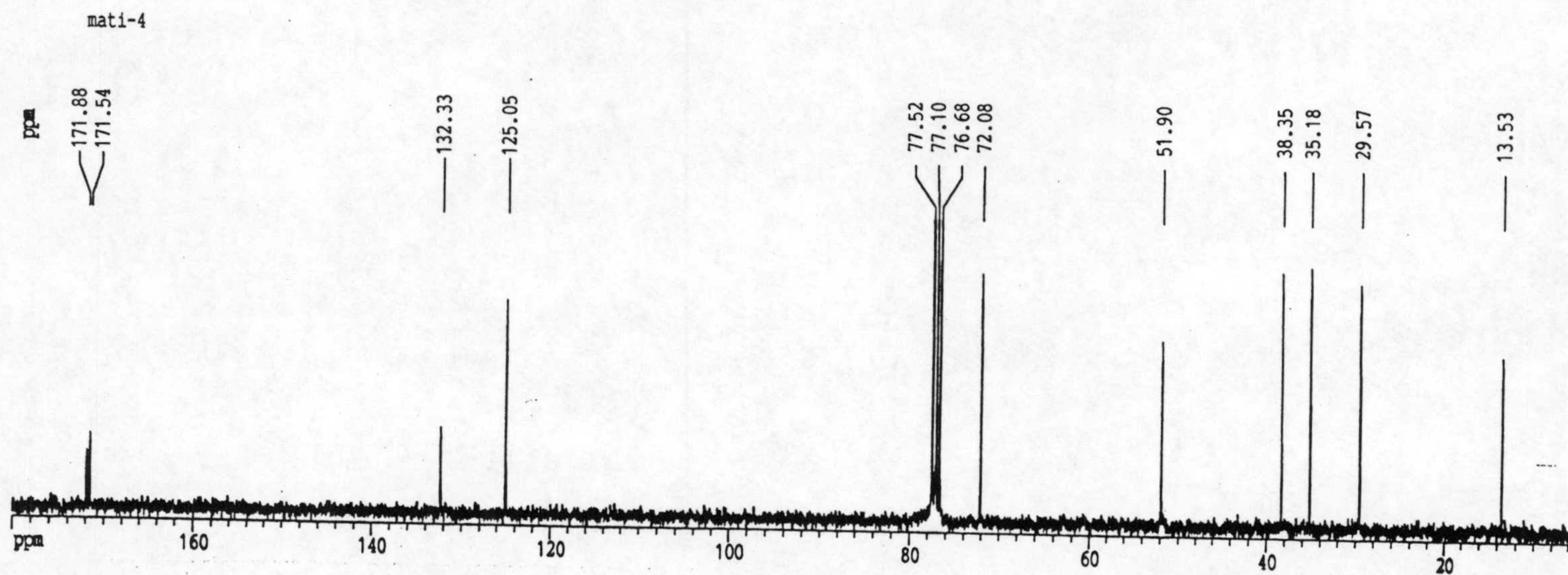
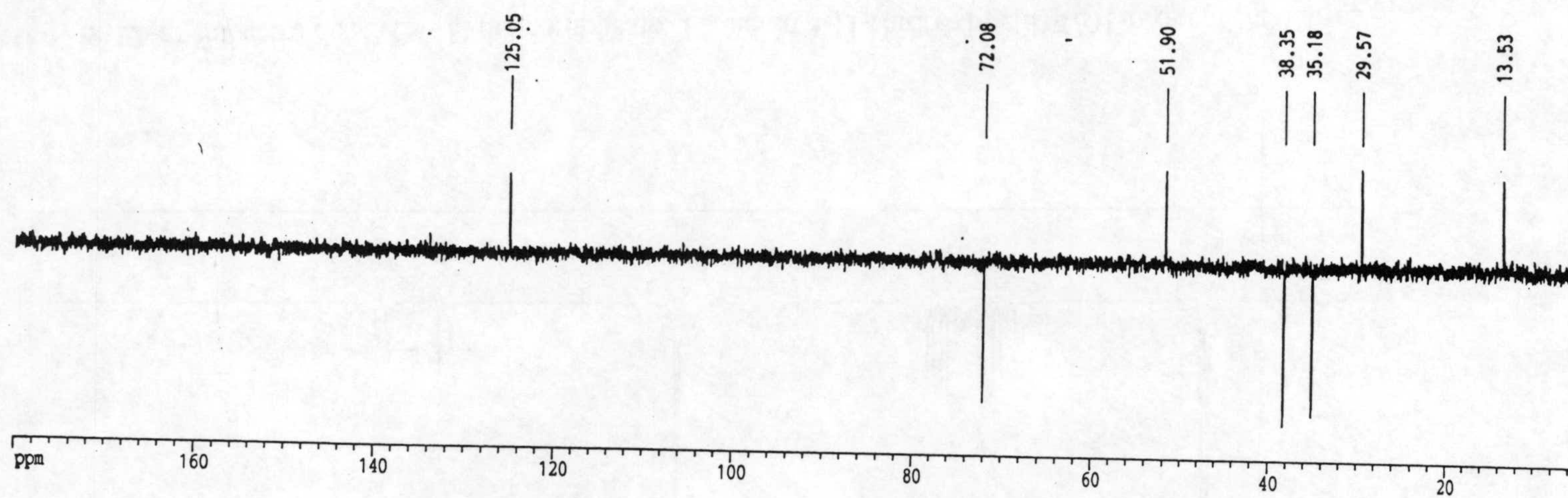


250

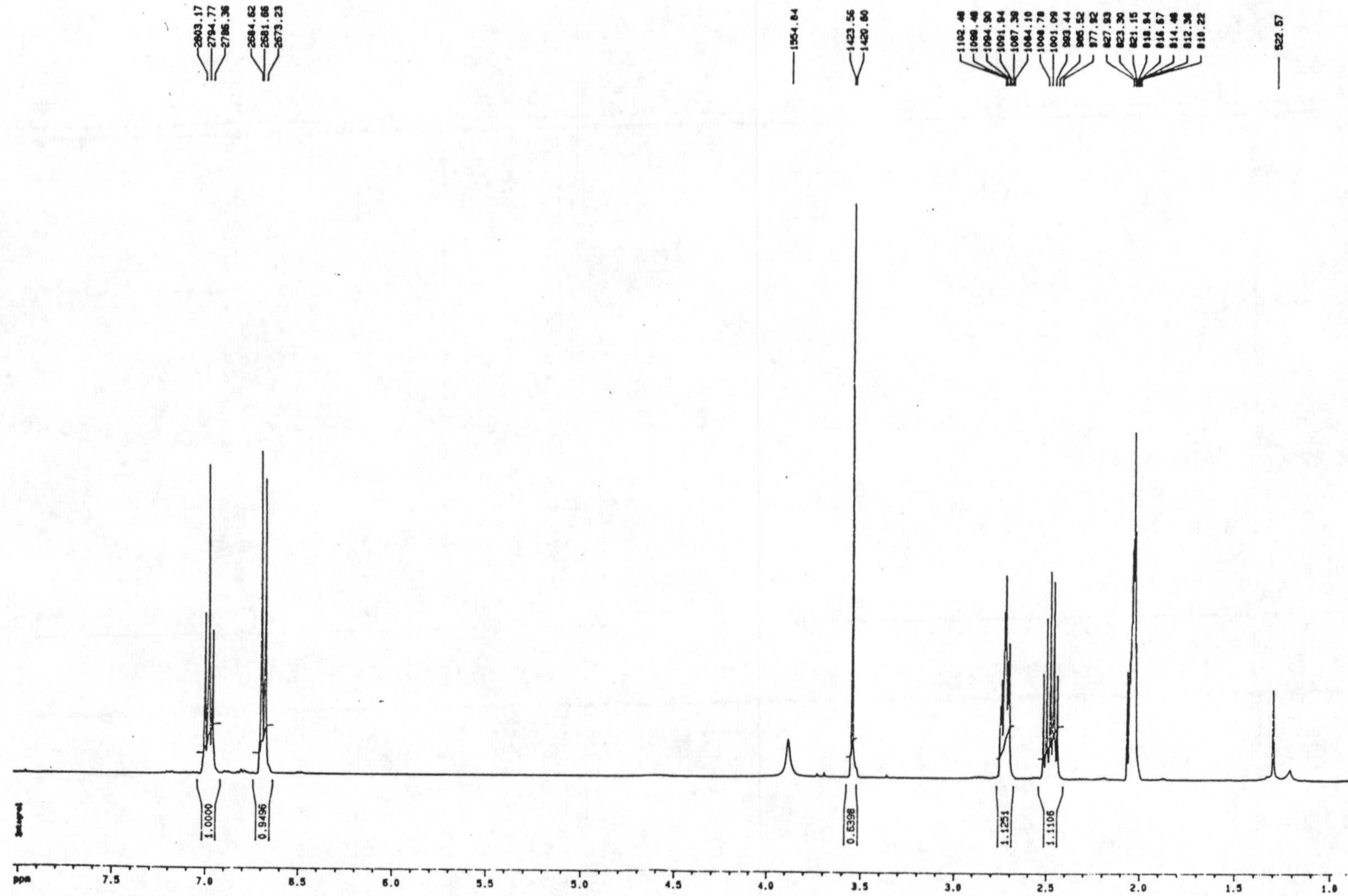
Espectro E-12-b: Espectro de IR del compuesto 12, ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E)1-propenil] glutárico.



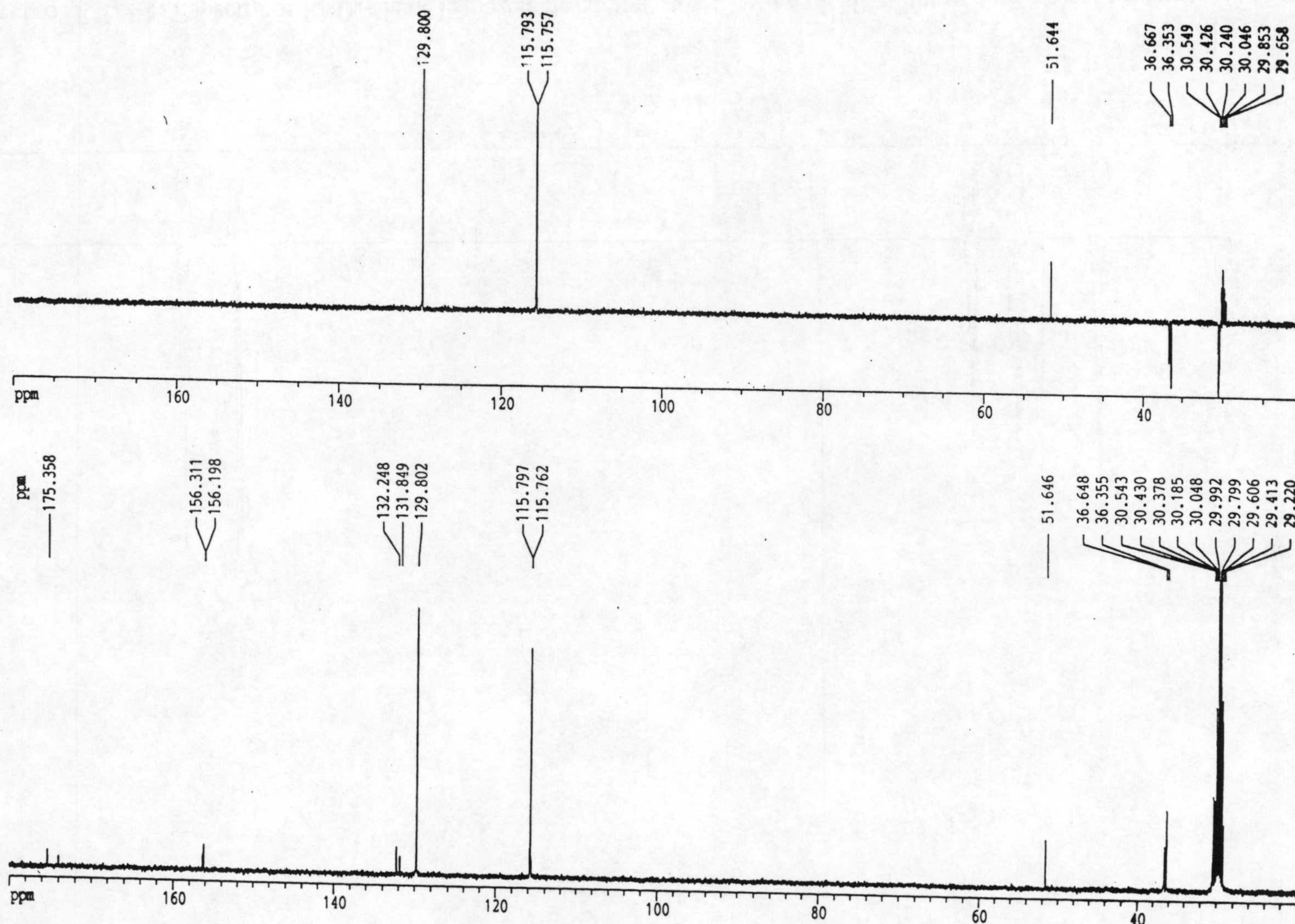
Espectro E-12-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 12, ácido 3-[1-(hidroximetil)-(*E*)1-propenil] glutárico



Espectro E-12-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 12, ácido 3-[1-(hidroximetil)-(E)1-propenil] glutárico

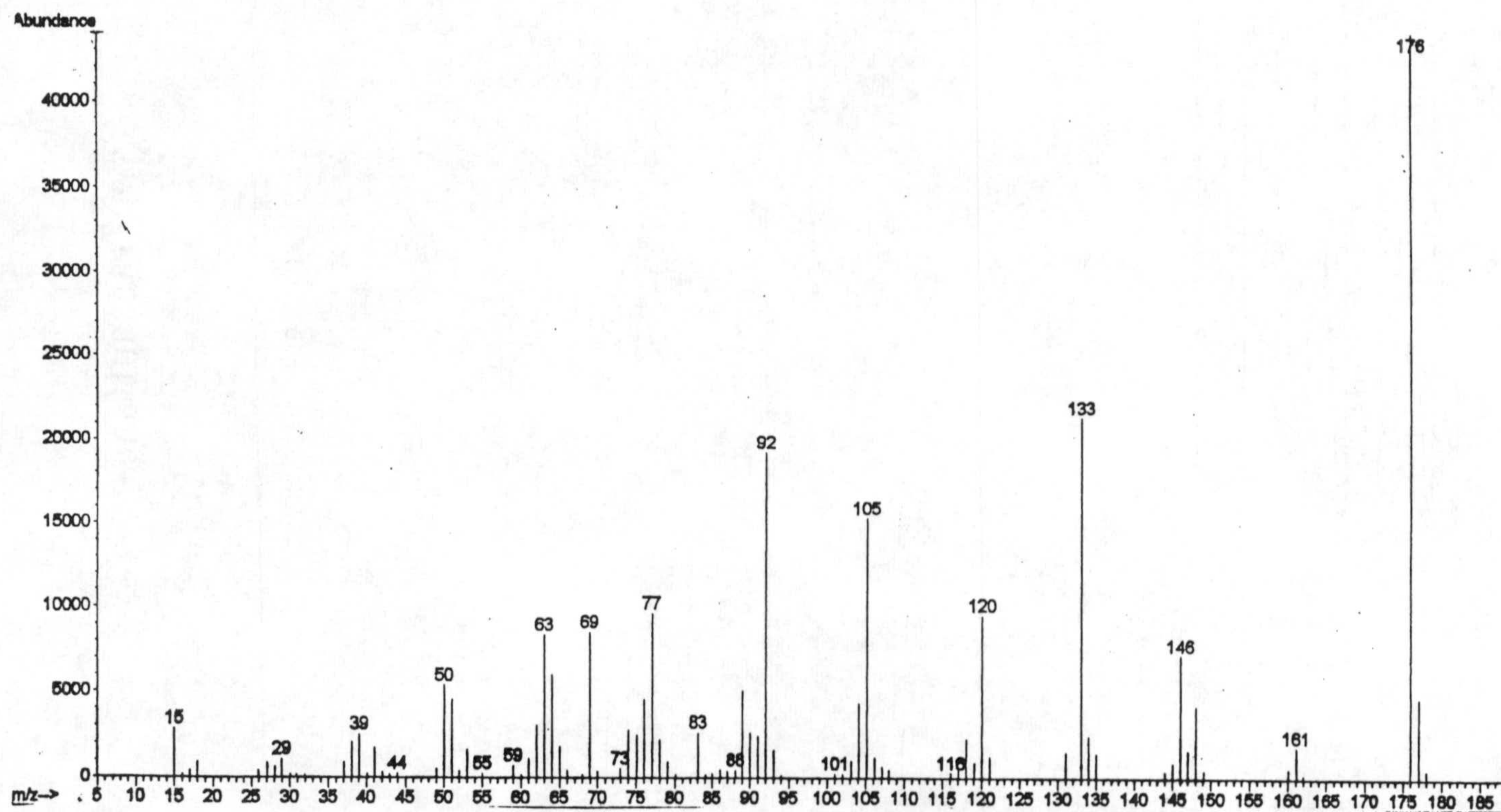


Espectro E-L9-c: Espectro de RMN-¹H de la mezcla de compuestos 13 y 14, ácido *p*-hidroxifenil propanoico y el éster metílico del ácido *p*-hidroxifenilpropanoico



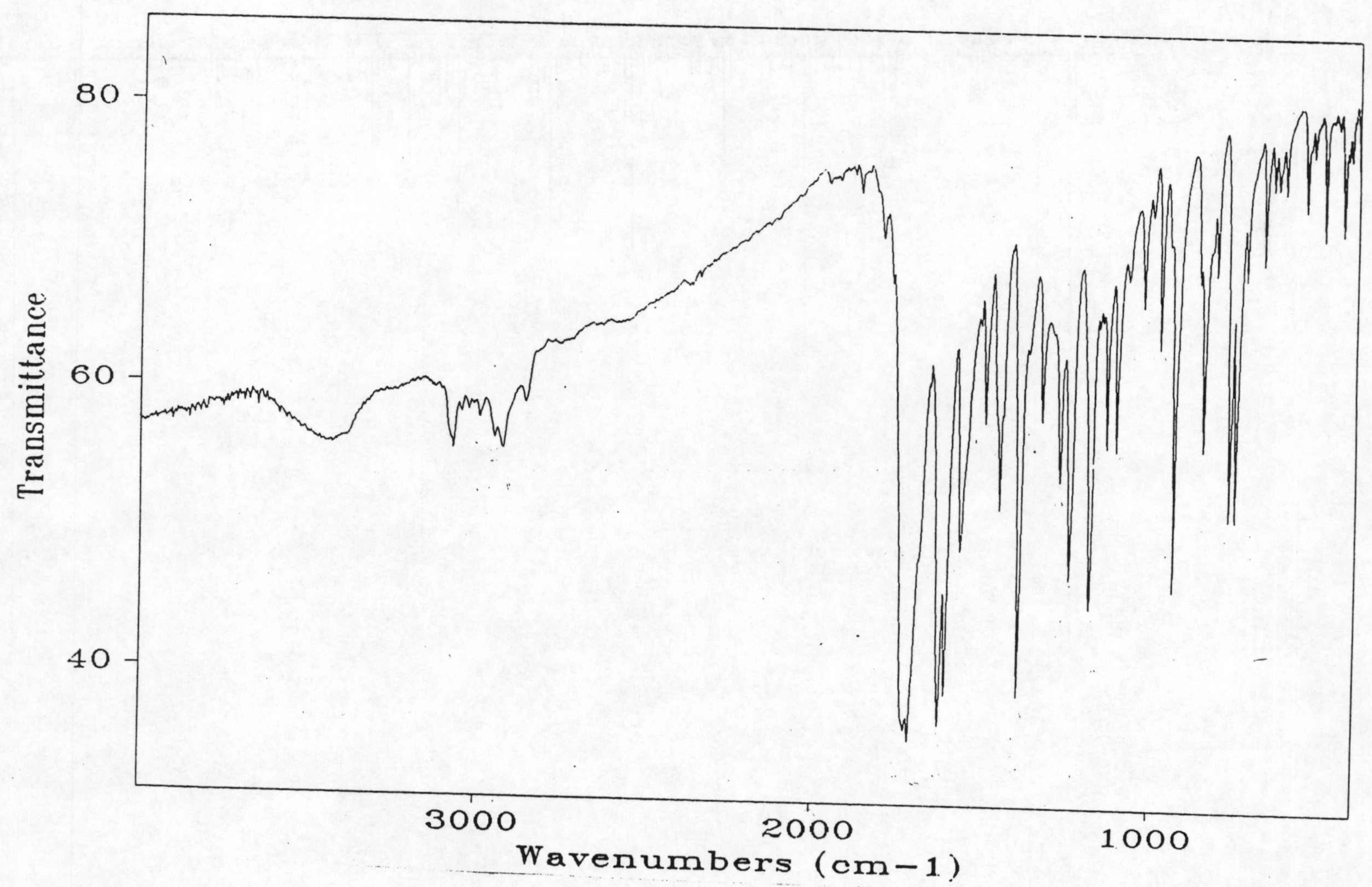
Espectro E-L9-d: Espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla de compuestos 13 y 14, ácido *p*-hidroxifenil propanoico y el éster metílico del ácido *p*-hidroxifenilpropanoico

255



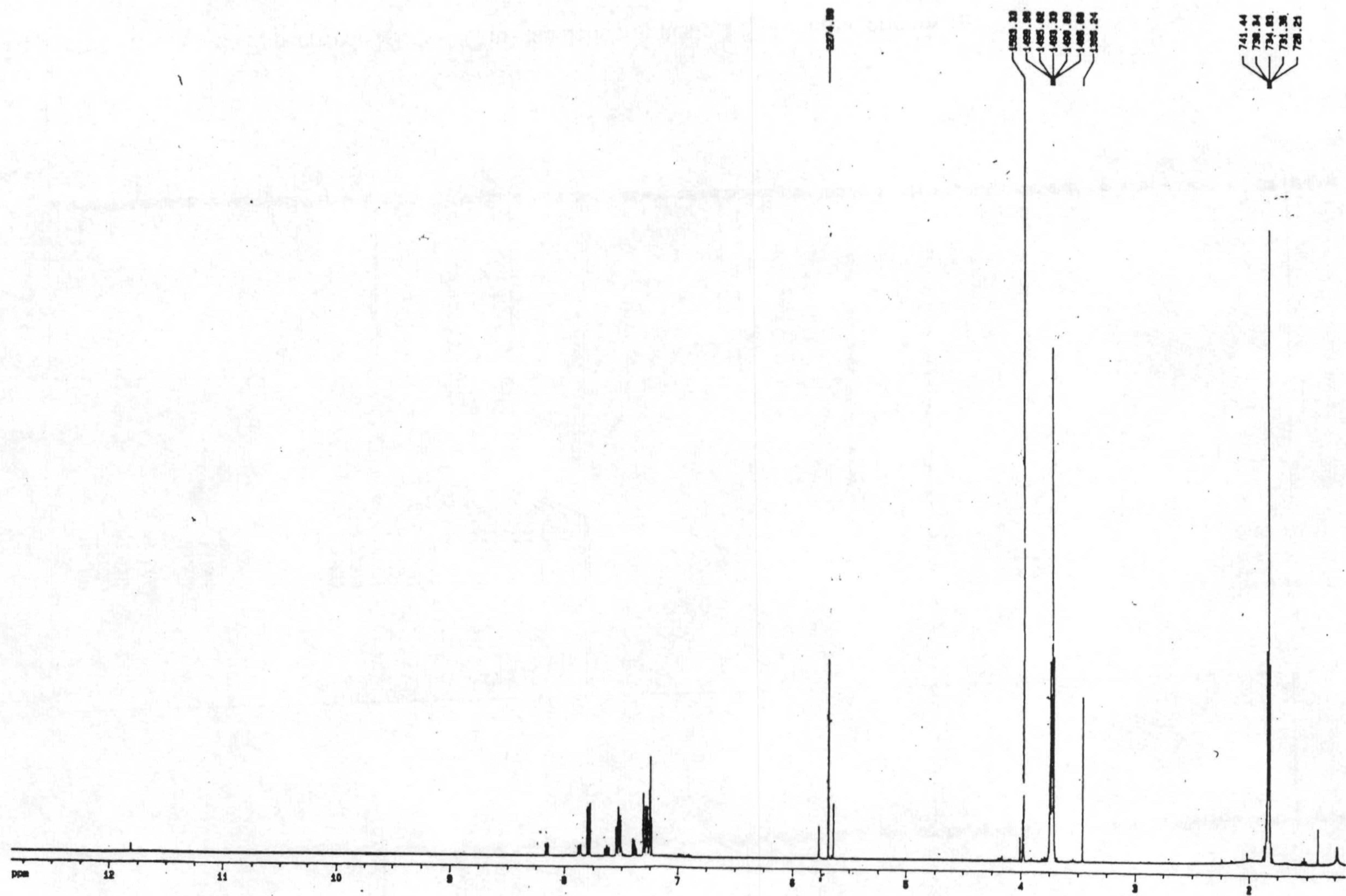
Espectro E-L11-a: Espectro de masas del compuesto 15, 4-metil éter cumarina

Espectros

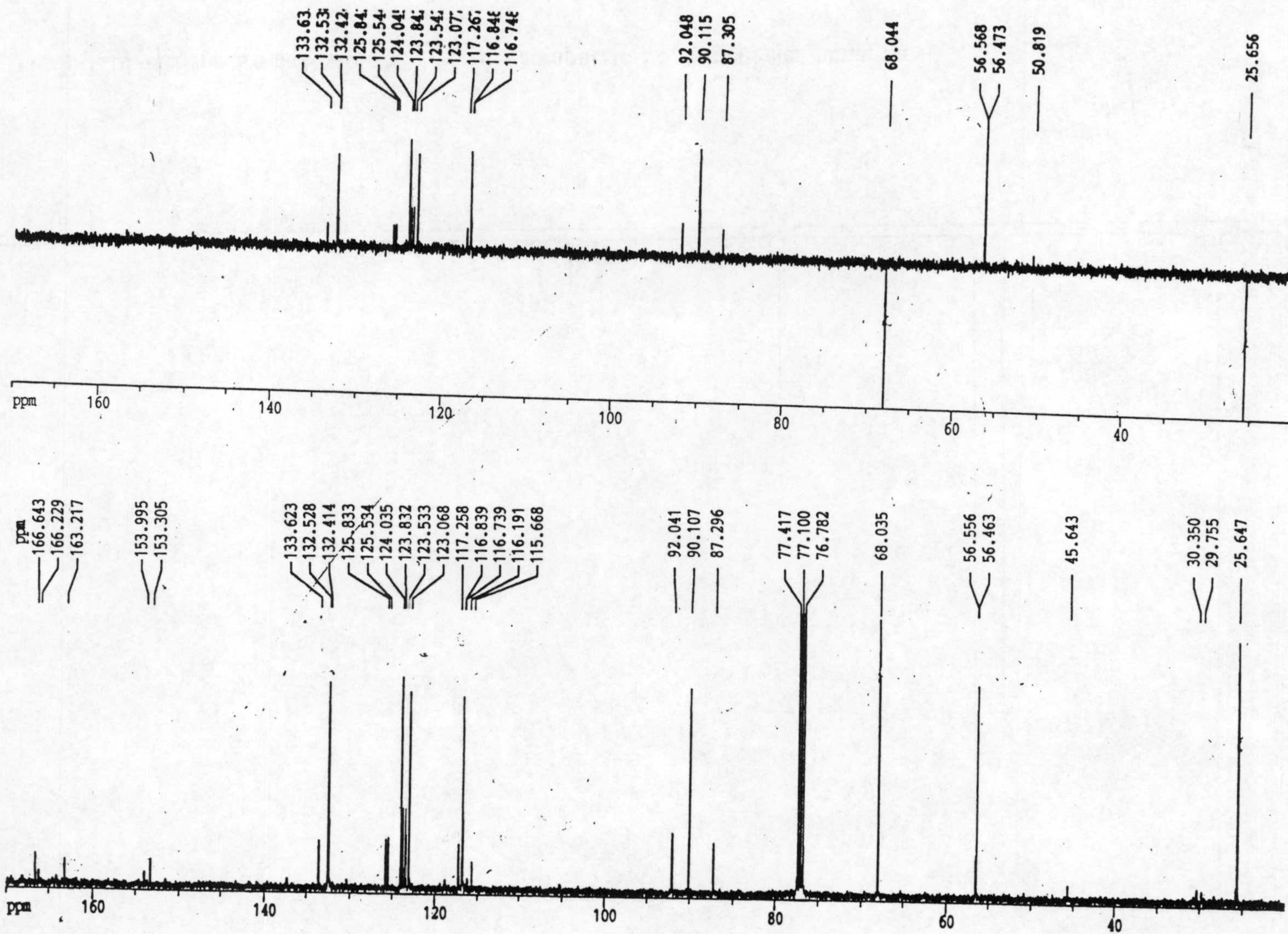


256

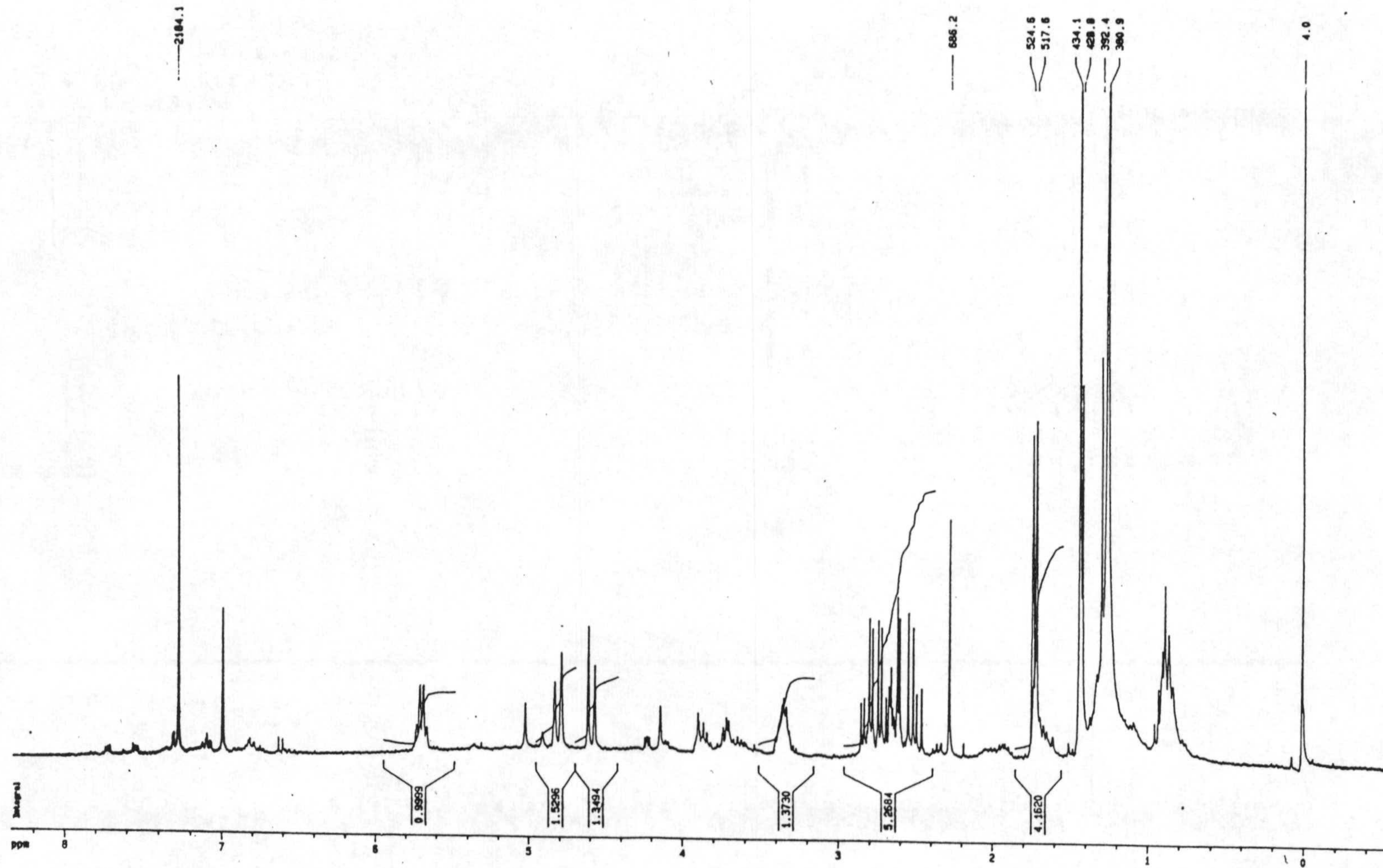
Espectro E-L11-b: Espectro de IR masas del compuesto 15, 4-metil éter cumarina



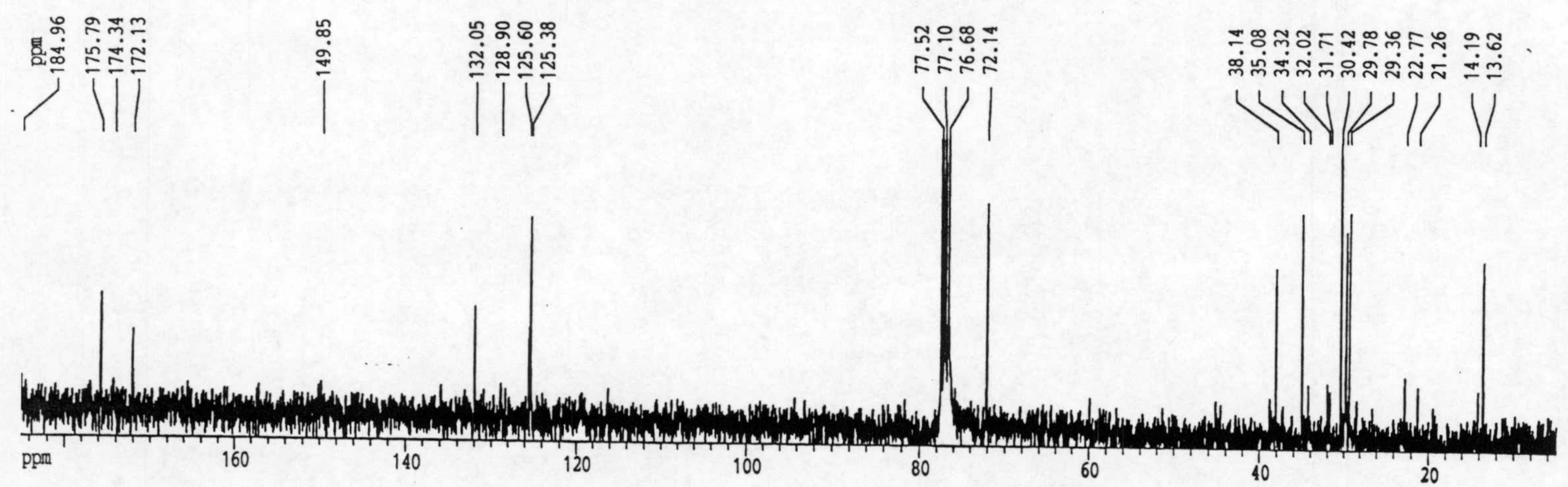
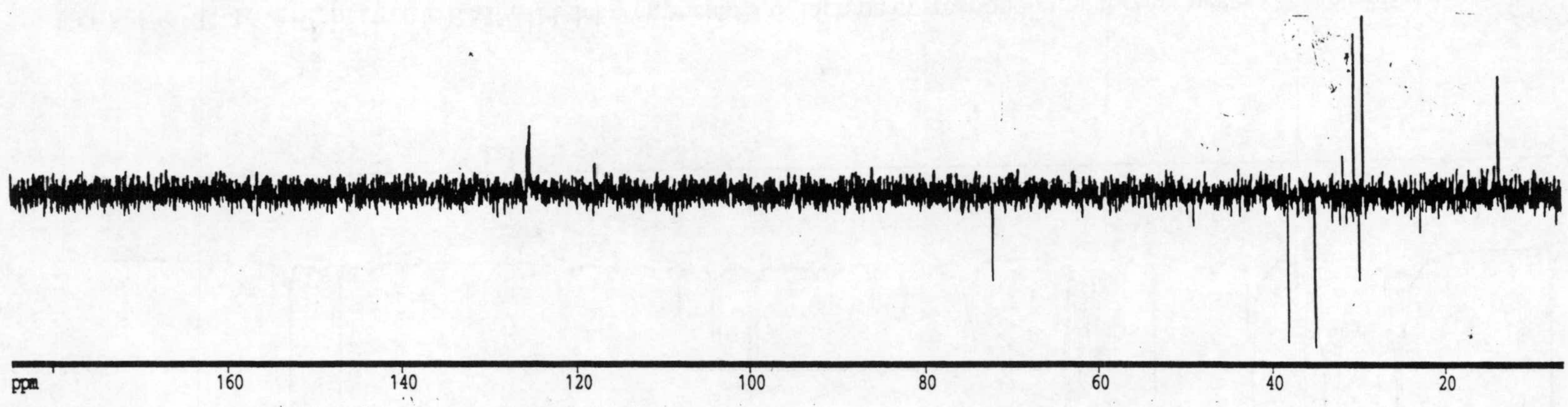
Espectro E-L11-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 15, 4-metil éter cumarina



Espectro E-L11-d: Espectro de RMN-¹³C masas del compuesto 15, 4-metil éter cumarina

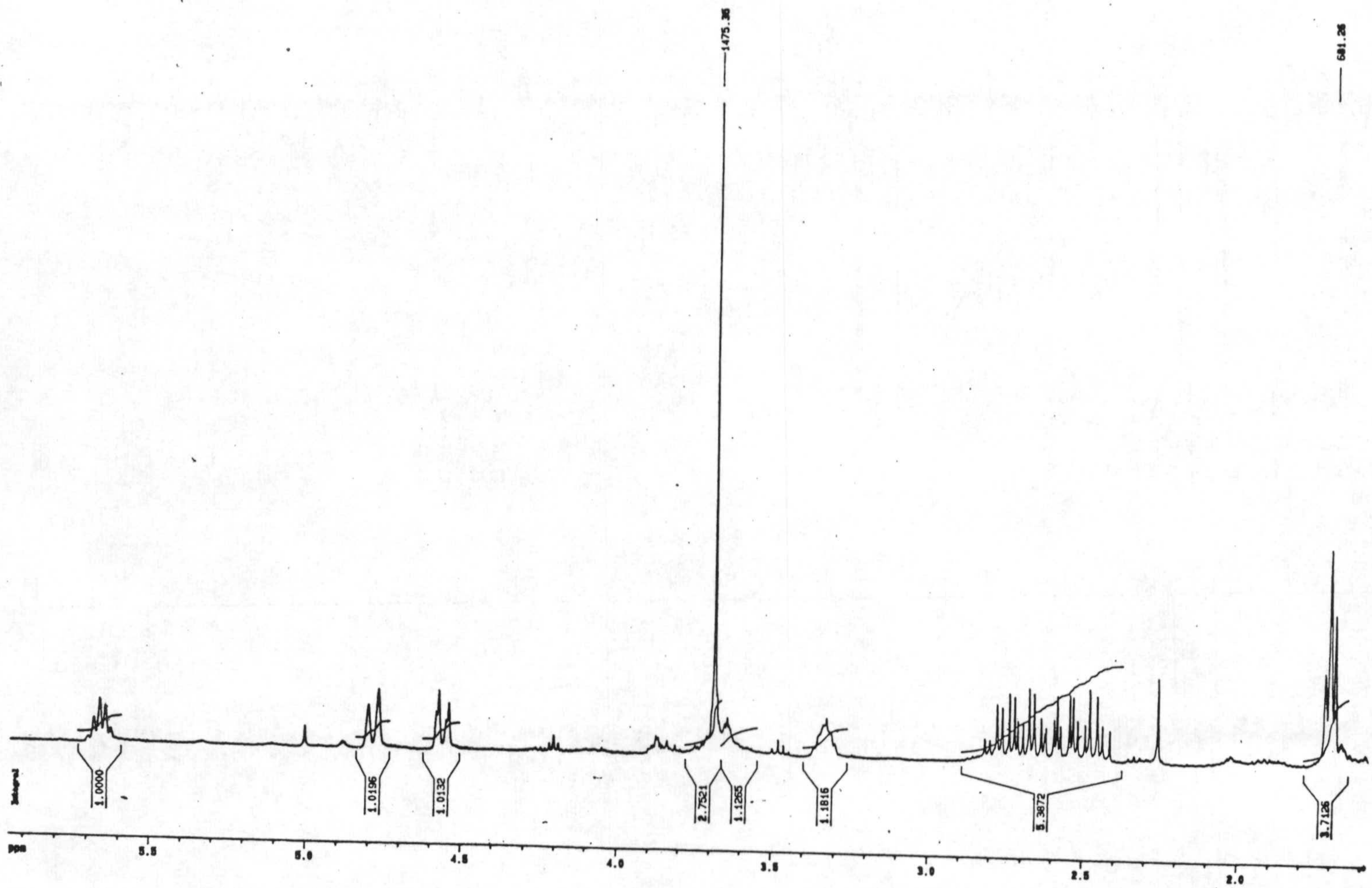


Espectro E-16-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 16, lactona correspondiente al compuesto 12 saponificada

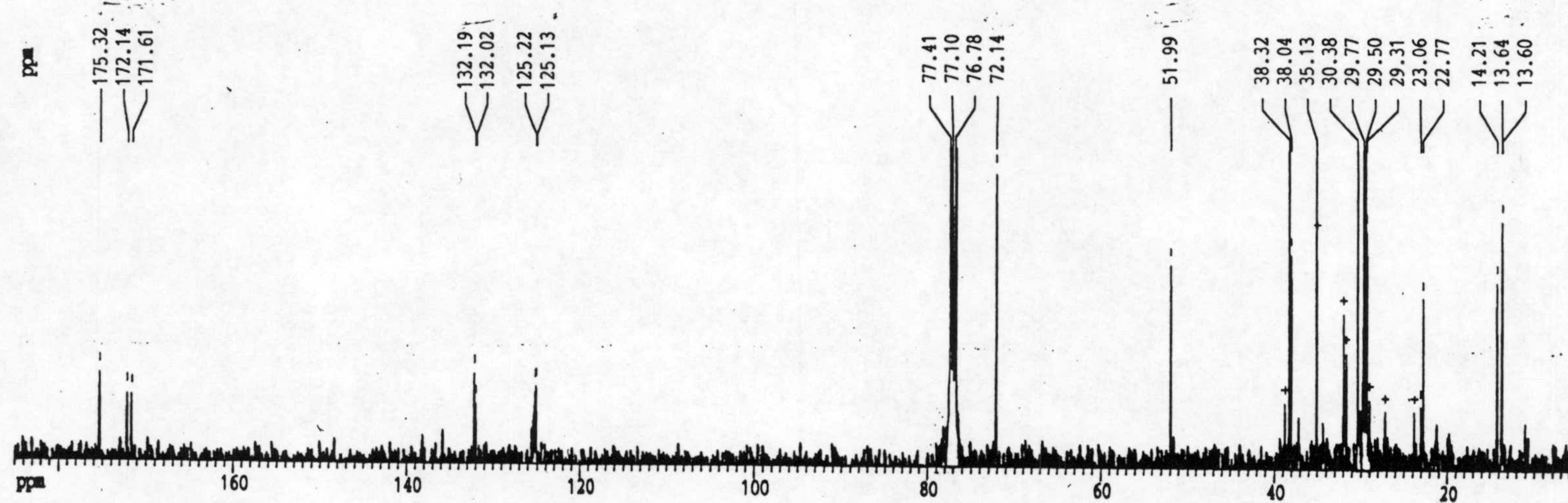
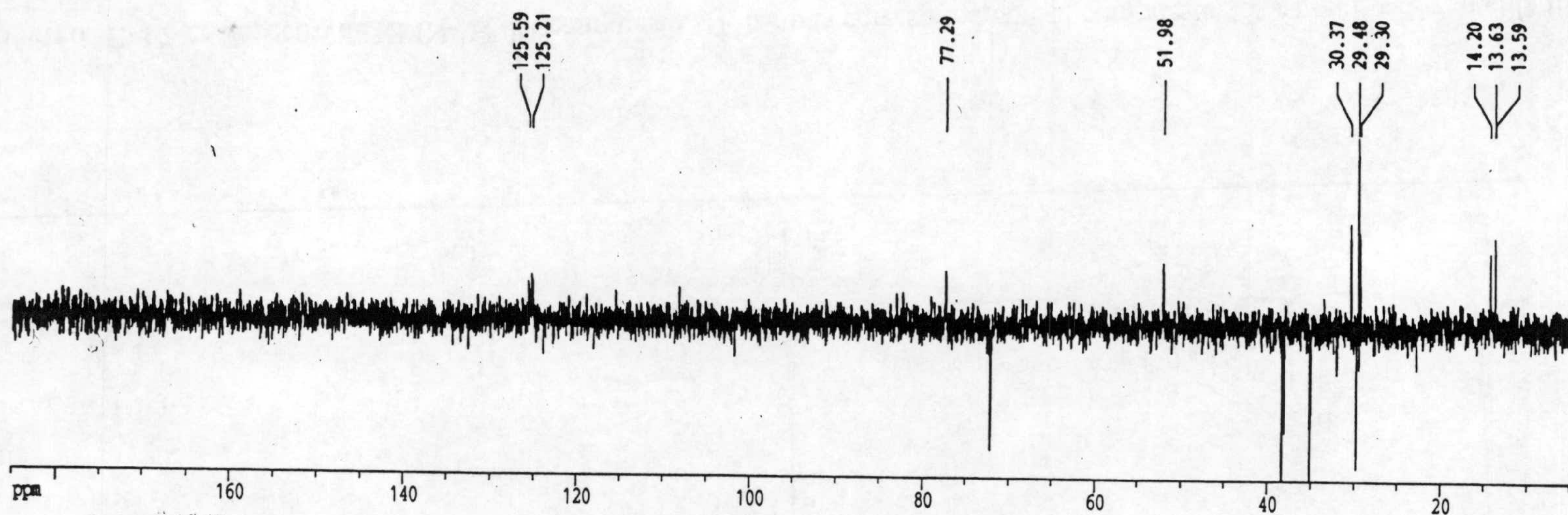


Espectro E-16-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 16, lactona correspondiente al compuesto 12 saponificada

269



Espectro E-17-c: Espectro de RMN-¹H del compuesto 17, lactona correspondiente al compuesto 12 saponificado y metilado



262

Espectro E-17-d: Espectro de RMN-¹³C del compuesto 17, lactona correspondiente al compuesto 12 saponificado y metilado

BIBLIOGRAFÍA

Akasbi, M.; Shoeman, D. W. y Saari Csallany, A. 1993. High-performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils. *JAOCS*, 70, no. 4, 367-370.

Alam, M.S., N. Chopra, M. Ali, and M. Niwa. 1996. Oleanen and stigmasterol derivatives from *Ambroma augusta*. *Phytochemistry* 41:1197-1200.

Ali, M.; Bhutani, K. K. y Srivastava, T. N. 1990. Triterpenoids from *Symplocos racemosa* bark, *Phytochemistry*, 29, no. 11, 3601-3604.

Amiot, M^a. J.; Fleuriet, A. y Macheix, J. J. 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation., *Phytochemistry*, 28, no. 1, 67-69.

Angerosa, F. y di Giovacchino, L. 1996. Natural antioxidants of virgin olive oil obtained by two and tri-phase centrifugal decanters. *Grasas y Aceites*, 47, fasc. 4, 247-254.

Arciero, D.M., A. M. Orville, and J. D. Lipscomb. 1996. Protocatechuate 4,5-dioxygenase from *Pseudomonas testosteroni*, p.89-107. In M.E. Lidstrom (ed.), *Methods in Enzymology*. vol. 188. Hydrocarbons and methylotrophy,

Arfmann, H. A. y Wolf Rainer A. 1993. Microbial reduction of aromatic carboxylic acids. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 48c, 52-57.

Arunachalam, U.; Massey V. y Vaikyanathan C. S. 1992. *p*-Hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase, a two-protein component enzyme. *the journal of biological chemistry*, 267, 25848-25855.

Arunachalam, U. y Massey V. 1994. Studies on the oxidative half-reaction of *p*-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. *The journal of biological chemistry*, 269, no. 16, 11795-11801.

Baldioli, M.; Servili, M.; Perretti, G. y Montedoro, G. F. 1966. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *JAOCS*, 73, no. 11 1589-1593.

Balice, V. y Cera, O. 1984. Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas chromatographic method. *Grasas y Aceites*, 35, fasc. 3, 178-180.

Balice, V.; Carrieri, C.; Cera, O. y Di Fazio, A. 1986. Natural biodegradation in olive mill effluents stored in open basins. *Proceeding International Symposium on olive by-products Valorization*, Sevilla, March, 1986.

Balice, V.; Carrieri, C.; Cera, O. y Rindone. 1988. The fate of tannin like compounds from olive mill effluents in biological treatments. Proceeding anaerobic digestion. 5 th internaional symposium. Eds. ER. Hall and P. N. Hobson. Pergamon Press, Bologna.

Bayly, R. C. y Barbour, M. G. 1984. "The degradation of aromatic compounds by the meta and gentisate pathways. Biochemistry and Regulation", Microbial degradation of organic compounds, Gibson, D. T (ed.) vol. 13, Capítulo 18, p. 251-294.

Beltrame, P.; Beltrame, P. L. y Carniti, P. 1984. Inhibiting action of chloro- and nitro-phenols on biodegradation of phenol: a structure-toxicity relationship. Chemosphere, 3, no. 1, 3-9.

Benítez, F. J.; Beltrán-Heredia J. y Acero J. L. 1993. Degradación de ácido protocatéuico mediante dióxido de cloro. Afinidad L, 443, 28-32.

Benitez, F. J.; Beltran Heredia J. y Acero J. L. 1993. Protocatechuic acid ozonation in aqueous solutions, Wat. Res, 27, no. 10, 1519-1525.

Benítez, F. J.; Beltrán Heredia, J.; Acero J. y Pinilla, M^a. L. 1997. Ozonation kinetics of phenolic acids present in wastewaters from olive oil mills. Ind. Eng. Chem. Res., 36, 638-644.

Benitez, J.; Beltran-Heredia, J.; Torregrosa, J.; Acero, J. L. y Cercas, V. 1997. Aerobic degradation of olive mill waste waters. Appl. Microbiol. Biotechnol., 47, 185-188.

Bernhardt, F-H. and H-U. Meisch. 1980. Reactivation studies on putidamonooxin - The monooxygenase of a 4-methoxybenzoate O-demethylase from *Pseudomonas putida*. Biochemical and biophysical research communications 93, no. 4, 1247-1253.

Bernhardt, F-H., H. Pachowsky, and H. Staudinger. 1975. A 4-Methoxybenzoate O-Demethylase from *Pseudomonas putida* . A new type of Monooxygenase system. Eur.J.Biochem. 57:241-256.

Bianchi, G.; Murelli, C. y Vlahov, G. 1992. Surface waxes from olive fruits, Phytochemistry, 31, no. 10, 3503-3506.

Bianchi, G.; Vlahov, G.; Anglani, C. y Murelli, C. 1993. Epicuticular wax of olive leave, Phytochemistry, 32, no. 1, 49-52.

- Bianchi, G. y Pozzi, N. 1994. 3,4-dihydroxyphenylglycol, a major C₆-C₂ phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochemistry*, 35, no. 5, 1335-1337.
- Bianchi, G.; Pozzi N. y Vlahov, G. 1994. Pentacyclic tripterene acids in olives. *Phytochemistry*, 37, no. 1, 205-207.
- Bianco, A.; Lo Scalzo R. y Scarpati, M^a. L. 1993. Isolation of cornoside from *Olea europaea* and its transformation into halleridone. *Phytochemistry*, 32, no. 2, 455-457.
- Biedermann, M.; Grob, K. y Morchio, G. 1995. On the origin of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in extra virgin olive oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 200, 266-272.
- Biessels, H. W. A.; van der Kerk-van Hoof, A. C.; Kettenes van den Bosch, J. J. y Salemink, C. A. 1974. Triterpenes of *Prunus serotina* y *P. lusitanica*. *Phytochemistry*, 13, 203-207.
- Bock, K. y Pedersen C. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 41
- Bock, K. y Pedersen C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides.
- Bombardelli, E.; Bonati, A.; Gabetta, B. y Mustich, G. 1974. Triterpenoids of *Terminalia sericea*, *Phytochemistry* col. 13, 2559-2562.
- Bondioli, P.; Lanzani, A.; Fedeli, E.; Sala, M. y Gerali, G. 1992. Valutazione della possibilità di pretrattare le acque di vegetazione dei frantoi oleari con ozono. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, LXIX, 487-497.
- Borja Padilla, R.; Martín Martín, A.; Fiestas Ros de Ursinos, J. A. y Maestro Durán, A. 1990. Efecto de inhibición en el proceso de biometanización del alpechín en biorreactores con microorganismos inmovilizados en diversos tipos de soportes, *Grasas y Aceites*, 41, fasc. 6, 397-403.
- Borja Padilla R.; Martín Martín A. y Fiestas Ros de Ursinos J. A. 1990. Estudio cinético de la depuración anaerobia del alpechín en presencia de diversos soportes para inmovilización de los microorganismos responsables del proceso. *Grasas y Aceites*, 41, fasc. 4-5, 347-356.
- Borja Padilla, R.; Fiestas Ros de Ursinos, J. A.; Durán Barrantes, M^a. M. y Luque González, M. 1991. Depuración aerobia de las aguas de

condensación del proceso de concentración térmica del alpechín, *Grasas y Aceites*, **42**, fasc. 6, 422-427.

Borja Padilla, R.; Martín Martín, A. y Durán Barrantes, M^a. M. 1991. Estudio cinético del proceso de biometanización de las aguas de condensación del proceso de concentración térmica del alpechín. *Grasas y Aceites*, **42**, fasc. 6, 437-443.

Borja Padilla, R.; Martín Martín, A. y Fiestas Ros de Ursinos, J. A. 1991. Influencia de la concentración de sustrato sobre la cinética del proceso de biometanización del alpechín, en biorreactores de lecho fluidizado con microorganismos inmovilizados. *Grasas y Aceites*, **42**, fasc. 5, 363-370.

Borja Padilla, R.; Martín Martín, A.; Mestro Durán, R.; Alba Mendoza, J. y Fiestas Ros de Ursinos, J. 1991. Cinética del proceso de depuración anaerobia de alpechín previamente biotratado vía aerobia. *Grasas y Aceites*, **42**, fasc. 3, 194-201.

Borja Padilla, R.; Martín Martín A. y Durán Barrantes, M. M. 1992. Estudio cinético del proceso de biometanización de alpechín de almazara clásica previamente sometido a tratamiento aerobio con *Geotrichum candidum*. *Grasas y Aceites*, **43**, fasc. 2 82-86.

Borja Padilla, R.; Alba Mendoza, J. y González Becerra, A. 1992. Estudio cinético de la digestión anaerobia de alpechín, procedente de la extracción de aceite utilizando olivex, previamente biotratado con *Geotrichum candidum*. *Grasas y Aceites*, **43**, fasc. 4, 219-225.

Borja Padilla, R.; Durán Barrantes, M^a. M. y Luque González, M. 1992. Depuración aerobia de los efluentes resultantes del proceso de biometanización del alpechín. *Grasas y Aceites*, **43**, fasc. 1, 20-25.

Borja Padilla R. y col. 1993. Cinética del proceso de depuración anaerobia de alpechín previamente biotratado vía aerobia. *Grasas y Aceites*, **42**, Fasc. 3, 194-201.

Borja, R., Maestro, R., Martín, A., Fiestas, J. A. y Alba, J. 1990. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. Reunión internacional sobre tratamiento de alpechines. Córdoba.

Borja, R., Martín, A., Maestro, R., Fiestas, J.A. y Alba, J. 1990. Estudio cinético comparativo del proceso de depuración anaerobia del alpechín natural y del previamente tratado por vía aerobia para eliminar su poder inhibitor. Reunión Internacional sobre tratamiento de alpechines. Córdoba.

Bourquelot, E. y Vintilesco, J. 1908. Sur l'oleuropeine, nouveau principe de nature glucosidique retire de l'Olivier (*Olea europaea* L.). C.R. Acad. Sci. 147, 533-535.

Brenes, M.; García, P.; Durán, M. C. y Garrido, A. 1992. Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. Journal of food science, 58, no. 2, 347-350.

Brenes Balbuena, M.; García García, P. y Garrido Fernández, A. 1992. Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 1192-1196.

Brenes, M.; Rejano, L.; García, P.; Sánchez, A. H. y Garrido, A. 1995. Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2702-2706.

Brunel, F. and J. Davison. 1988. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes encoding vanillate demethylase. J.Bacteriol. 170:4924-4930.

Budzikiewicz, H., J. M. Wilson, y C. Djerassi. 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. J.Am.Chem.Soc. 85:3688-3699.

Budzikiewicz, H.; Djerassi, C. y Williams, D. H. 1964. Structure elucidation of natural products by mass spectrometry; Holden-Day: San Francisco, vol. II, p. 122.

Burnett A. D. y M. Oliviero, M. 1931. Bull. Acc. Méd., 122, 191.

Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A. y Scognamiglio, F. 1992. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. Phytochemistry, 31, no. 12, 4125-4128.

Capretti, G. 1948. Gior. Chim. Medica, 29, 394, 491, 856.

Capretti G. y Bonaconza, E. 1949. Ibid., 30, 630.

Caputo, R.; Mangoni, L.; Monaco, P. y Previtera, L. 1974. Triterpenes in husks of *Olea europaea*. Phytochemistry, 13, 1551-1552.

Cavin, J. F.; Barthelmebs, L. y Diviès, C. 1997. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression en *Escherichia coli*, purification, and characterization. Applied and Environmental Microbiology, 63, no. 5, 1939-1944.

Chang, C. W. J.; Flament, I.; Matson, J. A.; Nishida, T.; Ohloff, G.; Wehrli, F. W. y Weinheimer, A. J. 1979. The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. Progress in the chemistry of organic natural products. Springer-Verlag: New York, vol. 36, p. 98.

Cheung, H. T. y Yan, T. C. 1972. Constituents of dipterocarpaceae resins, IV. triterpenes of *Shorea acuminata* and *Shorea resina-nigra*, Aust. J. Chem., 25, 2003-2012.

Ciafardini, G.; Marsilio, V.; Lanza B. y Poxxi, N. 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. Applied and environmental microbiology, 60, no. 11, 4142-4147.

Cinquanta, L.; Esti, M. y La Notte, E. 1997. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. JAOCS, 74, no. 10, 1259-1264.

Cooper R. A. y Skinner, M. A. 1980. Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenyl acetate by de 3,4-dihydroxyphenyl acetate pathway in *Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 143, no. 1, 302-306.

Cort, A., B. C. Faust, and C. J. Rao. 1997. Aromatic carbonyl compounds as aqueous-phase photochemical sources of hydrogen peroxide in acidic sulfate aerosols, fogs, and clouds. 1. Non-phenolic methoxybenzaldehydes and methoxyacetophenones with reductants (phenols). Environ.Sci.Technol. 31, 218-232.

Cruess, W. V. y Alsberg, C. L. 1934. The bitter glucoside of the olive, J. Amer. Chem. Soc. octubre, 2115-2117.

Cruess, W.V. and C. L. Alsberg. 1934. The bitter glucoside of the olive. J.Amer.Chem.Soc. 56:2115-2117.

Dagley, S. 1986. Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in pseudomonads. In *The Bacteria, 10, the Biology of Pseudomonas*, 527-556. Edited by J. R. Sokatch. London: Academic Press.

Dalis, D.; Anagnostidis, A.; Lopez, A.; Letsiou, I. y Hartmann, L. 1996. Anaerobic digestion of total raw olive-oil wastewater in a two-stage pilot-plant (up-flow and fixed-bed bioreactors). Bioresource Technology, 57, 237-243.

Damtoft, S.; Franzyk, H. y Rosendal Jensen, S. 1992. Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*, Phytochemistry, 31, no. 12, 4197-4201.

Davidson, P. M. y Brandan, A. L. 1981. Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. Journal of Food Protection, 44, no. 8, 623-632.

Deckler, M. 1984. Microbial degradation of organic compounds. Gibson, D. T. (ed.) vol. 13, Inc., New York.

De Nino, A.; Lombardo, N.; Perri, E.; Procopio, A.; Raffaelli, A. y Sindona, G. 1997. Direct identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 32, 533-541.

De Nunno, R. 1947. *Riv. Chim. media*, 47, 511.

De Lorenzo, V. 1994. Designing microbial systems for gene expression in the field. *Tibtech* 12, 365-371.

Dimarco, A.A. and L. N. Ornston. 1994. Regulation of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase synthesis by PcbR bound to an operator in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J.Bacteriol.* 176:4277-4284.

Enoki, A., Y. Yajima, and M. H. Gold. 1981. Olefin saturation and acid reduction of 3,4-dimethoxycinnamic acid and derivatives by *Phanerochaete chrysosporium*. *Phytochemistry* 20:1543-1546.

Entsch, B. 1996. Hydroxybenzoate hydroxylase, p.138-146. In M.E. Lidstrom (ed.), *Methods in Enzymology*. vol 188. Hydrocarbons and methylotrophy,

Evangelisti, F.; Zunin, P.; Tiscornia, E.; Petacchi, R.; Drava, G. y Lanteri, S. 1997. Stability to oxidation of virgin olive oils as related to olive conditions: study of polar compounds by chemometric methods. *JAOCS*, 74, no. 8, 1017-1023.

Federici, F. y Bongi, G. 1983. Improved method for isolation of bacterial inhibitors from oleuropein hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, no. 3, 509-510.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. y Borja-Padilla, R. 1992. Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, 43, fasc. 2 101-106.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. 1997. *Grasas y Aceites*, 28, 113-121.

Fleming, H. P. y Etchells, J. L. 1967. Occurrence of an inhibitor of Lactic Acid Bacteria in green olives, *Applied Microbiology*, 15, no.5, 1178-1184.

Fleming, H. P.; Walter, W. M. JR. y Etchells, J. L. 1969. Isolation of a bacterial inhibitor from green olives. *Applied Microbiology*, 18, no. 5, 856-860.

Fleming, H. P., Walter, W. M. JR. y. Etchells, J. L. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Applied Microbiology*, 26: 777-782.

Furuya, T.; Orihara, Y. y Hayashi, C. 1987. (Triterpenoids from *Eucalyptus perriniana* cultured cells, *Phytochemistry*, 26, no. 3, 715-719.

Gariboldi, P.; Jommi G. y Verotta, L. 1986. Secoiridoids from *olea europaea*. *Phytochemistry*, 25, no. 4, 865-869.

Garrido-Fernández, A. y Vaughn, R. H. 1978. Utilization of oleuropein by microorganisms associated with olive fermentations. *Can. J. Microbiol.* 24, 680-684.

Gil, M.; Haidour, A. y Ramos, J. L. 1997. Identification of two triterpenoids in solid wastes from olive cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, no. 11, 4490-4494.

Goupy, P.; Fleuriet, A.; Amiot, M^a. J. y Macheix, J. J. 1991. Enzymatic browning, oleuropein content, and diphenol oxidase activity in olive cultivars (*Olea europaea* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 92-95.

Hamdi, M. y col. 1992. Effect of an anaerobic bacterial consurtium isolated from termites on the degradation of olive-mill waste-water. *Applied Microbiology Biotechnology*, 37, 408-410.

Hamdi, M. 1993. Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment: A review. *Bioprocess Engineering*, 8, 209-214.

Harayama, S. and K. N. Timmis. 1996. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*, p.151-173.

Harpel, M. R. y Lipscomb, J. D. 1986. "Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas acidovorans*". *Methods in enzymology*, 188, Hydrocarbons and methylotropy, cap. 17, 101-107.

Higuchi, R.; Kawasaki, T.; Biswas, M.; Pandey, V. B. y Dasgupta, B. 1982. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Symplocos spitaca*, *Phytochemistry*, 21, no. 4, 907-910.

Huang, Z., L. Dostal, and J. P. N. Rosazza. 1993. Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, no. 7, 2244-2250.

- Huang, Z., L. Dostal, and J. P. N. Rosazza. 1994. Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 176, 5912-5918.
- Ielmini, M. Sanna, M. y Pelosi, N. 1976. *End. Alimentari*, 16, 11, 123-131.
- Inoue, K.; Nishioka, T.; Tanahashi, T. y Inouye, H. 1982. Three secoiridoid glucosides from *Ligustrum japonicum*. *Phytochemistry*, 21, no. 9, 2305-2311.
- Inouye, H.; Nishioka, T. y Kaniwa, M. 1975. Glucosides of *Fraxinus japonica*. *Phytochemistry*, 14, p. 304.
- Janer del Valle, L. 1980. Contaminación de las aguas por el alpechín y posibles soluciones al problema. *Grasas y Aceites*, 31, fasc. 4, 273-279.
- Johnson, G.R. and R. H. Olsen. 1995. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, no. 9, 3336-3346.
- Juven, B.; Samish, Z. y Henis, Y. 1968. Identification of oleuropein as a natural inhibitor of lactic fermentation of green olives, *Israel J. Agric. Res.* 18, no. 3, 137-138.
- Juven, B. y Henis Y. 1970. Studies on the antimicrobial activity of olive phenolic compounds. *Journal Applied Bacteriology*, 33, 721-732.
- Juven, B.; Henis, Y. y Jacoby, B. 1972. Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *Journal Applied Bacteriology*, 35, 559-567.
- Kojima, H. y Ogura, H. 1986. Triterpenoids from *Prunella vulgaris*, *Phytochemistry*, 25, no. 3, 729-733.
- Kojima, H.; Tominaga, H.; Sato, S. y Ogura, H. 1987. Pentacyclic triterpenoids from *Prunella vulgaris*, *Phytochemistry*, 26, no. 4, 1107-1111.
- Kojima, H. and H. Ogura. 1989. Configurational studies on hydroxy groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanene and ursene-type triterpenes by NMR spectroscopy. *Phytochemistry* 28:1703-1710.
- Krueger, J. P.; Butz, R. G.; Atallah Y. H. y Cork, D. J. 1989. Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 534-538.

Kuwajima, H.; Morita, M.; Takaishi, K.; Inoue, K.; Fujita, T.; Zheng-Dan He y Chong-Ren Yang. 1992. Secoiridoid, coumarin and secoiridoid-coumarin glucosides from *Fraxinus chinensis*, *Phytochemistry*, **31**, no. 4, 1277-1280,

Le Tutour, B. y Guedon, D. 1992. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, **31**, no. 4, 1173-1178.

Limiroli, R.; Consonni, R.; Ottolina, G.; Marsilio, V; Bianchi G. y Zetta, L. 1995. ^1H and ^{13}C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *Journal Chemistry Society, PERKIN TRANSACTIONS I*, **1**, 1519-1523.

Litridou, M.; Linssen, J.; Schols, H.; Bergmans, M.; Posthumus, M.; Tsimidou, M^a. y Boskou, D. 1997. Phenolic compounds in virgin olive oils: fractionation by solid phase extraction and antioxidant activity assessment. *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 169-174.

Liu, D.; Thomson, K. y Kaiser, K. L. E. 1982. Quantitative structure-toxicity relationship of halogenated phenols on bacteria. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **29**, 130-136.

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**, fasc. 4, 271-276.

Maestro Durán, R. y Borja Padilla, R. 1990. Influencia de los polifenoles en la depuración del alpechín. XXIV Asamblea Plenaria de Miembros del Instituto de la Grasa y sus Derivados.

Mandelstam, J.; McQuillen, K.; Dawes, I. 1982. *Biochemistry of Bacterial Growth*; Blackweel scientific publications: Oxford, U.K. p. 447.

Mantzavinos, D.; Hellenbrand, R.; Metcalfe I. S. y Livingston, A. G. 1996. Partial wet oxidation of *p*-coumaric acid: oxidation intermediates, reaction pathways and implications form waste water treatment. *Wat. Res.* **30**, no. 12, 2969-2976.

Martínez, J.; Pérez, J.; Moreno, E. y Ramos-Cormenzana, A. 1986. Incidencia del efecto antimicrobiano del alpechín en su posible aprovechamiento, *Grasas y Aceites*, **37**, fasc. 4, 215-223.

Martínez Gordo, J. 1993. Reciclaje biológico de alpechín y orujo para usos en fertilización. *Agrónomos*, No. 7, 28-31.

Martínez, J.; Pérez, J.; Moreno, E. y Ramos Cormenzana, A. 1986. Incidencia del efecto antimicrobiano del alpechín en su posible aprovechamiento. *Grasas y Aceites*, 37, fasc. 4, 215-223.

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, fasc. 2, 75-81.

Martínez Nieto, L.; Garrido Hoyos, S. E.; Camacho Rubio, F.; García Pareja, M^a. P. y Ramos Cormenzana, A. 1993. The biological purification of waste products from olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 43, 215-219.

Martínez Nieto, L.; Garrido Hoyos, S. E. 1994. El alpechín, un problema medioambiental en vías de solución (I). *Ingeniería Química*, noviembre, 755-765.

Martínez Nieto, L. y Garrido Hoyos, S. E. 1994. El alpechín, un problema medioambiental en vías de solución (II). *Ingeniería Química*, diciembre, 817-820.

Martínez-Nieto, L. y Garrido-Hoyos, S. E. 1994. Reutilización de agua en las industrias de extracción de aceite de oliva. *Química e Industria*, Septiembre, 607-610.

Mas, M. y Peinado, J. M. 1984. Phenol effect on the growth of yeast isolated from alpechín. *Cien. Biol. (Portugal)* 9, 205-509.

Medici, F., Merli, G. y Spagnoli, E. 1985. Anaerobic digestion of olive oil mill wastewaters: a new process. *Proceeding fourth international symposium on anaerobic digestion*, Guanzhou (China).

Montedoro, G. F.; Servili, M.; Baldioli, M.; Serlaggini, R.; Miniati, E. y Macchioni, A. 1993. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil; Note 3. Spectroscopic characterization of the secoroid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2228-2234.

Morales, M. T.; Ríos, J. J. y Aparicio, R. 1997. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2666-2673.

Moreno, R., Paredes, M. T. y Martínez, J. 1983.

Moreno, E. y col., 1987. Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios*, 51, 169-174.

Mussini, P.; Orsini, F. y Pelizzoni, F. 1975. Triterpenes in leaves of *Olea europaea*, , *Phytochemistry*, 14, 1135.

Nali, M., B. Rindone, S. Tollari, V. Andreoni, and V. Treccani. 1985. Anaerobic microbial conversion of three hydroxycinnamic acid. *Experientia* 41, 1351-1353.

Nishibe, S.; Tsukamoto, H.; Agata, I.; Hisada, S.; Shima, K. y Takemoto, T. 1981. Isolation of phenolic compounds from stems of *Olea europaea*. *Shoyakugaku Zasshi*, 35, no. 2, 251-254.

Nishikawa, S.; Sonoki, T.; Kasahara, T.; Obi, T.; Kubota, S.; Kawai, S.; Morohoshi, N. y Katayama Y. 1998. Cloning and sequencing of the *Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis* gene exential for the o demethylation of vanillate and syringate. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, no. 3, 836-842.

Nordlund, I., J. Powlowski, A. Hagström, and V. Shingler. 1993. Conservation of regulatory and structural genes for a multi-component phenol hydroxylase within phenol-catabolizing bacteria that utilize a *meta*-cleavage pathway. *Journal of General Microbiology* 139, 2695-2703.

Nordlund, I., J. Powlowski, and V. Shingler. 1990. Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. Strain CF600. *J.Bacteriol.* 172, 6826-6833.

Oikawa, S.; Tsuda, M.; Endou, K.; Abe, H.; Matsuoka, M. y Nakajima, Y. 1985. Structure-activity realtionship for antibacterial action of phenolic and aromatic nitro compounds. An attempt at systematic identification of new antibacterial agents. *Chem. Pharm. Bull.* 33, no. 7, 2821-2831.

Pambou Tchivounda, H.; Koudogno, B.; Besace, Y. y Casadevall, E. 1991. Triterpene saponins from *Cylicodiscus gabunensis*, *Phytochemistry*, 30, no. 8, 2711-2716.

Panizzi, L.; Scarpati M^a. L. y Oriente, G. 1960. Costituzione della Oleuropeina, glucoside amaro e ad aziona ipotensiva dell'olivo. Nota II. *Gazz. Chim. Ital.* 90, 1449-1483.

Papadimitriou, E. K.; Chatjipavlidis, I. y Balis, C. 1997. Application of composting to olive mill wastewater treatment. *Environmental Technology*, 18, 101-107.

Paredes, M. J.; Monteoliva Sanchez, M.; Moreno, E.; Pérez, J.; Ramos Cormenzana A. y Martínez, J. 1986. Effect of waste waters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosphere*, 15, no. 5, 659-664.

Paredes. M. J.; Moreno, E.; Ramos Cormenzana A. y Martínez, J. 1987. Characteristics of soil after pollution with waste waters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, 16, no. 7, 1557-1564.

Pérez J.; Ramos Cormenzana, A. y Martínez, J. 1990. Bacteria degrading phenolic acids isolated on a polymeric phenolic pigment. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 38-42.

Pirisi, F. M.; Angioni, A.; Cabras, P.; Garau, V. L.; Sahjust di Teulada, M^a. T; Karim dos Santos, M. y Bandino. G. 1997. Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *Journal of chromatography A*, 768, 207-213.

Priefert, H., J. Rabenhorst, and A. Steinbüchel. 1997. Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. Strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J.Bacteriol.* 179:2595-2607.

Prieto M^a. A.; Pérez Aranda, A. y García, J. L. 1993. Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *Journal of bacteriology*, 175, no. 7, 2162-2167.

Prieto M^a. A.; y García, J. L. 1994. Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. *The journal of biological chemistry*, 269, no. 36, 22823-22829.

Prieto M^a. A.; Díaz, E. y García, J. L. 1996. Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *Journal of Bacteriology*, 178, no. 1, 111-120.

Raghavendra Rao, J. and J. E. Cooper. 1994. Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanism. *J.Bacteriol.* 176, no. 17, 5409-5413.

Ralph, J. P. y Catcheside, D. E. A. 1993. Action of aerobic microorganisms on the macromolecular fraction of lignite. *Fuel*, 72, no. 12, 1679-1686.

Ramos, J. L.; Díaz, E.; Dowling, D.; de Lorenzo, V.; Molin, S.; O'Gara, F.; Ramos, C. y N. Timmis., K. N. 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation, *Biotechnology*, 12, 1349-1355.

Ramos, J. L.; Haidour, A.; Duque, E.; Piñar, G.; Calvo, V. y Oliva, J. M. 1996. Metabolism of nitrate esters by a consortium of two bacteria. *Nature biotechnology*, 14, 320-322.

Ranalli, A. 1992. Microbial treatment of oil mill waste water. *Grasas y Aceites*, 43, fasc. 1, 16-19.

Ranalli, A. y Serraiocco, A. 1996. Quantitative and qualitative effects of a pectolytic enzyme in olive oil production. *Grasas y Aceites*, 47, fasc. 4, 227-236.

Ranalli, A. y De Mattia, G. 1997. Characterization of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *JAOCS*, 74, no. 9, 1105-1113.

Razdan, T. K.; Harkar, S.; Kachroo, V.; Koul, G. L. y Waight, E. S. 1983. Triterpenoids from *Phytolacca acinosa*, three oleanane derivatives, *Phytochemistry*, 22, no. 8, 1797-1800.

Reineke, W. y Knackmuss, H. J. 1988. (Microbial degradation of haloaromatics. *Annual Review of Microbiology* 42, 263-287.

Renis, H. E. 1969. In vitro antiviral activity of calcium elenolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 167-172.

Ribbons, D. W. 1971. Requirement of two protein fractions for *o*-demethylase activity in *Pseudomonas testosteroni*. *Febs Letters*, 12, no. 3, 161-165.

Rodríguez, Ma. M.; Pérez, J.; Ramos Cormenzana A. y Martínez, J. 1988. Effect of extracts obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085, *Journal of applied bacteriology*, 64, 219-226.

Rosendal Jensen, S. y Juhl Nielsen, B. 1976. A new coumarin, Fraxidin 8-*o*-*b*-D-glucosido y 10-hidroxiligstrosido from bark of *Fraxinus exelsior*. *Phytochemistry*, 15, 221-223.

Ruiz Barba, J. L.; Brenes Balbuena, M.; Jiménez Díaz, R.; García García P. y Garrido Fernández, A. 1993. Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 15-19.

Sáinz-Jiménez, C., Gómez-Alarcón, G. y De Leeuw, J. W. 1986. Naturaleza química del polímero aislado del alpechín fresco y de lodo de balsas de

evaporación. Resumen simposio internacional sobre valoración de los subproductos del olivar: alpechín y orujo. Sevilla.

Sainz Jiménez, C.; De Leeuw, J. W. y Gómez Alarcón, G. 1987. Sludge from the waste water of the olive processing industry: a potential soil fertilizer. *The Science of the total Environment*, **62**, 445-452.

Sariaslani, F.S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. In H.(referee) Dalton (ed.), *Critical reviews in Biotechnology*, vol. 9, p.171-257.

Sarwar Alam, M.; Chopra, N.; Ali, M. y Niwa, M. 1996. Oleanen and stigmasterol derivatives from *Ambroma augusta*, *Phytochemistry*, **41**, No. 4, 1197-1200.

Scioli, C. y Vollaro, L. 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Wat. Res.*, **31**, no. 10, 2520-2524.

Seo, S.; Tomita, Y. y Tori, 1975. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus hara* tissue cultures, *K.Tetrahedron Letters* No. 1, 7-10.

Seo, S.; Tomita, Y. y Tori, K. 1981. (Biosynthesis of oleanene- and ursene-type triterpenes from [4-¹³C] mevalonolactone and [1,2-¹³C₂] acetate in tissue cultures of *Isodon japonicus hara*, *J. Am. Chem.* **103**, 2075-2080

Servili, M. y Montedoro, G. F. 1989. *Industrie Alimentari*, **28**, 14-18 y 26.

Shasha, B. y Leibowitz, J. 1960. On the oleuropein, the bitter principle of olives. *Journal Organic Chemistry*, **26**, 1948-1954.

Shingler, V., F. Ch. H. Franklin, M. Tsuda, D. Holroyd, and M. Bagdasarian. 1989. Molecular Analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *Journal of General Microbiology* **135**:1083-1092.

Slater, J.H. and D. Lovatt. 1996. Biodegradation and the significance of microbial communities, cap. 15, vol. 13. p.439-484. In D.T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*,

Smith M. R. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria, *Biodegradation*, **1**, 191-206.

Sorlini, C.; Andreoni, V.; Ferrari, A. y Ranalli, A. 1986. The influence of some phenolic acids presents in oil-mill waters on microbic groups for he mehanogenesis. *Procceding international symposium on olive by-products valorization*, Sevilla.

Sparnins, V. L. Chapman, P. J. y Dagley, Stanley. 1974. Bacterial degradation of 4-hydroxyphenylacetic acid and homoprotocatechuic acid. *Journal of Bacteriology*, **120**, 159-167.

Spence, E.L., M. Kawamukai, J. Sanvoisin, H. Braven, and T. D. H. Bugg. 1996. Catechol dioxygenases from *Escherichia coli* (MhpB) and *Alcaligenes eutrophys* (MpcI): Sequences analysis and biochemical properties of a third family of extradiol dioxygenases. *J.Bacteriol.* **178**, 5249-5256.

Sugiyama, M.; Machida, K.; Matsuda, N. y Kikuchi, M. 1993. A secoroidoid glycoside from *Osmanthus asiaticus*. *Phytochemistry*, **34**, no. 4, 1169-1170.

Sutarjadi, Malingre, TH. M. y Van Os, F. H. L. 1978. Iridoid and phenolic glycosides of *Fraxinus griffithii*. *Phytochemistry* **17**, 564.

Tchivounda, H.P., B. Koudogbo, Y. Besace, and E. Casadevall. 1991. Triterpene saponins from *Cylicodiscus gabunensis*. *Phytochemistry* **30**:2711-2716.

Tori, K.; Seo, S.; Shimaoka, A. y Tomita, Y. 1974 Carbon-13 NMR spectra of olean-12-enes. Full signal assignments including quaternary carbon signals assigned by use of indirect ^{13}C , ^1H spin couplings, *Tetrahedron Letters*, **48**, 4227-4230.

Tsukamoto, H.; Hisada, S. y Nishibe, S. 1985. Isolation of secoiridoid glucosides from the bark of *Olea europaea*. *Shoyakugaku Zasshi*, **39**, no. 1, 90-92.

Tsimidou, M.; Lytridou, M.; Boskou, D.; Pappa Louisi, A.; Dotsifaki F. y Petrakis, C. 1996. On the determination of minor phenolic acids of virgen olive oil by RP-HPLC. *Grasas y Aceites*, **47**, fasc. 3, 151-157.

Van den Tweel, W. J. J.; Smits, J. P. y de Bont J. A. M.. 1998. catabolism of dl-a-phenylhydracrylic, phenylacetic and 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid via homogentisic acid in a *Flavobacterium* sp. *Arch. Microbiol.* **149**, 207-213.

Vazquez Roncero, A.; Maestro Durán, R. y Graciani Constante, E. 1974. Componentes fenólicos de la aceituna. II. Polifenoles del alpechín, *Grasas y Aceites*, **25**, 341-345.

Venturi, V.; Zennaro, F.; Degrassi, G.; Okeke, B. C. y Bruschi, C, V. 1998. Genetics of ferulic acid bioconversion to protocatechuic acid in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Microbiology*, **144**, 965-973.

Vicuña, R. 1988. Bacterial degradation of lignin. Rewiew. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 646-655.

Walter, W.M. JR.; Fleming, H. P. y Etchelles, J. L. 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied Microbiology*, 26, no. 5, 773-776.

Wang, X. Z.; Li, B.; Herman, P. L. y Weeks, D. P. 1997. Three-component enzyme system catalyzes the *o*-demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, no. 4, 1623-1626.

White, G.F., Russell, N. J., y Tidswell, E. C. 1996. Bacterial scission of ether bonds. *Microbiological Reviews* 60, 216-232.

Whittaker, J.W., Orville, A. M. y J. D. Lipscomb. 1996. Protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Brevibacterium fuscum*, p.82-88. In M.E. Lidstrom (ed.), *Methods in Enzymology*. vol. 188. Hydrocarbons and methylotropy, and related compounds.

Wlassics, I.; Visentin, W.; Burzio, F.; Bonciarelli, U.; Censi M. C. y Tei, F. 1992. Trattamento con H₂O₂ di acque di vegetazione su scala industriale per l'eliminazione della loro fito e biotossicità. Parte I: reazione chimica. *La rivista italiana delle sostanze grasse*, 69, 359-364.

Wolgel, S.A. y Lipscomb, J. D. 1986. Protocatechuate 2,3-dioxygenase from *Bacillus macerans*. *Methods in Enzymology*. vol. 188: Hydrocarbons and related compounds. cap. 16. 95-101.

Yamamoto, Y.; Niki, E.; Shiokawa H. y Kamiya, Y. 1979. Ozonation of organic compounds. 2. Ozonation of phenol in water. *Journal Organic Chemistry*, 44, no. 13, 2137-2142.

Yang, J.; Wang, X. Z.; Hage, D. S.; Herman, P. L. y Weeks, D. P. 1994. Analysis of dicamba degradation by *Pseudomonas maltophilia* using high-performance capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 219, 37-42.

Young, L.Y. 1996. Anaerobic degradation of aromatic compound, p.487-523. In D.T. Gibson (ed.), 1986. *Microbial degradation of organic compounds*, vol. 13, cap. 16.

Yu, Q.; Wu, C.; Zeng, Y.; Zhang, G.; Guo, Y. y Liu, W. 1990. *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi*, 4, 235.



Biblioteca Universitaria de Granada



01052633



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 30/7/99
ENTRADA NUM. 2708

UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO

Fecha: 16 de Julio de 1999
Su Ref^a.
Nuestra Ref^a.
Fecha de Salida:
Unidad de Origen: COMISIÓN DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Registro General
26 JUL. 1999
SALIDA N.º 10020

Destinatario:

Ilmo. Sr. DECANO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS

En cumplimiento del artículo 36 de las Normas Reguladoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D^a.MATILDE GIL GARCIA titulada CARACTERIZACION QUIMICA DE ALPECHIN COMO BASE PARA DESARROLLAR UNA ESTRATEGIA BIOLOGICA PARA SU ELIMINACION y dirigida por el Profesor/es Dr/es JUAN LUIS RAMOS MARTIN, ALI HAIDOUR con objeto de mantenerla depositada desde el día 16 de Julio de 1999 hasta el día 20 de Septiembre de 1999 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

Granada, a 16 de Julio de 1999.

LA SECRETARIA DE LA COMISIÓN

DE DOCTORADO



S. WJ

Fdo.: SULTANA WAHNON BENSUSAN
Secretaria de la Comisión de Doctorado