



**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

**TESIS DOCTORAL**



**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE  
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE  
ORIGEN VEGETAL. CONTRIBUCIÓN A  
LA SÍNTESIS DE DERIVADOS Y  
ANÁLOGOS ESTRUCTURALES**

**PRESENTADA POR:  
Juan Ortega Vidal**

**DIRIGIDA POR:  
Joaquín Altarejos Caballero  
Sofía Salido Ruiz**

**JAÉN, 2021**

TESIS DOCTORAL

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE  
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ORIGEN  
VEGETAL. CONTRIBUCIÓN A LA SÍNTESIS DE  
DERIVADOS Y ANÁLOGOS ESTRUCTURALES**

*Memoria para optar al Grado de Doctor  
presentada por Juan Ortega Vidal*



**Fdo. Juan Ortega Vidal**

Director de la Tesis

Codirectora de la Tesis



**Fdo. Dr. Joaquín Altarejos Caballero**  
*Catedrático de Química Orgánica*  
Universidad de Jaén



**Fdo. Dra. Sofía Salido Ruiz**  
*Prof. Titular de Química Orgánica*  
Universidad de Jaén

Jaén, Julio 2021

## ***AGRADECIMIENTOS***

He querido dejar la redacción de esta parte para el final para no olvidar a nadie que de una forma u otra haya contribuido a la consecución de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, y como no puede ser de otra forma, me gustaría dar las gracias más sinceras a mis directores de Tesis, Sofía y Joaquín, por su confianza depositada en mí y tratarme desde el primer momento como uno más del grupo. Agradeceros enormemente tanto la formación profesional como la enseñanza personal que me habéis aportado durante estos años, las incalculables horas que me habéis dedicado y vuestras inagotables ganas de trabajar en este proyecto. Me habéis demostrado que la investigación es paciencia y constancia, inculcándome vuestra envidiable forma de afrontar los diferentes problemas que se nos han presentado, enseñándome que las cosas por muy complicadas que se presenten, con esfuerzo, perseverancia, trabajo y tesón se consiguen. Como un excelente capitán de un barco consigue llegar a puerto sano y salvo luchando contra todo tipo de tempestades, vosotros me habéis guiado hasta conseguir este objetivo. Muchísimas gracias por todo, de corazón. A veces se toman decisiones muy importantes que marcarán el resto de tu vida y, sin duda, fue un gran acierto elegir hacer la Tesis con vosotros.

Alfonso, cómo agradecerte lo mucho que has hecho por mí. Me presentaron a un compañero y me llevo a un gran amigo. Desde el primer momento me diste confianza y me hiciste sentir como si llevara toda la vida con vosotros. Gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado, compartiendo conmigo tu tiempo y consejos. Con gente como tú, todo es muchísimo más sencillo. Te deseo lo mejor en este camino de la investigación, largo y agotador pero que muy pronto vas a encontrar tu más que merecido hueco.

Quiero dar las gracias al personal del Centro de Instrumentación Científico-Técnico (CICT) de la Universidad de Jaén, especialmente a Oscar del Pico. Oscar, muchísimas gracias por haberme ayudado de forma totalmente desinteresada a resolver los muchos problemas técnicos que se han presentado durante estos años y

animarme en todo momento a montar y desmontar los equipos hasta conseguir solucionar el problema. Aparte de la formación química e investigadora que me ha aportado la realización de esta Tesis, me llevo estos conocimientos “técnicos” tan valiosos que no hubiera sido así si no es por ti. Desearía trabajar en algún momento contigo para poder empaparme de todos tus conocimientos.

Agradecer a todas las personas que nos han aportado las diferentes muestras que se han estudiado en este trabajo. Al Sr. Rafael Peinado, propietario de la finca de cerezos de Alcalá la Real (Jaén), por las muestras de madera de cerezo. Al Dr. Francisco T. Arroyo, investigador del centro IFAPA “Las Torres-Tomejil” de Alcalá del Río (Sevilla), así como al propietario de la finca “La Veguilla” de Guadalcazar (Córdoba) por aportarnos las muestras de ciruelo japonés. A Ángel Valderas, ingeniero agrícola de la Agrupación de Cooperativas del Valle del Jerte (Cáceres), por actuar de intermediario entre nosotros y los propietarios de las fincas que nos proporcionaron la madera de ciruelo europeo. A los Drs. Iñaki Hormaza y Jorge González, investigadores del centro CSIC “La Mayora” de Málaga, por facilitarnos las muestras de madera de lichi. A los Drs. Manuel Moya y Francisco Espínola, profesores del departamento de Ingeniería Química, por proporcionar las dos primeras muestras de aceite de oliva ricas en compuestos fenólicos. A la ing. M<sup>a</sup> Del Mar Manrique y al Sr. Agustín Oliver, maestro de almazara de la Coop. “San Vicente” de Mogón (Jaén), por aportar las muestras de aceite de oliva de repaso. Al Centro Experimental IFAPA “Alameda del Obispo” de Córdoba, y en especial a la Dra. Angjelina Belaj, por facilitarnos las muestras de olivo de diferentes variedades. A Carmen Pérez Bonilla, propietaria de una de las fincas en las que se han recogido muestras de olivo para el análisis variacional. Al Sr. Miguel Bustos, de la Coop. “Ntra. Sra. Del Pilar” de Villacarrillo (Jaén) y al ing. Alejandro Tortosa, de la Coop. “Campo Enguera” de Enguera (Valencia), por aportarnos las muestras de olivo “Cerezuela” y “Alfafara”, respectivamente. A la Lcda. Sandra García de Lucas, botánica responsable del jardín botánico “Torre del Vinagre” situado en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas, y al Sr. José Pérez, de Mogón (Jaén), por facilitarnos las muestras de aligustre y fresno.



Al Dr. Juan Peragón Sánchez, profesor del Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén, por permitirme participar en el estudio sobre triterpenoides pentacíclicos en muestras de olivo y que formaba parte del proyecto “Análisis del patrón de expresión de triterpenos pentacíclicos presentes en el olivo y caracterización de su actividad biológica”.

A la Dra. Catalina Alarcón de la Lastra, profesora del Departamento de Farmacología de la Universidad de Sevilla, por darme la posibilidad de formar parte del proyecto “Secoiridoides del olivo como nuevos nutraceuticos moduladores epigeneticos de la respuesta inmuno-inflamatoria” y ofrecerme un contrato con el que financiar parte del trabajo de esta Tesis. Así como a las Dras. Marina Sánchez y María Isabel Villegas, y a las doctorandas María Luisa Castejón, Tatiana Montoya y Rocío Muñoz, por su implicación en la evaluación de las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de los secoiridoides y derivados de origen natural y sintético.

A los Drs. Antonio Gálvez, Elena Ortega y Antonio Cobo, del área de Microbiología de la Universidad de Jaén, por llevar a cabo los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana y *antibiofilm* de los compuestos aislados de la madera de cerezo y ciruelo.

A los Drs. Ginés M. Salido y Juan A. Rosado, de Fisiología de la Universidad de Extremadura (Cáceres), por la elaboración de los ensayos para evaluar la actividad antitumoral del compuesto oleocantal, y al Dr. Miguel A. Medina, profesor de la Universidad de Málaga, por la evaluación de la actividad antiangiogénica de los compuestos oleaceina y oleocantal. Así como al Dr. Ignacio J. Molina, profesor del departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, e Inmunología de la Universidad de Granada, y a Chiara Pastorio, estudiante de Máster, por su colaboración con el ensayo de la actividad proapoptótica del compuesto oleocantal.

Al grupo de Investigación en Compuestos de Interés Biológico (GICIB, FQM-182) por la ayuda económica para la asistencia a congresos.

A todos los miembros del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad de Jaén y, en especial a los Drs. Pablo Linares, Justo Cobo, Paco Hueso y Antonio Marchal, por vuestra amabilidad y cercanía conmigo.

A mis compañeros de pasillo Alba, Iván, Luis y María Fontecha que con vuestras sonrisas, simpatía y buen humor, habéis hecho, sin duda, que la finalización de esta Tesis me resulte más sencilla. A Cristina Cuadrado por el periodo tan agradable que pasamos en el laboratorio, mostrándote tan servicial y dispuesta a echar una mano en cualquier momento que te necesitara. Y como no, a Lucía Ruiz, de la que estoy más que agradecido por la ayuda que me has prestado en la última etapa de este trabajo. Mostrando en todo momento una gran voluntad, capaz de afrontar cualquier tarea.

A todas y cada una de las personas que habéis pasado por el laboratorio durante estos años que de una forma u otra habéis aportado vuestro granito de arena a esta Tesis.

A nivel personal, quiero dar las gracias, en primer lugar, a mis padres, uno de los pilares más importantes de mi vida. Sin lugar a duda esto no hubiera sido posible sin vosotros. Muchísimas gracias por todo vuestro apoyo durante estos años, especialmente en los últimos meses en los que más lo he necesitado. Gracias también a ti, hermana, por tus pequeños pero a la vez grandes consejos, un claro ejemplo de esfuerzo y constancia capaz de inspirar a cualquiera. Te prometo que a partir de ahora intentaré relajarme un poco más.

En segundo lugar dar las gracias a Marisa, otra de las personas más importantes de mi vida y mi compañera de viaje durante todos estos años. Gracias por estar ahí siempre que te he necesitado, por tu apoyo y por hacer todo lo posible para levantarme el ánimo en los momentos más difíciles. No puedo estar más agradecido del enorme esfuerzo que has hecho con la revisión de la memoria de esta Tesis. Poco a poco vamos cumpliendo metas.

No quiero acabar este apartado de agradecimientos sin acordarme del resto de mi familia, y en especial de mi primo Juanma, por ser siempre tan atento conmigo y por saber valorar el trabajo que supone esta Tesis.

María Alejo, no voy a olvidar los agradables momentos de desahogo que pasábamos durante las comidas, que como un oasis en medio del desierto nos daban la energía anímica para echar la tarde. Muchísimas gracias por todos tus consejos y tu apoyo.

También me gustaría dedicar unas líneas a los miembros del grupo de investigación de Química Analítica, especialmente, a María Luisa, Eulogio y Pilar Ortega, por vuestra cálida acogida y por hacerme sentir como uno más del grupo durante el año en el que estuve trabajando con vosotros. También quiero acordarme de Maribel, Alba, Pilar, Sara, Rubén, Mamen y Mada que con vuestra amabilidad, compañerismo y generosidad hicisteis que este año se me hiciera muy ameno.

A la Universidad de Jaén por el proyecto “Análisis del patrón de expresión de triterpenos pentacíclicos presentes en el olivo y caracterización de su actividad biológica” (UJA2014/07/13). Al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por la concesión de los proyectos de investigación “Secoiridoides del olivo como nuevos nutraceuticos moduladores epigeneticos de la respuesta inmuno-inflamatoria” (AGL2017-89342-P) y “Development of LDHA inhibitors as new strategy for the treatment of primary hyperoxaluria”.

Al Dr. Audrius Pukalskas, profesor de la *Kaunas Technology University*, por su ayuda prestada para la búsqueda de alojamiento en Kaunas (Lituania) para la realización de mi estancia que finalmente no se pudo hacer debido a la pandemia.

***Juan***

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>                                                                                                                                | 1   |
| <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                                   | 5   |
| <b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>                                                                                                                 | 7   |
| 1. FLAVONOIDES Y PROANTOCIANIDINAS                                                                                                                 | 7   |
| 1.1 Rasgos estructurales                                                                                                                           | 7   |
| 1.2 Actividades biológicas                                                                                                                         | 9   |
| 1.3 Fuentes naturales de flavonoides y proantocianidinas                                                                                           | 10  |
| 1.3.1 <i>Cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo</i>                                                                                             | 10  |
| 1.3.2 <i>Lichi</i>                                                                                                                                 | 29  |
| 1.3.3 <i>Arándano rojo americano</i>                                                                                                               | 41  |
| 2. SECOIRIDOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS                                                                                                         | 51  |
| 2.1 Rasgos estructurales                                                                                                                           | 51  |
| 2.2 Actividades biológicas                                                                                                                         | 51  |
| 2.3 Fuentes naturales de secoiridoides                                                                                                             | 52  |
| 2.3.1 <i>Olivo</i>                                                                                                                                 | 52  |
| 2.3.2 <i>Aceite de oliva</i>                                                                                                                       | 71  |
| 3. TRITERPENOIDES PENTACÍCLICOS                                                                                                                    | 87  |
| 3.1 Rasgos estructurales                                                                                                                           | 87  |
| 3.2 Actividades biológicas                                                                                                                         | 88  |
| 3.3 Fuentes naturales de triterpenoides pentacíclicos                                                                                              | 88  |
| 3.3.1 <i>Olivo</i>                                                                                                                                 | 88  |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                                                                                                                      | 91  |
| 4. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y PROANTOCIANIDINAS EN <i>Prunus</i> , <i>Litchi</i> y <i>Vaccinium</i>             | 91  |
| 4.1 Estudio de la parte leñosa de poda de cerezo ( <i>Prunus avium</i> L.)                                                                         | 91  |
| 4.1.1 <i>Material vegetal, obtención de extractos de madera de cerezo y análisis</i>                                                               | 91  |
| 4.1.2 <i>Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de cerezo y aislamiento de flavonoides</i>                                          | 95  |
| 4.1.3 <i>Elucidación estructural de los compuestos aislados e identificados en madera de cerezo</i>                                                | 100 |
| 4.1.4 <i>Cuantificación de los flavonoides identificados en los extractos de AcOEt de madera de cerezo de las diferentes variedades estudiadas</i> | 113 |

|       |                                                                                                                                               |     |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2   | Estudio de la parte leñosa de poda de ciruelo europeo ( <i>Prunus domestica</i> L.)                                                           | 115 |
| 4.2.1 | Material vegetal, obtención de extractos de madera de ciruelo europeo y análisis                                                              | 115 |
| 4.2.2 | Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de ciruelo europeo y aislamiento de flavonoides y proantocianidinas                     | 119 |
| 4.2.3 | Elucidación estructural de los compuestos aislados e identificados en madera de ciruelo europeo                                               | 121 |
| 4.2.4 | Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de madera de ciruelo europeo de las diferentes variedades estudiadas | 131 |
| 4.3   | Estudio de la parte leñosa de poda de ciruelo japonés ( <i>Prunus salicina</i> L.)                                                            | 133 |
| 4.3.1 | Material vegetal, obtención de extractos de madera de ciruelo japonés y análisis                                                              | 133 |
| 4.3.2 | Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de madera de ciruelo japonés de las diferentes variedades estudiadas | 138 |
| 4.4   | Estudio de la parte leñosa de poda de lichi ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn.)                                                                  | 139 |
| 4.4.1 | Material vegetal, obtención de extractos de madera de lichi y análisis                                                                        | 139 |
| 4.4.2 | Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de lichi y aislamiento de flavonoides y procianidinas                                   | 141 |
| 4.4.3 | Elucidación estructural de los compuestos aislados e identificados en madera de lichi                                                         | 143 |
| 4.4.4 | Identificación tentativa por HPLC-DAD/ESI-MS de proantocianidinas minoritarias en la madera de lichi                                          | 153 |
| 4.4.5 | Cuantificación de flavonoides y proantocianidinas en los extractos de AcOEt de madera de lichi de las variedades estudiadas                   | 161 |
| 4.5   | Estudio de un extracto comercial de arándano rojo americano ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.)                                              | 162 |
| 4.5.1 | Material vegetal, obtención de extracto de arándano rojo americano y análisis                                                                 | 162 |
| 4.5.2 | Fraccionamiento cromatográfico del extracto de arándano rojo americano                                                                        | 163 |
| 4.5.3 | Identificación tentativa por HPLC-DAD/ESI-MS de flavonoides y procianidinas en el extracto de AcOEt de arándano rojo americano                | 164 |
| 4.5.4 | Cuantificación de procianidinas en la fracción D <sub>2</sub> (IV)                                                                            | 167 |

---

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5. EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TRITERPENOIDES PENTACÍCLICOS EN <i>Olea europaea</i> L.                                           | 169 |
| 5.1 Material vegetal, obtención de extractos de fruto, hoja, tallo y raíz de olivo de las variedades 'Picual', 'Frantoio' y 'Koroneiki', y análisis | 170 |
| 5.2 Cuantificación de triterpenoides pentacíclicos en extractos alcohólicos de fruto, hoja, tallo y raíz de olivo de diferentes variedades          | 171 |
| 6. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECOIRIDOIDES EN <i>Olea europaea</i> L.                                                         | 179 |
| 6.1 Aislamiento y purificación de oleaceína, oleocantal y aglicones de oleuropeína y ligustrósido a partir de aceite de oliva                       | 180 |
| 6.1.1 Extracción del aceite de oliva y análisis del extracto por HPLC-DAD                                                                           | 180 |
| 6.1.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de aceite de oliva y aislamiento de secoiridoides                                                 | 182 |
| 6.1.3 Elucidación estructural de los compuestos aislados a partir de aceite de oliva                                                                | 184 |
| 6.2 Búsqueda de aceites ricos en fenoles                                                                                                            | 191 |
| 6.2.1 Extracción de los aceites de oliva y análisis de los extractos por HPLC-DAD                                                                   | 191 |
| 6.2.2 Cuantificación de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal en los extractos hidroalcohólicos de aceite de oliva                                         | 192 |
| 6.3 Aislamiento y purificación de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido a partir de madera de olivo                                                    | 194 |
| 6.3.1 Material vegetal, obtención del extracto de madera de olivo y análisis                                                                        | 195 |
| 6.3.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de olivo 'Picual' y aislamiento de secoiridoides                                        | 195 |
| 6.3.3 Elucidación estructural de los compuestos aislados a partir de madera de olivo                                                                | 196 |
| 6.4 Búsqueda de oleuropeína y ligustrósido en otras variedades de olivo y en fresno y aligustre                                                     | 199 |
| 6.4.1 Material vegetal, obtención de extractos de madera y hoja de otras variedades de olivo, de fresno y aligustre                                 | 199 |
| 6.4.2 Cuantificación de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en los extractos de AcOEt de otras variedades de olivo y en fresno y aligustre           | 202 |
| 6.5 Variación estacional de la concentración de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en madera y hoja de olivo 'Picual'                               | 206 |

|       |                                                                                                                                                        |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.5.1 | <i>Material vegetal, obtención de extractos de madera y hoja de olivo y análisis</i>                                                                   | 206 |
| 6.5.2 | <i>Cuantificación de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en los extractos de AcOEt de madera y hoja de las muestras de olivo del estudio estacional</i> | 209 |
| 7.    | <b>SÍNTESIS DE (-)-OLEACEÍNA Y (-)-OLEOCANTAL Y SUS DERIVADOS METILADOS</b>                                                                            | 213 |
| 7.1   | Síntesis de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal a partir de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido                                                              | 214 |
| 7.2   | Síntesis de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal a mayor escala                                                                                              | 219 |
| 7.3   | Síntesis de derivados metilados de oleuropeína y ligustrósido                                                                                          | 220 |
| 7.4   | Síntesis de derivados metilados de oleaceína y oleocantal                                                                                              | 223 |
| 7.5   | Síntesis de (-)-dimetil-oleaceína y (-)-metil-oleocantal a mayor escala                                                                                | 224 |
| 8.    | <b>SÍNTESIS DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE OLEOCANTAL</b>                                                                                                | 227 |
| 8.1   | Planteamiento sintético                                                                                                                                | 227 |
| 8.2   | Adición de malonato de dietilo a 4-metoxibenzaldehído                                                                                                  | 228 |
| 8.3   | Descarboxilación de Krapcho del tetraéster 62                                                                                                          | 229 |
| 8.4   | Reducción del diéster 63                                                                                                                               | 232 |
| 9.    | <b>ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS</b>                                                                                       | 235 |
| 9.1   | Actividad antioxidante de los extractos de cerezo, ciruelo europeo, ciruelo japonés, lichi y arándano rojo americano                                   | 235 |
| 9.1.1 | <i>Actividad antioxidante offline</i>                                                                                                                  | 237 |
| 9.1.2 | <i>Estudio mediante la técnica online HPLC-DAD-DPPH</i>                                                                                                | 242 |
| 9.2   | Actividad inhibidora de los extractos y compuestos aislados de cerezo y ciruelo de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA)                           | 247 |
| 9.3   | Actividad antibacteriana y antipelícula de los compuestos aislados a partir de madera de cerezo y ciruelo europeo                                      | 253 |
| 9.4   | Actividad antitumoral de (-)-oleocantal                                                                                                                | 256 |
| 9.5   | Actividad antiinflamatoria de (-)-oleocantal, forma monoaldehídica del aglicón de oleuropeína y (-)-metil-oleocantal                                   | 256 |
| 9.6   | Actividad antiangiogénica de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal                                                                                            | 256 |
|       | <b>MATERIALS AND METHODS</b>                                                                                                                           | 259 |
| 10.   | <b>GENERAL PROCEDURES</b>                                                                                                                              | 259 |
| 10.1  | Solvents and reagents                                                                                                                                  | 259 |
| 10.2  | Chromatographic techniques                                                                                                                             | 260 |

---

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 10.2.1 Analytical Thin Layer Chromatography (TLC)                                                                                          | 260 |
| 10.2.2 Column Chromatography (CC)                                                                                                          | 261 |
| 10.2.3 Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC®)                                                                                   | 261 |
| 10.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)                                                                                       | 262 |
| 10.2.5 Gas Chromatography (GC)                                                                                                             | 262 |
| 10.3 Analytical and spectroscopy techniques                                                                                                | 263 |
| 10.3.1 Specific optical rotation ( $[\alpha]_D$ )                                                                                          | 263 |
| 10.3.2 Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)                                                                                       | 263 |
| 10.4 Hyphenated techniques                                                                                                                 | 263 |
| 11. ISOLATION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND PROANTHOCYANIDINS IN <i>Prunus</i> , <i>Litchi</i> AND <i>Vaccinium</i> | 265 |
| 11.1 Study of the pruning wood of cherry tree ( <i>Prunus avium</i> L.)                                                                    | 265 |
| 11.1.1 Collection and extraction of cherry pruning wood                                                                                    | 265 |
| 11.1.2 HPLC–DAD analyses of cherry wood extracts                                                                                           | 266 |
| 11.1.3 HPLC–DAD/ESI–MS analysis of cherry wood extract, cultivar ‘Starking’                                                                | 266 |
| 11.1.4 Chromatographic fractionation of cherry wood extract and isolation of flavonoids                                                    | 267 |
| 11.1.5 Tentatively identification of flavonoids in cherry wood ethyl acetate extract, cultivar ‘Starking’, by HPLC–DAD/ESI–MS              | 286 |
| 11.1.6 Quantification of identified flavonoids in ethyl acetate extracts of cherry tree woods by HPLC–DAD                                  | 287 |
| 11.2 Study of the pruning woody of European plum tree ( <i>Prunus domestica</i> L.)                                                        | 288 |
| 11.2.1 Collection and extraction of European plum pruning wood                                                                             | 288 |
| 11.2.2 HPLC–DAD analyses of European plum wood extracts                                                                                    | 289 |
| 11.2.3 HPLC–DAD/ESI–MS analysis of European plum wood extract, cultivar ‘De la Rosa’                                                       | 290 |
| 11.2.4 Chromatographic fractionation of European plum wood extract and isolation of flavonoids and proanthocyanidins                       | 290 |
| 11.2.5 Quantification of identified compounds in ethyl acetate extracts of European plum tree woods by HPLC–DAD                            | 304 |
| 11.3 Study of the pruning wood of Japanese plum tree ( <i>Prunus salicina</i> L.)                                                          | 305 |
| 11.3.1 Collection and extraction of Japanese plum pruning wood                                                                             | 305 |
| 11.3.2 HPLC–DAD analysis of Japanese plum wood extracts                                                                                    | 306 |
| 11.3.3 Quantification of identified compounds in ethyl acetate extract of                                                                  | 306 |



|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Japanese plum tree woods by HPLC–DAD</i>                                                                                                |     |
| 11.4 Study of pruning wood of litchi tree ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn.)                                                                 | 306 |
| 11.4.1 Collection and extraction of litchi pruning wood                                                                                    | 306 |
| 11.4.2 HPLC–DAD analysis of litchi wood extracts                                                                                           | 307 |
| 11.4.3 HPLC–DAD/ESI–MS analysis of litchi wood extract, cultivar ‘Mauritius’                                                               | 307 |
| 11.4.4 Chromatographic fractionation of litchi wood extract and isolation of proanthocyanidins                                             | 308 |
| 11.4.5 Tentatively identification of proantocianidins in litchi wood ethyl acetate extract, cultivar ‘Mauritius’, by HPLC–DAD/ESI–MS       | 318 |
| 11.4.6 Quantification of identified flavonoids and proanthocyanidins in ethyl acetate extracts of litchi tree woods by HPLC–DAD            | 324 |
| 11.5 Study of a commercial extract of cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.)                                                       | 325 |
| 11.5.1 Re-extraction of a commercial cranberry extract                                                                                     | 325 |
| 11.5.2 HPLC–DAD analysis of cranberry ethyl acetate extract                                                                                | 325 |
| 11.5.3 Chromatographic fractionation of cranberry extract and tentatively identification of flavonoids and procyanidins by HPLC–DAD/ESI–MS | 325 |
| 11.5.4 Quantification of procyanidins in cranberry fraction D <sub>2</sub> (IV) by HPLC–DAD                                                | 333 |
| 12. EXTRACTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF PENTACYCLIC TRITERPENOIDS IN <i>Olea europaea</i> L.                                  | 335 |
| 12.1 Collection and extraction of olive samples                                                                                            | 335 |
| 12.2 HPLC–DAD analyses of alcoholic extracts of olive fruit pulps, leaves and stems                                                        | 335 |
| 12.3 HPLC–DAD/ESI–MS analyses of alcoholic extract of olive roots                                                                          | 336 |
| 12.4 Quantification of triterpenoids in olive samples by HPLC–DAD and HPLC–DAD/ESI–MS                                                      | 336 |
| 13. ISOLATION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SECOIRIDOIDS IN <i>Olea europaea</i> L.                                                | 341 |
| 13.1 Isolation of oleacein, oleocanthal and aglycones of oleuropein and ligustroside from olive oil                                        | 341 |
| 13.1.1 Collection and extraction of olive oil                                                                                              | 341 |
| 13.1.2 Analysis of hydroalcoholic extracts of olive oil by HPLC–DAD                                                                        | 341 |
| 13.1.3 Analysis of hydroalcoholic extract by HPLC–DAD/ESI–MS                                                                               | 342 |

---

|                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 13.1.4 Chromatographic fractionation of olive oil extract and purification of phenolics                                     | 342 |
| 13.2 Content of (–)-oleacein and (–)-oleocanthal in olive oils                                                              | 349 |
| 13.2.1 Collection and extraction of olive oils                                                                              | 349 |
| 13.2.2 Analysis of hydroalcoholic extracts by HPLC–DAD                                                                      | 350 |
| 13.2.3 Quantification of (–)-oleacein and (–)-oleocanthal in olive oils by HPLC–DAD                                         | 350 |
| 13.3 Isolation of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside from olive tree wood                                                  | 351 |
| 13.3.1 Collection and extraction of olive pruning wood                                                                      | 351 |
| 13.3.2 HPLC–DAD analysis of olive wood extract                                                                              | 351 |
| 13.3.3 Chromatographic fractionation of olive wood extract and isolation of secoiridoids                                    | 351 |
| 13.4 Study of the pruning woods and leaves of several olive tree cultivars and other Oleaceae species                       | 356 |
| 13.4.1 Collection and extraction of olive pruning woods and leaves                                                          | 356 |
| 13.4.2 HPLC–DAD analysis of olive wood and leaf extracts                                                                    | 357 |
| 13.4.3 Quantification of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside in olive wood and leaf extracts by HPLC–DAD                    | 357 |
| 13.5 Seasonal variation of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside in olive wood and leaf extracts                              | 360 |
| 13.5.1 Collection and extraction of olive wood and leaf samples for seasonal study                                          | 360 |
| 13.5.2 HPLC–DAD analysis of olive wood and leaf extracts for seasonal study                                                 | 361 |
| 13.5.3 Quantification by HPLC–DAD of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside in olive wood and leaf extracts for seasonal study | 361 |
| 14. SYNTHESIS OF OLEACEIN AND OLEOCANTHAL AND THEIR METHYLATED DERIVATIVES                                                  | 365 |
| 14.1 Synthesis of (–)-oleacein and (–)-oleocanthal                                                                          | 365 |
| 14.2 Synthesis of (–)-dimethyl-oleacein and (–)-methyl-oleocanthal                                                          | 367 |
| 14.2.1 Methylation of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside                                                                   | 367 |
| 14.2.2 Synthesis of (–)-dimethyl-oleacein and (–)-methyl-oleocanthal                                                        | 375 |
| 14.3 Synthesis of (–)-oleacein, (–)-oleocanthal and their methylated derivatives in a multigram scale                       | 378 |
| 15. SYNTHESIS OF STRUCTURAL ANALOGS OF OLEOCANTAL                                                                           | 379 |
| 15.1 Reaction between 4-methoxybenzaldehyde and diethyl malonate                                                            | 379 |

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| 15.2 Krapcho decarboxylation of the tetraester 62 | 382 |
| 15.3 Reduction of diester 63                      | 384 |
| 16. BIOLOGICAL ACTIVITIES                         | 385 |
| 16.1 Antioxidant activity                         | 385 |
| 16.1.1 <i>Offline quantitative assay</i>          | 385 |
| 16.1.2 <i>Online qualitative assay</i>            | 385 |
| 16.2 Inhibition of LDHA activity                  | 386 |
| 16.3 Antimicrobial activity                       | 387 |
| 16.4 Antitumoral activity                         | 388 |
| 16.5 Antiinflammatory activity                    | 388 |
| 16.6 Antiangiogenic activity                      | 388 |
| <b>CONCLUSIONES</b>                               | 389 |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                 | 399 |
| <b>ABREVIATURAS</b>                               | 443 |
| <b>ANEXOS</b>                                     |     |

RESUMEN

**RESUMEN**

El estudio de la composición química de las plantas sigue despertando, a día de hoy, el interés de muchos científicos, debido a que constituyen una fuente natural de compuestos biológicamente activos interesantes para industrias como la farmacéutica, la alimentaria o la cosmética, entre otras. En los últimos años, por ejemplo, ha aumentado el interés por los conservantes alimentarios de origen natural debido a los posibles efectos adversos de los de origen sintético (artificial). Además, existe un auge al alza sobre el interés de productos naturales como remedios naturales para prevenir y tratar diferentes dolencias.

Esto justifica uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral, centrado en el estudio de restos de poda y su aprovechamiento como una interesante fuente natural de compuestos bioactivos barata y renovable, y en consonancia con un desarrollo sostenible. Para ello se han estudiado restos de poda de cerezo (*Prunus avium* L.), ciruelo europeo y japonés (*Prunus domestica* L. y *Prunus salicina* L., respectivamente), lichi (*Litchi chinensis* Sonn.) , además de un extracto comercial de arándano rojo americano (*Vaccinium macroparpon* Ait.), del que se ha obtenido una fracción rica en procianidinas diméricas tipo A.

De la parte leñosa de restos de poda de cerezo, variedad ‘Starking’, se han aislado un ácido fenólico (**3**) y trece flavonoides (**1**, **2**, **4–8**, **10**, **12**, **14–16**), algunos de ellos (**1**, **4** y **12**) descritos por primera vez en *Prunus avium* L. Además, se ha propuesto la estructura tentativa de otras tres moléculas por HPLC–DAD/ESI–MS. También se llevó a cabo la cuantificación de estos flavonoides en los extractos de acetato de etilo obtenidos de la madera de otras seis variedades, ‘Garrafal Napoleón’, ‘Picota’, ‘Burlat’, ‘Summit’, ‘Monzón’ y ‘Lapins’, incluido ‘Starking’, lo que ha permitido obtener conclusiones acerca del interés de cada variedad dependiendo del compuesto o familia de compuestos que se estén buscando. A partir de la madera de ciruelo europeo, variedad ‘De la Rosa’, se han aislado seis proantocianidinas diméricas tipo A (**21–26**), no descritas antes en este árbol, y un glucósido fenólico (**20**), así como identificado por HPLC–DAD/ESI–MS dos flavan-3-oles (**18** y **19**). Tras ello, como en el caso anterior, se ha determinado la concentración de estos compuestos en la madera

de las variedades 'Reina Claudia Verde', 'Claudia de Tolosa', 'Standley', y la propia 'De la Rosa', resultando esta última la más relevante por presentar una concentración en todos los compuestos cuantificados significativamente superior al resto. Los compuestos **18**, **19**, **21–26** también se identificaron en extractos de acetato de etilo obtenidos de madera de ciruelo europeo de las variedades 'Songold', 'Angeleno', 'Fortune', 'Red Beaut', 'Souvenir' y 'Showtime', mostrando el de esta última la concentración más elevada en todos ellos, aunque inferior a la observada en ciruelo europeo. Por otro lado, se han estudiado restos de poda de dos variedades de lichi, 'Mauritius' y 'Bengal'. El fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo de la madera de la primera variedad, por resultar más interesante, permitió el aislamiento de un flavan-3-ol (**29**), dos procianidinas diméricas tipo A (**32** y **33**) y una procianidina trimérica (**30**). La técnica HPLC–DAD/ESI–MS ha permitido identificar, además, dos procianidinas diméricas (**31** y **32**) y una tetramérica (**27**), así como seis proantocianidinas minoritarias en el extracto (**34–38** y **39**). El compuesto **30** se encontraba en una concentración de 1.45 mg/g madera seca en 'Mauritius', y 0.95 mg/g madera seca en 'Bengal', muy superior al resto de componentes. Por último, ha sido posible obtener una fracción rica en procianidinas diméricas tipo A a partir de un extracto comercial de arándano rojo americano. Esta fracción constituía el 0.53% en peso del extracto comercial.

También se ha estudiado la familia de los triterpenoides pentacíclicos en fruto, tallo, hoja y raíz de olivo (*Olea europaea* L.) de las variedades 'Picual', 'Frantoio' y 'Koroneiki', recogidas en dos meses consecutivos, e identificando los ácidos maslínico y oleanólico en fruto y hoja, además de los alcoholes eritrodiol y uvaol en esta última matriz, presentando la cantidad más elevada de todos los órganos vegetales. En tallo también se identificaron los cuatro triterpenoides identificados en hoja. La raíz presentó la concentración más baja en estos compuestos, siendo el único órgano en el que se detectó el ácido betulínico, junto con los ácidos maslínico y oleanólico.

El fraccionamiento cromatográfico, mediante las técnicas FCPC y HPLC semipreparativo, de un extracto hidroalcohólico de aceite de oliva, ha permitido

aislar los fenoles (–)-oleaceína (**48**) y (–)-oleocantal (**49**), así como las formas monoaldehídicas de los aglicones de oleuropeína (**50**) y ligustrósido (**51**). El interés por los compuestos **48** y **49** para su evaluación en un modelo de inflamación *in vivo* de Lupus eritematoso sistémico, hizo necesaria la obtención de una cantidad mayor de estos compuestos, lo que motivó la búsqueda de aceites ricos en estos fenoles, susceptibles de ser empleados como fuentes naturales. Tras analizar un considerable número de muestras de aceites no se encontró una que permitiera llevar a cabo esta tarea. Por ello se hizo necesario el desarrollo de un procedimiento semisintético de **48** y **49** a partir de (–)-oleuropeína (**52**) y (–)-ligustrósido (**53**) que permitiera obtener estos compuestos en escala multigramo. Para esta nueva tarea se analizó madera y hoja de una selección de variedades de olivo y de otras especies de la familia de las oleáceas (fresno y aligustre), encontrando que la hoja y madera de olivo podrían ser la mejor fuente de **52** y **53**, respectivamente. Tras encontrar una fuente natural de **52** y **53** se procedió a la optimización de las condiciones de reacción de **48** y **49**, empleando el único trabajo publicado previo al inicio de esta tarea. Se determinó que los mejores resultados se obtenían cuando se llevaba a cabo la síntesis en un reactor microondas, obteniendo **48** y **49** con unos rendimientos del 61% y 65%, respectivamente. La necesidad de obtener ambos compuestos en mayor cantidad hizo necesario un escalado del procedimiento, haciendo reaccionar cuatro veces más de producto de partida, lo que aumentó levemente el tiempo de reacción y disminuyó ligeramente los rendimientos obtenidos (58% y 63%, respectivamente). Siguiendo estas mismas condiciones de reacción se obtuvieron los derivados *O*-metilados de **48** y **49**, partiendo en este caso de (–)-dimetil-oleuropeína (**58**) y (–)-metil-ligustrósido (**59**), obtenidos tras la previa metilación de **52** y **53**. En este caso, los rendimientos y los tiempos de reacción se mantuvieron prácticamente sin cambios.

Por último, se ha iniciado la síntesis del compuesto 1,5 dialdehídico (**I**), análogo estructural de oleocantal/oleaceína. En primer lugar, se obtuvo el tetraéster **62** a partir de la doble adición de malonato de dietilo sobre el grupo aldehídico del 4-metoxibenzaldehído. La posterior descarboxilación de Krapcho de **62** originó el diéster **63**. La reducción de estos grupos éster, empleando DIBAL o LiAlH<sub>4</sub>, no

transcurrió con éxito, siendo necesario dedicar más tiempo a esta tarea para cumplir con este objetivo.

En el último bloque de esta Memoria se recoge la evaluación de la actividad antioxidante mediante el método del radical DPPH de los extractos de cerezo, ciruelo europeo y japonés, lichi y arándano rojo americano. El mejor valor se obtuvo para el extracto de *cranberry* seguido de los de lichi. También se determinó la actividad inhibitoria de la enzima LDHA de estos extractos junto con los compuestos aislados de madera de cerezo y ciruelo. Respecto a los extractos analizados, el mejor valor se volvió a observar para el de arándano. En cuanto a los compuestos puros, todas las proantocianidinas aisladas de ciruelo europeo presentaron mayor actividad antioxidante que el compuesto de referencia (procianidina A-2). Por otro lado, en colaboración con grupos especializados en la respectiva temática, se evaluó la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de estas moléculas, obteniendo los resultados más interesantes para el compuesto **17**, aislado de la madera de cerezo, frente a la cepa multiresistente *Enterobacter* sp. UJA37p. También se ha evaluado la actividad antitumoral de **49**, antiinflamatoria de **49**, **51** y **59**, así como antiangiogénica de **48** y **49**, mostrando todos ellos resultados prometedores.



# INTRODUCCIÓN

La Química de Productos Naturales (PNs) es una especialidad de la Química Orgánica que tiene por objetivos (a) el aislamiento y determinación estructural de los compuestos de naturaleza orgánica (más en concreto, los denominados metabolitos secundarios) presentes en plantas, animales y microorganismos, así como (b) la conversión (vía sintética) de estos productos de origen natural en otros de mayor interés en medicina, agricultura, cosmética y alimentación, entre otros campos.

Esta disciplina, junto con la Farmacognosia, ha jugado un papel muy importante en el descubrimiento de fármacos desde el origen de los mismos. El fármaco o principio activo de un medicamento es una sustancia pura de estructura conocida, extraída de fuentes naturales o sintetizada en el laboratorio, que está dotada de acción farmacológica útil en Terapéutica. En este sentido, más del 80% de los fármacos conocidos tienen un origen natural o están inspirados en un producto natural.<sup>1</sup> En los últimos años se han publicado trabajos que revelan que los PNs todavía se pueden seguir considerando una fuente inagotable de moléculas activas.<sup>2</sup> El notable desarrollo de las técnicas de extracción, de cromatografía y de elucidación estructural han potenciado el avance de este campo, con el aislamiento e identificación de (nuevos) principios activos.<sup>3-5</sup> La amplia diversidad estructural química de los PNs y las numerosas actividades biológicas descritas son dos de los valores más preciados de estos compuestos.<sup>2,6</sup> Las actividades antioxidante, antimicrobiana o antiinflamatoria, entre otras muchas, que presentan algunos PNs, los convierten en buenos candidatos sobre los que explorar interesantes aplicaciones en campos diversos como los citados anteriormente.<sup>7-10</sup>

Los PNs bioactivos de origen vegetal se han aislado desde siempre de cualquier órgano de las plantas silvestres o cultivadas: raíces, hojas, semillas, frutos.<sup>11,12</sup> Sin embargo, otra materia prima de interés creciente para obtener PNs bioactivos son los residuos o subproductos agroindustriales.<sup>13-16</sup> El bajo o nulo coste de este material vegetal supone un interés añadido para la iniciativa empresarial, y por ello es también considerable el esfuerzo que viene realizándose en la búsqueda de compuestos bioactivos en materiales de desecho.<sup>17</sup> Además de los subproductos generados en el procesamiento de alimentos, también son de interés los residuos generados en el cultivo de plantas y árboles, como es el caso de la biomasa que se genera en la poda de los árboles

frutales. Este material de poda constituye una fuente natural abundante, renovable y barata, cuyo aprovechamiento es respetuoso con el medio ambiente. Además, una hipotética revalorización de estos residuos podría llegar a traducirse en un incentivo económico para el agricultor.

El Grupo de Investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral (FQM-182) lleva dos décadas trabajando en esa línea de investigación de aislamiento, caracterización estructural y evaluación biológica de productos naturales aislados de madera procedente de residuos de poda, principalmente de olivo (*Olea europaea* L.)<sup>18-26</sup> y laurel (*Laurus nobilis* L.).<sup>27-33</sup>

De acuerdo con esta experiencia, en la primera parte de esta Tesis se aborda el estudio de la composición química de las maderas de cerezo (*Prunus avium* L.), de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), de ciruelo japonés (*Prunus salicina* L.) y de lichi (*Litchi chinensis* Sonn.). La selección de este material se ha hecho teniendo en cuenta los principales tipos de compuestos bioactivos descritos en los frutos de dichos cultivos, como son flavonoides y proantocianidinas.<sup>34,35</sup> Estas familias de compuestos también se han identificado en un extracto comercial de arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon* Ait.).<sup>36</sup> Además de las técnicas usuales de fraccionamiento y purificación de PNs, tales como la cromatografía en columna sobre gel de sílice y la cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa, se han empleado técnicas menos habituales, como la cromatografía en contracorriente.<sup>37,38</sup>

Los compuestos así aislados e identificados se han evaluado por su potencial actividad antimicrobiana, antibiopelícula, antioxidante y como inhibidores de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA). Para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula se ha contado con la colaboración del grupo de investigación de los Drs. D. Antonio Gálvez y Dña. Elena Ortega (AGR-230), del Área de Microbiología de la Universidad de Jaén. Las actividades antioxidante e inhibidora de LDHA se han evaluado en nuestro mismo grupo de investigación (FQM-182). La actividad antioxidante se ha determinado mediante el método de evaluación de la capacidad de captura del radical modelo DPPH (radical 2,2-difenil-picrilhidrazilo), por ser éste un método sencillo y muy utilizado por la comunidad científica, lo que resulta de interés a efectos comparativos. Por su parte, la evaluación de la capacidad que pueden presentar los extractos obtenidos y

compuestos aislados como inhibidores de la enzima recombinante humana LDHA se ha llevado a cabo comparando, mediante medidas espectrofotométricas, la actividad de la enzima en ausencia y en presencia de los potenciales inhibidores. Este trabajo forma parte de la investigación llevada a cabo dentro del proyecto que consiguió en 2019 el grupo FQM-182, titulado “Development of LDHA inhibitors as a new strategy for the treatment of primary hyperoxaluria” y financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (RTI2018-098560-B-C22).

La segunda parte de esta Tesis se ocupada de la identificación y cuantificación de triterpenoides pentacíclicos en diferentes órganos vegetales del olivo (*Olea europaea* L.), tales como hoja, tallo, fruto y raíz, de las variedades ‘Picual’, ‘Frantoio’ y ‘Koroneiki’. Los triterpenoides pentacíclicos, como los ácidos maslínico y oleanólico, presentan numerosas actividades biológicas, como cardioprotectoras, anticancerígenas o antidiabetes, entre otras muchas, lo que ha despertado gran interés entre la comunidad científica en los últimos años.<sup>39,40</sup> Este trabajo forma parte de la investigación llevada a cabo dentro del proyecto “Análisis del patrón de expresión de triterpenos pentacíclicos presentes en el olivo y caracterización de su actividad biológica”, financiado por la Universidad de Jaén (UJA2014/07/13), y del que fue investigador principal el Dr. D. Juan Peragón, del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Jaén.

En la tercera parte de esta Tesis se han optimizado los métodos cromatográficos que permitieron el aislamiento eficaz de fenoles bioactivos presentes en el aceite de oliva, como oleocantal y oleaceína, y los aglicones de ligustrósido y oleuropeína, así como la síntesis química de derivados y de análogos estructurales. Este trabajo se inició a partir de un acuerdo de colaboración con los Drs. D. Francisco Espínola y D. Manuel Moya, del Área de Ingeniería Química de la Universidad de Jaén, dirigido a aislar oleocantal y oleaceína, de calidad “patrón”, a partir de aceite de oliva, y continuó desarrollándose tras la concesión del proyecto “Secoiridoides del olivo como nuevos nutraceuticos moduladores epigeneticos de la respuesta inmunoinflamatoria”, financiado por el Ministerio de Ministerio de Economía, Industria y Competitividad en 2018 (AGL2017-89342-P). La investigadora principal de este proyecto fue la Dra. Dña. Catalina Alarcón de la Lastra, del Área de Farmacología de la Universidad de Sevilla, y en dicho proyecto han participado el Dr. Altarejos, co-director de esta Tesis, como

miembro del equipo de investigación, y el autor de esta Tesis, como personal contratado con cargo a dicho proyecto. El grupo de la Dra. Alarcón (CTS-259) se ha ocupado de evaluar las actividades farmacológicas *in vitro* de los fenoles del aceite de oliva y sus derivados semisintéticos, así como de los ensayos *in vivo*, que actualmente se están desarrollando. Para ello fue necesario poner a punto un procedimiento que permitiera obtener oleaceína y oleocantal a nivel multigramo y abordar además la semisíntesis de algunos derivados con actividades biológicas potencialmente mejoradas. Este objetivo sintético se abordó a partir de oleuropeína y ligustrósido, secoiridoides aislados de la madera del olivo.

Dada la relevancia e interés científico actual de los fenoles oleocantal y oleaceína, se planteó a continuación en esta Tesis la síntesis de análogos estructurales simplificados de estos compuestos, manteniendo la subestructura 1,5-dialdehídica, con la finalidad última de obtener una batería de compuestos sobre los que continuar realizando estudios de actividad biológica.

Actualmente, se mantienen también otras colaboraciones para ensayar la actividad antitumoral y antiangiogénica de oleocantal y oleaceína, con los Drs. D. Ginés M. Salido y D. Juan A. Rosado, del Área de Fisiología de la Universidad de Extremadura; el Dr. D. Ignacio J. Molina, del Área de Inmunología de la Universidad de Granada; y el Dr. D. Miguel A. Medina, del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Málaga.

Por último, indicar que, como complemento al trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral, se había planificado una estancia de tres meses en la Universidad Tecnológica de Kaunas (Lituania), bajo la supervisión de los Drs. Dña. Milda Pulkaskienė y D. Audrius Pukalskas, para llevar a cabo extracciones de residuos agrícolas, por métodos alternativos a los utilizados en esta Tesis, así como aislamiento y caracterización de componentes bioactivos. Sin embargo, esta estancia no se ha podido realizar debido a la situación socio-sanitaria provocada por la pandemia COVID-19.

OBJETIVOS

El objetivo general de la investigación contenida en esta Memoria de Tesis Doctoral es obtener compuestos bioactivos, tanto naturales como sintéticos, que pudieran ser de interés en los ámbitos farmacéutico y alimentario, entre otros.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Encontrar fuentes naturales de compuestos biológicamente activos que pudieran presentar cierto interés desde un punto de vista científico y también empresarial.
2. Probar la eficacia de la cromatografía en contracorriente en los protocolos de recuperación de fenoles a partir de madera de poda de frutales como cerezo, ciruelo y lichi.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana, antibiopelícula, antioxidante y de inhibición de la enzima lactato deshidrogenasa A de los compuestos aislados.
4. Cuantificar triterpenoides pentacíclicos en extractos obtenidos a partir de hoja, tallo, fruto y raíz de olivo de las variedades 'Picual', 'Frantoio' y 'Koroneiki'.
5. Encontrar aceites de oliva ricos en fenoles a partir de los cuales proceder al aislamiento de oleocantal y oleaceína, entre otros, para evaluar posteriormente su funcionalidad en la modulación de la respuesta inmunoinflamatoria.
6. Desarrollar un procedimiento sintético ecosostenible que permita obtener oleocantal y oleaceína, así como sus derivados *O*-metilados, a escala multigramo, para evaluar posteriormente *in vivo* la implicación del epigenoma en sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras.
7. Poner en marcha la síntesis de análogos estructurales simplificados de oleocantal y oleaceína, con la finalidad última de encontrar un "cabeza de serie" que sirva para desarrollar moléculas mejoradas desde un punto de vista biológico.

La parte química de esta Tesis, así como las actividades antioxidantes e inhibidoras de la enzima LDHA, se han realizado exclusivamente en los laboratorios de Química

Orgánica del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad de Jaén, mientras que el resto de actividades biológicas y farmacológicas se han llevado a cabo, o se están llevando a cabo aún, por personal de los grupos de investigación con los que hemos colaborado y que se citan en el apartado de Introducción de esta Memoria.



# ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En la presente Tesis Doctoral se ha trabajado con seis fuentes vegetales, cinco de ellas son importantes materiales de partida para la obtención de flavonoides y proantocianidinas (*Prunus avium* L., *Prunus domestica* L., *Prunus salicina* L., *Litchi chinensis* Sonn. y *Vaccinium macrocarpon* Ait.), y una sexta fuente de secoiridoides y de triterpenoides pentacíclicos (*Olea europaea* L.). Así, en este apartado de antecedentes, bajo los epígrafes de “Flavonoides y proantocianidinas” (apartado 1), “Secoiridoides y compuestos relacionados” (apartado 2) y “Triterpenoides pentacíclicos” (apartado 3) se describen los principales rasgos estructurales de cada tipo de compuestos, se recogen algunas de las actividades biológicas más interesantes y se listan las fuentes vegetales ricas en este tipo de compuestos, recogidas en bibliografía. Las fuentes vegetales que se han seleccionado para su estudio se revisan más detalladamente, y después de una descriptiva general de la planta, de su cultivo y variedades, y de sus aplicaciones y actividades biológicas más destacadas, se recoge la composición química descrita hasta el momento, distinguiendo entre composición de compuestos volátiles y no volátiles.

## 1. FLAVONOIDES Y PROANTOCIANIDINAS

### 1.1. Rasgos estructurales

Los compuestos con esqueleto de flavonoide representan más de la mitad de los compuestos fenólicos presentes en plantas. Estos compuestos de bajo peso molecular, poseen estructura de 2-fenilbenzopirano ( $C_6-C_3-C_6$ ) con hidroxilos en los anillos A y B y diferentes estados de oxidación en el anillo C (**Figura 1.1**).

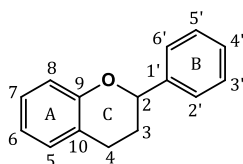


**Figura 1.1.** Esqueleto de flavonoide.

La clasificación más usual de los flavonoides se basa en el estado de oxidación del anillo C, dando origen a las diferentes subfamilias: flavona, flavanona, isoflavona, flavonol, flavan-3-ol y antocianidina (**Figura 1.2**).

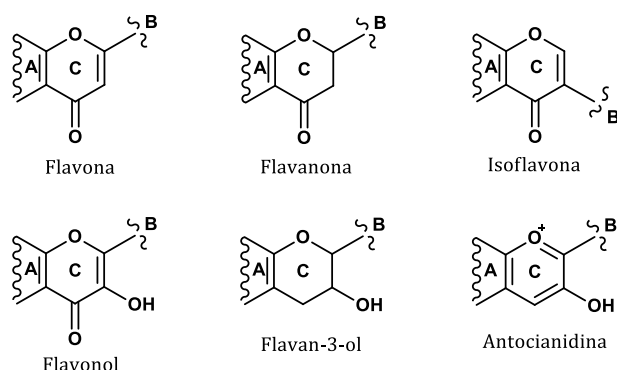


**Figura 1.2.** Subfamilias de flavonoides, según el estado de oxidación del anillo C.

Las proantocianidinas (PACs) o taninos condensados son dímeros, trímeros u oligómeros de flavan-3-oles unidos por enlaces interflavonoide *C-C* y *C-O-C* (**Figura 1.3**). Las denominadas proantocianidinas tipo A presentan ambos tipos de enlaces, en posiciones C4-C8 o C4-C6 y en C2-O-C7 o C2-O-C5, mientras que las proantocianidinas tipo B presentan sólo la unión *C-C* en posiciones C4-C8 o C4-C6.<sup>41</sup> Por otro lado, las proantocianidinas se pueden clasificar también de acuerdo al flavan-3-ol que las constituye. Así, las procianidinas contienen únicamente unidades de catequina y epicatequina, las propelargonidinas presentan en su estructura, al menos, una unidad de afzelequina o epiafzelequina, y las prodelfinidinas contienen, al menos, una unidad de galocatequina o epigalocatequina.

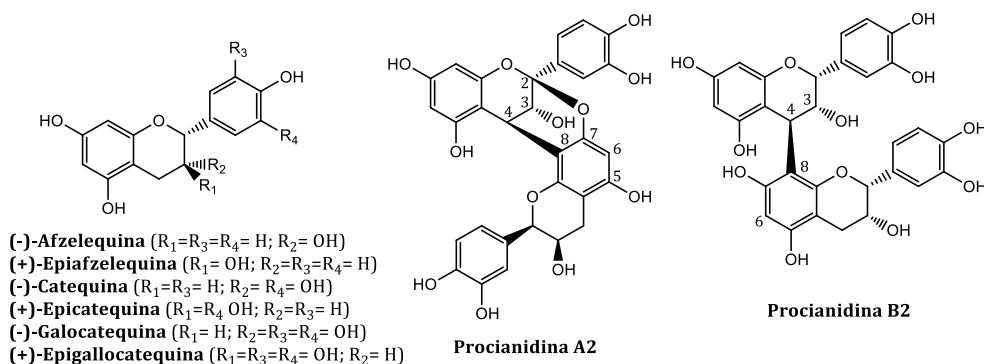


**Figura 1.3.** Estructura de flavan-3-oles y proantocianidinas tipo A y B.

## 1.2. Actividades biológicas

Los beneficios para la salud humana de los flavonoides se han recopilado en numerosos artículos de revisión.<sup>42-44</sup> El interés por estos productos naturales es consecuencia del amplio espectro de actividades biológicas que presentan, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, moduladoras de las actividades enzimáticas y anticancerígenas,<sup>45</sup> antibacterianas,<sup>46</sup> así como, antialérgicas.<sup>47</sup> Su capacidad para bloquear el ciclo celular produciendo apoptosis en las células cancerígenas,<sup>48</sup> y para destruir el huso mitótico<sup>49</sup> o inhibir la angiogénesis,<sup>50</sup> han despertado gran interés entre la comunidad científica, que estudia su uso como posibles agentes anticancerígenos.<sup>51</sup> En este sentido, se ha descrito que podrían ser potenciales agentes antiproliferativos de tumores debido a la actividad antioxidante que presentan, capaz de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que favorecen la formación de tumores.<sup>42</sup>

Las PACs también presentan numerosos efectos beneficiosos sobre la salud humana, como consecuencia de sus acciones positivas sobre las enfermedades cardiovasculares, desórdenes metabólicos o cáncer.<sup>52</sup> En otros trabajos de investigación se ha demostrado que las PACs ayudan a proteger al organismo del daño producido por el sol, mejoran la visión o la flexibilidad de las articulaciones así como la circulación sanguínea.<sup>53</sup> Por otro lado, las PACs oligoméricas complejas, además, presentan

actividad antiviral y antibacteriana, y pueden inhibir la peroxidación lipídica, la agregación plaquetaria o la hiperpermeabilidad capilar.<sup>54</sup>

### **1.3. Fuentes naturales de flavonoides y proantocianidinas**

Los flavonoides están presentes en la mayoría de las fruta y verduras destinadas al consumo humano,<sup>55</sup> así como en las bebidas (cerveza o vino) obtenidas por fermentación de cereal o fruta, respectivamente.<sup>56,57</sup> También se han descrito compuestos de esta familia en plantas aromáticas de interés culinario, como orégano, tomillo o romero, o para preparar infusiones, como menta y eucalipto, o en té, entre otras.<sup>58-60</sup>

En cuanto a las PACs, éstas están presentes en numerosas frutas, como manzanas, granadas, lichis, cerezas o ciruelas, entre otras;<sup>61</sup> en bayas como la zarzamora o diferentes tipos de arándano;<sup>62</sup> en piel de cacahuete y semilla de uva,<sup>41</sup> en frutos secos, legumbres y cereales,<sup>63</sup> etc.

Por último, resultan de gran interés los trabajos en los que se identifican compuestos polifenólicos de estas dos familias en residuos y subproductos vegetales provenientes de las industrias de procesamiento de frutas y verduras,<sup>64-66</sup> o de las actividades agrícolas.<sup>67,68</sup>

A continuación, se describe más en profundidad las plantas objeto de estudio de esta Tesis, como fuentes de flavonoides y proantocianidinas.

#### ***1.3.1. Cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo***

##### **Descriptiva general**

La familia Rosaceae (rosáceas) es muy variada y comprende 85 géneros y cerca de 3.000 especies. Un gran número de estas especies se cultivan por su interés como frutales de hueso (ciruelo, melocotonero o cerezo), y otras por su valor ornamental, como las rosas. Todas ellas se pueden encontrar en diferentes zonas de Europa.<sup>69</sup>

El género *Prunus* engloba 430 especies, entre las que se encuentran el cerezo (*Prunus avium* L.), el ciruelo japonés (*Prunus salicina* L.) y el ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) (**Tabla 1.1**).<sup>70</sup>

**Tabla 1.1.** Clasificación botánica de las especies *Prunus avium* L., *Prunus domestica* L. y *Prunus salicina* L.

| Orden          | Familia         | Género        | Especie          |
|----------------|-----------------|---------------|------------------|
| <u>Rosales</u> | Cannabaceae     | Agrimonia     | armeniaca        |
|                | Celtidaceae     | Alchemilla    | <u>avium</u>     |
|                | Eleagnaceae     | Crataegus     | cerasifera       |
|                | Moraceae        | Cydonia       | <u>domestica</u> |
|                | Rhamnaceae      | Malus         | dulcis           |
|                | <u>Rosaceae</u> | Potentilla    | mahaleb          |
|                | Ulmaceae        | <u>Prunus</u> | persica          |
|                | Urticaceae      | Pyracantha    | <u>salicina</u>  |
|                |                 | Rubus         | spirrosa         |
|                |                 | Sorbus        |                  |
|                |                 | Spiraea       |                  |

### **Cerezo**

El cerezo (*P. avium* L.) es un árbol caducifolio de hasta 30 metros de altura con tronco grueso, de corteza grisácea, casi lisa, que se ennegrece con el tiempo. Sus ramas son glabras, lisas y de color pardo. Sus hojas con unas dimensiones de 6–15 x 3–8 cm, pueden ser obovadas, lanceoladas o elípticas, acuminadas, crenadas o aserradas con dientes glandulíferos. Presentan haz verde mate y envés pubescente y, por lo general, dos glándulas rojizas cerca del punto de unión con la lámina. Las flores se presentan en fascículos umbeliformes rodeados en la base por una corona de brácteas con pétalos de 8-17 mm de color blanco. El fruto es una drupa de entre 9-20 mm de diámetro, de aspecto globoso o cordiforme y puede ser desde amarillo crema hasta casi negro, y dependiendo de la variedad presenta un endocarpo subgloboso, casi liso.<sup>71</sup>

Concretamente, la especie *P. avium* L. produce fruta dulce, aunque existe otra, *Prunus cerasus* L., cuyos frutos presentan una cierta acidez (**Imagen 1.1**).<sup>72</sup>



**Imagen 1.1.** *Prunus avium* L.

### **Ciruelo japonés**

El ciruelo japonés (*P. salicina* L.) es un árbol caducifolio que puede alcanzar una altura de 5–6 metros en algunos casos, y en otros, tiene un porte arbustivo. De su tronco, con corteza verde-azulada, brillante, lisa o agrietada a lo largo, crecen ramas centrales que se dirigen hacia arriba, dividiéndose a su vez en otras más pequeñas alternas, derechas y ramosas, delgadas, unas veces lisas, glabras y otras pubescentes y vellosas. Su madera es rojiza y flexible. Las hojas son de color verde, oblongas, aserradas, lisas en el haz y pubescentes en el envés. Presenta flores blancas en pequeños ramos cortos de un año de edad y son autofértiles. Su fruto es una drupa más o menos redonda, recubierta por una capa de cera blanca y puede ser roja, amarilla o verde, y de sabor dulce o amargo (**Imagen 1.2**).<sup>73</sup>



**Imagen 1.2.** *Prunus salicina* L.

### ***Ciruelo europeo***

El ciruelo europeo (*P. domestica* L.) es un arbusto o árbol caducifolio de hasta 10 metros de altura. Presenta ramas rectas y sin espinas, aunque a veces sí se observan en especies silvestres. La corteza del tronco es de color marrón pálido del que crecen pequeñas ramas, normalmente, pubescentes. Sus hojas tienen unas dimensiones de 3–8 x 1.8–5 cm, obovadas o elípticas, aserradas, glabras y de color verde pálido. Las flores se organizan en racimos de dos o tres unidades, con pétalos blancos de 7–12 mm. El tamaño de su fruto está comprendido entre 20–75 mm y puede ser ligeramente rugoso o punteado, de color morado, rojo, amarillo o verde y de sabor dulce o ácido y no astringente y con forma de drupa (**Imagen 1.3**).<sup>69,74,75</sup>





**Imagen 1.3.** *Prunus domestica* L.

## **Cultivo y variedades**

### ***Cerezo***

Su cultivo se localiza en zonas frescas y con suelos profundos, principalmente, en zonas montañosas, aunque también podemos encontrarlos en vegas, huertos y regadíos.<sup>75</sup> El 45% de la producción mundial se centra en Europa, el continente con la mayor producción del mundo. España está situada en la quinta posición en el ranking europeo por detrás de Italia.<sup>76</sup> En España el cultivo del cerezo ocupa una superficie de 33.325 ha, el 65% de secano y el resto de regadío. La comunidad con mayor extensión es Aragón (12.806 ha), seguida de Extremadura (9.903 ha) y Cataluña (2.839 ha). En Andalucía, ocupa un total de 1.749 ha, centrándose principalmente en Jaén (725 ha) y Granada (978 ha).<sup>77</sup> Existen numerosas variedades como ‘Bing’, ‘Burlat’, ‘Lapins’ o ‘Stark Hardy Giant’, entre otras.

### ***Ciruelo***

En nuestro país, el ciruelo europeo se localiza en zonas frías o de alta montaña. Sin embargo, el ciruelo japonés se cultiva en zonas templadas como vegas situadas en el curso bajo de los ríos. Asia es el principal continente productor de esta fruta, seguido de Europa.<sup>76</sup> En España, se dedican un total de 12.597 ha a este cultivo en los que se recogen más de 200.000 toneladas anuales de fruta, que coloca a nuestro país entre los mayores productores mundiales. Es importante indicar que los datos encontrados corresponden a la producción conjunta de ciruela europea y japonesa y no ha sido posible diferenciar entre ambas especies. Si desglosamos estos datos por Comunidades Autónomas, en primer lugar se sitúa Extremadura (4.210 ha), seguida de Aragón (1.909 ha) y Comunidad Valenciana (1.409 ha).<sup>77</sup> En Andalucía, se destinan al cultivo de esta fruta un total de 1.277 ha. En Jaén, 563 ha están ocupadas por este frutal, por detrás de Sevilla (572 ha) y Huelva (858 ha).<sup>77</sup> Algunas de las variedades cultivadas de ciruelo japonés son 'Red Beaut', 'Gaia', 'Golden Japan' o las pertenecientes a la serie 'Black' estadounidense. 'Reina Claudia Verde', 'President', 'Standley' o 'Claudia de Tolosa' son variedades comunes de ciruelo europeo.

### **Aplicaciones y actividad biológica**

### ***Cerezo***

El cerezo se cultiva por el interés que presenta su fruta, la cereza. Se trata de una fruta con bajo contenido calórico y rica en nutrientes y compuestos bioactivos, como fibra, polifenoles, carotenoides, vitamina C y potasio.<sup>78</sup> La mayor parte de la producción se consume en fresco aunque también se preparan mermeladas o jaleas, zumos, pasas o en conserva, así como, bebidas alcohólicas tras un proceso de fermentación. Sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios han demostrado tener efectos beneficiosos para luchar contra enfermedades cardiovasculares o degenerativas, entre otras,<sup>72,79</sup> o algunos casos de cáncer<sup>80</sup>. Otros autores han revelado que su consumo puede ser beneficioso para combatir el insomnio,<sup>81</sup> reducir el estrés y mejorar el estado de ánimo<sup>82</sup>. Tradicionalmente, a partir de los rabillos se han preparado tisanas con propiedades diuréticas.<sup>83</sup>

La madera es muy empleada en ebanistería para la fabricación de mobiliario y revestimientos,<sup>83</sup> así como en la elaboración de toneles para el envejecimiento de bebidas alcohólicas<sup>84,85</sup>.

### ***Ciruelo***

El ciruelo también es muy interesante por su fruta. Como ocurre con las cerezas, las ciruelas se pueden consumir en fresco o preparar con ellas mermeladas, jaleas o ciruelas pasas, además de licores.<sup>75</sup> Las ciruelas son antioxidantes<sup>86</sup> y su consumo se ha relacionado con la mejora de la función cognitiva y la salud de los huesos, así como con una reducción de los riesgos cardiovasculares en las personas.<sup>87,88</sup> Ciruelas frescas y secas se han ensayado en la conservación de productos cárnicos.<sup>89</sup> De su semilla se obtiene un aceite con actividad insecticida, antifúngica y antioxidante y que puede ser usado como sustituto del aceite de almendra.<sup>90</sup>

La madera compacta y de corazón rojizo, como ocurría con el cerezo, es empleada por ebanistas y torneros. Con el duramen se fabrican armarios, incrustaciones y torneados.<sup>70</sup>

### **Composición química**

La madera de cerezo ha sido ampliamente estudiada en numerosas ocasiones, posiblemente debido a su empleo en la fabricación de toneles para el envejecimiento de bebidas alcohólicas. También se han encontrado artículos sobre la composición de fruto y la capa cerosa que lo envuelve, hoja y raíz. En el caso del ciruelo europeo, existen un gran número de trabajos de investigación cuyo objeto de estudio es el fruto. Sin embargo, el número de publicaciones referentes a la composición de la madera es bastante inferior. También se ha estudiado la hoja y raíz. En cuanto al ciruelo japonés, la bibliografía encontrada es escasa y solo se ha estudiado la composición química del fruto.

A continuación, se recopila información sobre la composición química de las tres especies de *Prunus*, cuyas maderas son objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. La

presentación de esta información se hará de forma conjunta para las tres especies, detallando más la composición en compuestos no volátiles que en volátiles.

### ***Fracción volátil***

La composición volátil, tanto de cereza<sup>91-95</sup> como de ciruela,<sup>96-101</sup> ha sido estudiada en numerosas ocasiones. También se encuentran estudios sobre los volátiles de las flores de cerezo<sup>102,103</sup> y ciruelo europeo,<sup>103</sup> así como, del aceite obtenido a partir del prensado de la semilla de ciruela europea.<sup>104</sup> Además se ha analizado el aceite esencial obtenido a partir de las hojas de ciruelo europeo.<sup>105</sup>

En cuanto a la madera, solo se han encontrado estudios analizando este tipo de compuestos en cerezo.<sup>106-109</sup>

### ***Fracción no volátil***

Se han identificado compuestos de diferentes familias, como compuestos fenólicos, esteroides, triterpenoides pentacíclicos, carotenoides y cumarinas.

#### **➤ Compuestos fenólicos**

Se han descrito diferentes compuestos fenólicos en las especies objeto de estudio, como ácidos fenólicos, fenilpropanoides, cumarinas y flavonoides.

### ***Flavonoides***

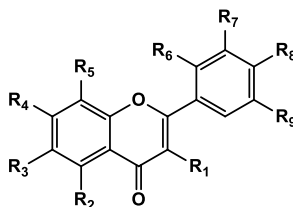
A continuación se indica la bibliografía existente sobre compuestos fenólicos de la familia de los flavonoides identificados en diferentes partes de las tres especies objeto de estudio. La información encontrada se organiza en tablas para facilitar su localización, indicando con un superíndice sobre el nombre de la especie la parte en la que se ha identificado (f: fruto; p: pedúnculo; t: tallo; b: brote; m: madera; ca: callo; ct: corteza; h: hoja).

## Flavonas (Tabla 1.2)

Tabla 1.2. Flavonas identificadas en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto                                        | Especie                                 | Referencia  |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|
| Apigenina                                        | <i>Prunus avium</i> L. <sup>p,m</sup>   | 85,110      |
| Crisina-7- <i>O</i> -glucósido                   | <i>Prunus avium</i> L. <sup>p, m</sup>  | 111,112     |
| Crisina                                          | <i>Prunus avium</i> L. <sup>p, m</sup>  | 111,113–116 |
|                                                  | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 117         |
| 5,4'-Dihydroxiflavanona-7- <i>O</i> -β-glucósido | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>t</sup> | 90          |
| Galangina                                        | <i>Prunus avium</i> L. <sup>p</sup>     | 118         |
| Jaceidina                                        | <i>Prunus avium</i> L. <sup>ct</sup>    | 119         |
| Prudomestísido A                                 | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>t</sup> | 90          |
| Prudomestísido B                                 | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>t</sup> | 90          |
| Tectocrisina                                     | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 113         |

p: pedúnculo; m: madera; t: tallo; ct: corteza.

**Apigenina** ( $R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=R_9=H$ ;  $R_2=R_4=R_8=OH$ )**Crisina-7-*O*-glc** ( $R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=R_8=R_9=H$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_4=O-\alpha\text{-Glc}$ )**Crisina** ( $R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=R_8=R_9=H$ ;  $R_2=R_4=OH$ )**5,4'-Dihydroxiflavona-7-*O*-β-D-glc** ( $R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=R_9=H$ ;  $R_2=R_8=OH$ ;  $R_4=O-\beta\text{-D-Glc}$ )**Galangina** ( $R_1=R_2=R_4=OH$ ;  $R_3=R_5=R_6=R_7=R_8=R_9=H$ )**Jaceidina** ( $R_1=R_3=R_7=OCH_3$ ;  $R_2=R_4=R_8=OH$ ;  $R_5=R_6=R_9=H$ )**Prudomestísido A** ( $R_1=R_5=R_6=H$ ;  $R_2=R_4=OCH_3$ ;  $R_7=R_9=OH$ ;  $R_8=O-\beta\text{-D-Glc}$ ;  $R_3=\text{acrilato de etilo}$ )**Prudomestísido B** ( $R_1=R_5=R_6=H$ ;  $R_4=R_7=R_9=OCH_3$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_8=O-\beta\text{-D-Glc}$ ;  $R_3=4\text{-metoxibenzoato}$ )**Tectocrisina** ( $R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=R_8=R_9=H$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_4=OCH_3$ )

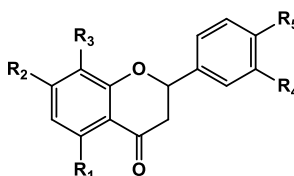
## Flavanonas (Tabla 1.3)

Tabla 1.3. Flavanonas identificadas en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto           | Especie                             | Referencia |
|---------------------|-------------------------------------|------------|
| Dihidrotectocrisina | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup> | 115        |

|                               |                                         |                     |
|-------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
| Dihidrowogonina               | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 113,115,116,119-122 |
| Dihidrowogonina-7-O-glucósido | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m, ca</sup> | 123,124             |
| Eriodictiol                   | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 111,125             |
|                               | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 126                 |
| Eriodictiol-7-O-glucósido     | <i>Prunus avium</i> L. <sup>ca</sup>    | 123                 |
| Hesperitina                   | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 85,125              |
|                               | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 126                 |
| Isosakuranetina               | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 85                  |
|                               | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 117,127             |
| Naringenina                   | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m, ct</sup> | 111,113,125,128     |
|                               | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 117,127             |
| Pinostrobina                  | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 113                 |
| Pinocembrina                  | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 85,113,115,125      |
|                               | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 127                 |
| Prunina                       | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m, ca</sup> | 111,123             |
| Salipurpósido                 | <i>Prunus avium</i> L. <sup>p</sup>     | 118                 |
| Sakuranetina                  | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 113,115,125         |

f: fruto; p: pedúnculo; m: madera; ca: callo; ct: corteza.



**Dihidrotectocrisina** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H)

**Dihidrowogonina** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H)

**Dihidrowogonina-7-O-α-D-glc** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= O-α-D-glc; R<sub>3</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>= H)

**Eriodictiol** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>= OH)

**Eriodictiol-7-O-α-D-glc** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= O-α-D-glc; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>= OH)

**Hesperitina** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>= OH; R<sub>5</sub>= OCH<sub>3</sub>)

**Isosakuranetina** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= H; R<sub>5</sub>= OCH<sub>3</sub>)

**Naringenina** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= H; R<sub>5</sub>=OH)

**Pinostrobina** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>= H)

**Pinocembrina** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>= H)

**Prunina** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= O-α-D-glc; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= H; R<sub>5</sub>=OH)

**Salipurpósido** (R<sub>1</sub>= O-β-D-glc; R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= H; R<sub>5</sub>=OH)

**Sakuranetina** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= H; R<sub>5</sub>=OH)

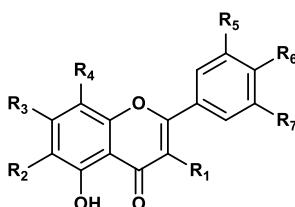
## Flavonoles (Tabla 1.4)

**Tabla 1.4.** Flavonoles identificados en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto                                                       | Especie                                 | Referencia     |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------|
| Astragalina                                                     | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 129            |
| Avicularina                                                     | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 129,130        |
| Canférido                                                       | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 85             |
|                                                                 | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 131,132        |
| Canferol                                                        | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 85,121,125     |
|                                                                 | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 131,132        |
|                                                                 | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 126            |
| Canferol-3-( $\alpha$ -L-arabinosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnósido) | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 129            |
| Canferol-3,4'-diglucósido                                       | <i>Prunus avium</i> L. <sup>h</sup>     | 133            |
| Canferol-7-O- $\beta$ -D-glucósido                              | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 129            |
| Canferol-3,7- $\alpha$ -L-diramnósido                           | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 129            |
| Canferol-3-O-rutinosil-1,4'-di-O-glucósido                      | <i>Prunus avium</i> L. <sup>h</sup>     | 134            |
| Hiperósido                                                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 129            |
|                                                                 | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 129,135        |
| Isoquercetina                                                   | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 129,135        |
|                                                                 | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 135            |
| Isoquercitrina                                                  | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 136            |
|                                                                 | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 137            |
| Miricetina                                                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 135            |
|                                                                 | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 126            |
| 6-Metoxicanferol                                                | <i>Prunus avium</i> L. <sup>h, m</sup>  | 119,138        |
| Nicotiflorina                                                   | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 129            |
|                                                                 | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 129            |
| Prudomestina                                                    | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 127            |
|                                                                 | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 85,115,121,125 |
| Quercetina                                                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup> | 117            |
|                                                                 | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 126,130,135    |
| Quercetina-7-O- $\alpha$ -D-ramnósido                           | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 129,137        |

|                                      |                                            |                 |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|
| Quercetina-3- <i>O</i> -β-D-xilósido | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>     | 129             |
| Quercitrina                          | <i>Prunus avium</i> L. <sup>h</sup>        | 139             |
|                                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f, h</sup> | 129,139         |
|                                      | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>     | 129,130,135,137 |
| Rutina                               | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>        | 140             |
|                                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup>    | 86,129,135,136  |
|                                      | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>     | 129             |
| Trifolina                            | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup>    | 129             |

f: fruto; m: madera; h: hoja.



**Astragalina** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-glc; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Avicularina** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-ara; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Canférido** (R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>= OH; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>6</sub>= OCH<sub>3</sub>)

**Canferol** (R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>= OH; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>6</sub>= OH)

**Canferol-3-(α-L-arabinosil-7-*O*-α-L-ramnósido)** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-ara; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>= *O*-α-D-ram; R<sub>6</sub>= OH)

**Canferol-3,4'-diglucósido** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-glc; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>= OH; R<sub>6</sub>= *O*-α-D-glc)

**Canferol-7-*O*-β-D-glucósido** (R<sub>1</sub>=R<sub>6</sub>= OH; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>= *O*-α-D-glc)

**Canferol-3,7-α-L-diramnósido** (R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>= *O*-α-D-ram; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>6</sub>=OH)

**Canferol-3-*O*-rutinosil-1,4'-di-*O*-glucósido** (R<sub>1</sub>= *O*-rut; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>= OH; R<sub>6</sub>= *O*-α-D-glc)

**Hiperósido** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-glc; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Isoquercetina** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-glc; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>=H; R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Miricetina** (R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>= H; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>= OH)

**6-Metoxicanferol** (R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Nicotiflorina** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-ram; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Prudomestina** (R<sub>1</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>=OH; R<sub>4</sub>=R<sub>6</sub>= OCH<sub>3</sub>)

**Quercetina** (R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H; R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>= H)

**Quercetina-7-*O*-α-D-ramnósido** (R<sub>1</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>= OH; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>= *O*-α-D-ram)

**Quercetina-3-*O*-β-D-xilósido** (R<sub>1</sub> = *O*-β-D-xil; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Quercitrina** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-ram; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>= OH)

**Rutina** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-ram; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

**Trifolina** (R<sub>1</sub> = *O*-α-D-gal; R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>= H; R<sub>3</sub>=R<sub>6</sub>= OH)

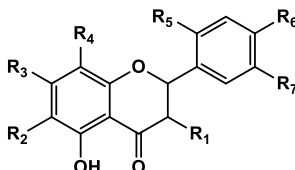
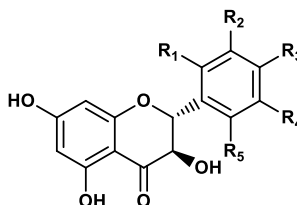


## Dihidroflavonoles (Tabla 1.5)

Tabla 1.5. Dihidroflavonoles identificados en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto                               | Especie                                    | Referencia      |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|
| Aromadendrina                           | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>        | 111,120,141,142 |
|                                         | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup>    | 127,132         |
| Aromadendrina-7- <i>O</i> -metiléter    | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>        | 113,114         |
| Dihidrocanférido                        | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup>    | 127,131,132     |
| Dihidromorina                           | <i>Prunus avium</i> L. <sup>p, m</sup>     | 116,118         |
| Taxifolina                              | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>        | 85,111,142      |
| Tetrahidroxiflavanonol                  | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>        | 85              |
| 5,2'-Dihidroxi-7,5'-dimetoxiflavanona   | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>t, m</sup> | 90              |
| 3,5,7-Trihidroxi-6,4'-dimetoxiflavanona | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup>    | 127             |
| 5,7,4'-Trihidroxi-3-metoxiflavanona     | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>m</sup>    | 127             |

m: madera; t: tallo.

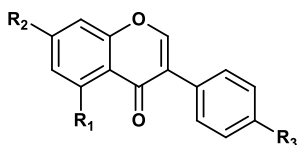
Aromadendrina ( $R_1=R_3=R_6=OH$ ;  $R_2=R_4=R_5=R_7=H$ )Aromadendrina-7-*O*-metiléter ( $R_1=OCH_3$ ;  $R_2=R_4=R_5=R_7=H$ ;  $R_3=R_6=OH$ )Dihidrocanférido ( $R_1=R_3=OH$ ;  $R_2=R_4=R_5=R_7=H$ ;  $R_6=OCH_3$ )5,2'-Dihidroxi-7,5'-dimetoxiflavanona ( $R_1=R_5=OH$ ;  $R_2=R_4=R_6=H$ ;  $R_3=R_7=OCH_3$ )3,5,7-Trihidroxi-6,4'-dimetoxiflavanona ( $R_1=R_3=OH$ ;  $R_2=R_6=OCH_3$ ;  $R_4=R_5=R_7=H$ )5,7,4'-Trihidroxi-3-metoxiflavanona ( $R_1=OCH_3$ ;  $R_2=R_4=R_5=R_7=H$ ;  $R_3=R_6=OH$ )Dihidromorina ( $R_1=R_3=OH$ ;  $R_2=R_4=R_5=H$ )Taxifolina ( $R_1=R_2=R_5=H$ ;  $R_3=R_4=OH$ )Tetrahidroxiflavanonol ( $R_1=R_5=OH$ ;  $R_2=R_3=R_4=H$ )

*Isoflavonoides (Tabla 1.6)*

**Tabla 1.6.** Isoflavonoides identificados en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto                        | Especie                                 | Referencia |
|----------------------------------|-----------------------------------------|------------|
| Genisteína                       | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 111,116    |
| Genistina                        | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 111,116    |
| Prunetina                        | <i>Prunus avium</i> L. <sup>m</sup>     | 111        |
| Prunetina-5- <i>O</i> -glucósido | <i>Prunus avium</i> L. <sup>p</sup>     | 112        |
| Prunósido A                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>t</sup> | 143        |
| Prunósido B                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>t</sup> | 143        |
| Prunósido C                      | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>t</sup> | 143        |

P: pedúnculo; m: madera; t: tallo.

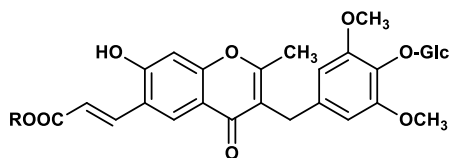


**Genisteína** ( $R_1=R_2=R_3= \text{OH}$ )

**Genistina** ( $R_1=\text{OH}$ ;  $R_2= O\text{-}\alpha\text{-D-glc}$ ;  $R_3= \text{OH}$ )

**Prunetina** ( $R_1= \text{OH}$ ;  $R_2= \text{OCH}_3$ ;  $R_3= \text{OH}$ )

**Prunetina-5-*O*-glucósido** ( $R_1= O\text{-}\beta\text{-D-glc}$ ;  $R_2= \text{OCH}_3$ ;  $R_3= \text{OH}$ )



**Prunósido A** ( $R= \text{H}$ )

**Prunósido B** ( $R= (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ )

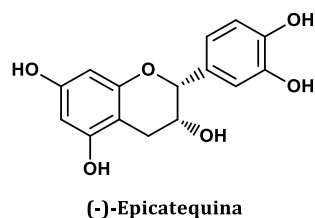
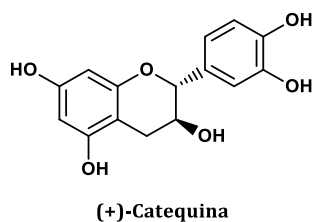
**Prunósido C** ( $R= \text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ )

## Flavan-3-oles (Tabla 1.7)

**Tabla 1.7.** Flavan-3-oles identificados en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto         | Especie                                    | Referencia        |
|-------------------|--------------------------------------------|-------------------|
| (+) -Catequina    | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f, m</sup>     | 61,85,111,120,142 |
|                   | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f, m</sup> | 135,144           |
|                   | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>     | 135               |
| (-) -Epicatequina | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>        | 61,140,145        |
|                   | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup>    | 135,146,147       |
|                   | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>     | 135               |

F: fruto; m: madera.



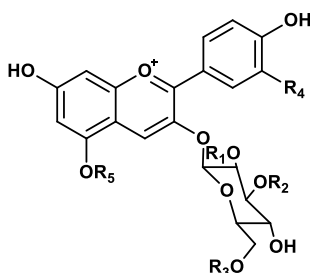
## Antocianinas (Tabla 1.8)

**Tabla 1.8.** Antocianinas identificadas en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto                  | Especie                                 | Referencia          |
|----------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
| Keracianina                | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 140,145,148,149     |
|                            | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 136,150,151         |
|                            | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 137,152,153         |
| Mecocianina                | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 145,148,154         |
| Cianidina-3-O-arabinósido  | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 126                 |
|                            | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 140,145,155         |
|                            | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 136,151             |
| Cianidina-3-O-glucósido    | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 126,137,152,153,156 |
|                            | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 140,145,155         |
|                            | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 136,151             |
| Cianidina-3-O-sambubiósido | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 156                 |

|                                       |                                         |         |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|---------|
| Cianidina-3- <i>O</i> -xilósido       | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 151     |
| Pelargonidina-3- <i>O</i> -rutinósido | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 140,145 |
| Peonidina-3- <i>O</i> -glucósido      | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 140,145 |
|                                       | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 136,151 |
| Peonidina-3- <i>O</i> -rutinósido     | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 140,145 |
|                                       | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 151     |

f: fruto.

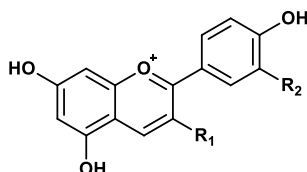


**Keracianina** ( $R_1=R_2=H$ ;  $R_3=O\text{-rut}$ ;  $R_4=OH$ ;  $R_5=H$ )

**Mecocianina** ( $R_1=O\text{-}\alpha\text{-D-gluc}$ ;  $R_2=R_3=R_5=H$ ;  $R_4=OH$ )

**Cianidina-3-*O*-glucósido** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$ )

**Pelargonidina-3-*O*-rutinósido** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ ;  $R_5=O\text{-rut}$ )



**Cianidina-3-*O*-arabinósido** ( $R_1=O\text{-ara}$ ;  $R_2=OH$ )

**Cianidina-3-*O*-sambubiosido** ( $R_1=O\text{-xil}(1\rightarrow2)\text{-glc}$ )

**Cianidina-3-*O*-xilósido** ( $R_1=O\text{-xil}$ ;  $R_2=OH$ )

**Peonidina-3-*O*-glucósido** ( $R_1=O\text{-}\alpha\text{-D-gluc}$ ;  $R_2=OCH_3$ )

**Peonidina-3-*O*-rutinósido** ( $R_1=O\text{-rut}$ ;  $R_2=OCH_3$ )

### Proantocianidinas (Tabla 1.9)

**Tabla 1.9.** Proantocianidinas identificadas en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto        | Especie                                 | Referencia |
|------------------|-----------------------------------------|------------|
| Procianidina A-2 | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 157        |
|                  | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 157        |

|                  |                                         |           |
|------------------|-----------------------------------------|-----------|
|                  | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f, m</sup>  | 61,85,154 |
| Procianidina B-1 | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 135       |
|                  | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 135,137   |
|                  | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f, m</sup>  | 61,85,154 |
| Procianidina B-2 | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 135       |
|                  | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 135,137   |
| Procianidina B-3 | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 61        |
| Procianidina B-4 | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 61        |
|                  | <i>Prunus salicina</i> L. <sup>f</sup>  | 137       |
| Procianidina B-5 | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 61        |
| Procianidina B-7 | <i>Prunus avium</i> L. <sup>f</sup>     | 61        |
|                  | <i>Prunus domestica</i> L. <sup>f</sup> | 135       |

f: fruto; m: madera.

**Procianidina A-2:** Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina

**Procianidina B-1:** Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina

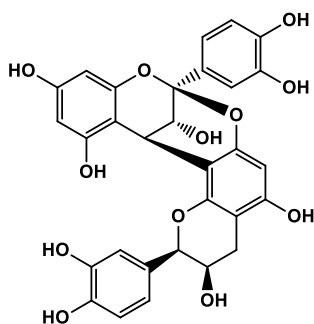
**Procianidina B-2:** Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina

**Procianidina B-3:** Catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina

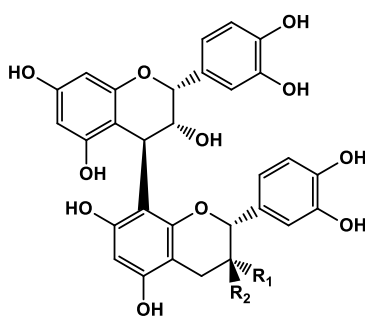
**Procianidina B-4:** Catequina-(4 $\alpha$ →8)-epicatequina

**Procianidina B-5:** Epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina

**Procianidina B-7:** Epicatequina-(4 $\beta$ →6)-catequina

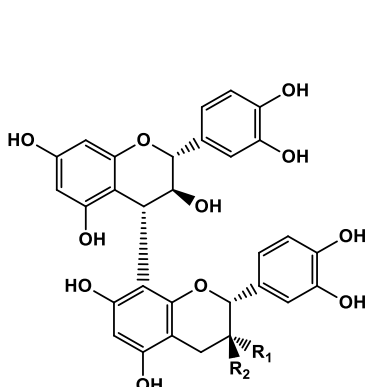


**Procianidina A-2**



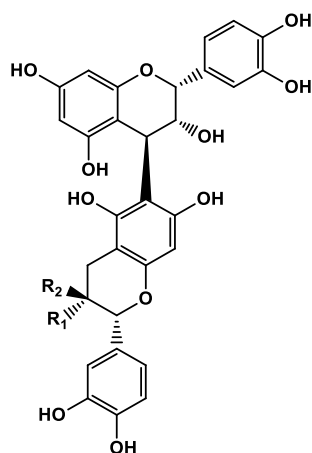
**Procianidina B-1** (R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= OH)

**Procianidina B-2** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H)



**Procianidina B-3** ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ )

**Procianidina B-4** ( $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$ )



**Procianidina B-5** ( $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$ )

**Procianidina B-7** ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ )

También en fruto de ciruelo, sin especificar la especie, se han identificado trímeros (procianidina C1 y C2)<sup>61</sup> además de tetrámeros y pentámeros de epicatequina.<sup>147,158</sup>

- *Otros compuestos fenólicos*

Además de flavonoides, se han descrito otros tipos de compuestos fenólicos en estas especies.

En la especie *P. domestica* L. se han identificado dos fenilpropanoides en el fruto<sup>86</sup> y en el aceite obtenido a partir de sus semillas.<sup>159</sup>

También se han encontrado compuestos de la familia de los ácidos fenólicos en las tres especies. Tras consultar la bibliografía publicada, se observa un mayor número de trabajos que tienen como objeto de estudio la especie *P. domestica* L. (**Tabla 1.10**).

**Tabla 1.10.** Ácidos fenólicos identificados en cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo.

| Compuesto          | Especie                    | Referencia |
|--------------------|----------------------------|------------|
| Ácido cafeico      | <i>Prunus avium</i> L.     | 121        |
|                    | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,160     |
| Ácido metilcafeico | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,161     |

|                                             |                            |             |
|---------------------------------------------|----------------------------|-------------|
|                                             | <i>Prunus avium</i> L.     | 121,145,155 |
| Ácido clorogénico                           | <i>Prunus domestica</i> L. | 162-165     |
|                                             | <i>Prunus salicina</i> L.  | 165-167     |
| Ácido neoclorogénico                        | <i>Prunus avium</i> L.     | 145,155     |
|                                             | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,163,168  |
|                                             | <i>Prunus salicina</i> L.  | 165-167     |
| Ácido criptoclorogénico                     | <i>Prunus domestica</i> L. | 161,163,168 |
|                                             | <i>Prunus salicina</i> L.  | 169         |
| Ácido protocatéquico                        | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,160      |
| Coniferina                                  | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,161      |
| Ácido <i>o</i> -cumárico                    | <i>Prunus avium</i> L.     | 121         |
| Ácido <i>p</i> -cumárico                    | <i>Prunus avium</i> L.     | 121         |
|                                             | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,160      |
|                                             | <i>Prunus salicina</i> L.  | 166         |
| Ácido <i>p</i> -cumarilquínico              | <i>Prunus avium</i> L.     | 121,145,155 |
|                                             | <i>Prunus salicina</i> L.  | 165,167     |
| Ácido 3- <i>O</i> -cafeilquínico metiléster | <i>Prunus domestica</i> L. | 161,165     |
| Ácido ferúlico $\beta$ -D-glucósido         | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,161      |
| (+)- $\beta$ -D-glucopiranosil abscisato    | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,170      |
| Salicilato de metilo                        | <i>Prunus domestica</i> L. | 171         |
| (6 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-Roseósido         | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,170      |
| Ácido vanílico                              | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,161,165  |
| Ácido vanílico $\beta$ -glucósido           | <i>Prunus domestica</i> L. | 86,160      |

Además se han aislado cuatro derivados del ácido abscísico a partir de extracto etanólico de ciruela europea<sup>86,170</sup> y varios isómeros del ácido cafeilquínico<sup>164,165</sup>.

➤ Esteroles y triterpenos pentacíclicos

Estos tipos de compuestos son abundantes en el género *Prunus*<sup>70</sup> aunque en las especies que aquí se recogen se han identificado sólo algunos de ellos.

En cerezo (*P. avium* L.) se han identificado en el fruto cuatro fitoesteroles,<sup>172,173</sup> campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucósido y un triterpeno pentacíclico, ácido ursólico.<sup>174</sup> También se han encontrado esteroides en el aceite obtenido a partir de la semilla.<sup>175</sup>

En ciruelo europeo (*P. domestica* L.) se ha identificado brasicasterol, campesterol, sitosterol,  $\Delta^5$ -avenasterol y estigmasterol.<sup>176,177</sup> No se ha encontrado nada al respecto en *P. salicina* L.

En un trabajo publicado por Jiménez-Scrig y colaboradores encuentran campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol en ciruela, aunque no se especifica la especie.<sup>172</sup>

#### ➤ Carotenoides

Se han identificado compuestos de la familia de los carotenoides en frutos de cerezo,<sup>178-180</sup> ciruelo japonés<sup>181,182</sup> y europeo<sup>179,180</sup>. También se han detectado estos compuestos en aceite de semilla de ciruela europea.<sup>183</sup> No han sido identificados en otras partes de las plantas.

#### ➤ Cumarinas

Se han aislado cumarinas de diferentes partes del ciruelo, como fruto,<sup>86,161,184</sup> tallo<sup>143</sup> y corteza<sup>185</sup>. No se ha encontrado nada en cerezo ni en ciruelo japonés.

### **1.3.2. Lichi**

#### **Descriptiva general**

El lichi, conocido con el nombre botánico de *Litchi chinensis* Sonn., pertenece a la familia Sapindaceae.<sup>186</sup> Esta familia está formada por unos 147 géneros que crecen en las zonas tropicales y subtropicales del planeta (**Tabla 1.11**).<sup>187</sup>



**Tabla 1.11.** Clasificación botánica de la especie *Litchi chinensis* Sonn.

| Orden             | Familia            | Género        | Especie          |
|-------------------|--------------------|---------------|------------------|
| <u>Sapindales</u> | Anacardiaceae      | Alectryon     | <u>chinensis</u> |
|                   | Burseraceae        | Beguea        |                  |
|                   | Meliaceae          | Cardiospermum |                  |
|                   | Rutaceae           | Dimocarpus    |                  |
|                   | <u>Sapindaceae</u> | <u>Litchi</u> |                  |
|                   | Simarobuaceae      | Urvillea      |                  |

El género *Litchi* contiene sólo una especie que comprende tres subespecies: *chinensis*, *phippinensis* y *javensis*.<sup>35</sup> La primera de ellas es ampliamente cultivada debido a su interés comercial.<sup>35</sup>

El lichi tiene su origen en China y Vietnam, donde ha sido cultivado desde hace más de 3.000 años.<sup>35</sup> Se trata de un árbol perenne de tamaño medio con copa redondeada y tronco liso y gris. Tiene hojas de color rojo cuando son jóvenes, volviéndose verdes brillantes con la madurez, coriáceas y pinadas, divididas en 4–8 pares de folíolos elípticos o lanceolados, glabros y de 5–7 cm de longitud. Presenta flores pequeñas monoicas de color blanco amarillento, con cáliz tetrámero y ausencia de corola. El fruto es una drupa dulce, ovalada con forma de corazón o casi redonda, de 2.5 cm de diámetro. La parte externa está protegida por una capa rugosa de color rosa o rojo y en el interior se ubica la semilla (**Imagen 1.4**).<sup>35</sup>



**Imagen 1.4.** *Litchi chinensis* Sonn.

### **Cultivo y variedades**

El cultivo de lichi se extiende por las zonas del sureste asiático, subcontinente indio, sur de África, Australia y zona centro del continente americano,<sup>188-190</sup> ocupando más de 20 países de todo el mundo.<sup>191</sup> China es el principal productor de lichi en el mundo, seguido por la India, Tailandia y Vietnam.<sup>187,190</sup> Recientemente, se ha comenzado el cultivo de este árbol en el sur de Europa, concretamente en la isla de Sicilia (Italia) y el sur de España, donde las condiciones climáticas de frío en invierno y veranos cálidos y húmedos, hacen posible su cultivo.<sup>188</sup> En España, su cultivo comenzó en 1970 cuando fue introducido en las Islas Canarias.<sup>192</sup> Se conocen variedades muy antiguas cuyo origen se sitúa hace más de 600 años, como 'Sum Yee Hong', 'Haak Yip', 'Kwai May', 'No Mai Chee', 'Wai Chee', 'Seong Sue Wai', y otras relativamente más actuales, como 'Bah Lup', 'Bengal', 'Heong Lai', 'Mauritius', 'Tim Naan' y 'Souey Tung'.<sup>188</sup> Las variedades 'Bengal' y 'Mauritius' se encuentran entre las más cultivadas en España.<sup>192</sup>

### **Aplicaciones y actividad biológica**

El interés por el cultivo de este árbol está asociado a las bondades nutritivas de su fruto, lo que ha hecho que sea, incluso, considerado como un alimento funcional.<sup>188</sup> Aunque su utilidad principal es como fruta fresca, también puede ser procesado para elaborar conservas, helados, yogur, zumo o vino.

Preparados a partir de distintas partes de este árbol se han empleado por la medicina tradicional para tratar diferentes dolencias, como por ejemplo, la decocción de raíz, corteza y flor para aliviar el dolor de garganta, o el té de hojas para combatir diversas afecciones, como hernias, úlceras, lumbago o problemas intestinales, entre otros muchos usos.<sup>35</sup>

Recientemente, las diferentes partes que constituyen el fruto (pericarpio, pulpa y semilla) han sido objeto de estudio de numerosos ensayos biológicos que ponen de manifiesto sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras, antidiabéticas, anticancerígenas o neuroprotectoras, entre otras.<sup>191</sup> Además, de su fruto se obtiene el Oligonol®, un extracto comercial rico en proantocianidinas de bajo peso molecular, con elevada actividad antioxidante y que podría presentar efectos beneficiosos frente a la obesidad<sup>193,194</sup> o enfermedades cardiovasculares<sup>195</sup>.

### **Composición química**

La composición química del fruto y de sus diferentes partes ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, son escasos los trabajos sobre otros órganos o partes del árbol.

#### ***Fracción volátil***

La composición volátil del fruto del lichi ha sido estudiada en numerosas ocasiones.<sup>196-199</sup> También se ha analizado la composición del aceite esencial obtenido a partir de hojas de lichi<sup>200</sup> y de la piel del fruto<sup>201</sup>. Respecto a la madera, no existen estudios previos.

#### ***Fracción no volátil***

Se ha estudiado la composición no volátil de distintas partes de este árbol, como el fruto y sus partes, la flor, hojas y semillas.<sup>35</sup>

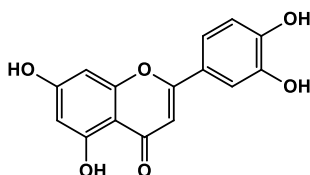
➤ Compuestos fenólicos

• *Flavonoides*

A continuación se revisan los flavonoides identificados en diferentes órganos de este árbol (**Tablas 1.12–1.15**). En este caso, el fruto y sus partes han sido estudiados en numerosas ocasiones.

*Flavonas*

Se ha aislado una flavona, luteolina, a partir del extracto de acetato de etilo obtenido de la hoja de lichi.<sup>202</sup>



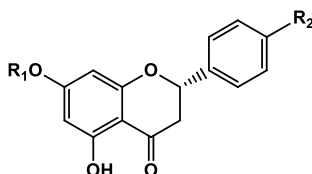
**Luteolina**

*Flavanonas (Tabla 1.12)*

**Tabla 1.12.** Flavanonas identificadas en lichi.

| Compuesto                                                                                                        | Parte de la planta estudiada | Referencia |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|
| (2 <i>S</i> )-Pinocembrina-7- <i>O</i> -rutinósido                                                               | Semilla                      | 203–205    |
| (2 <i>R</i> )-Naringenina-7- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> -α- <i>L</i> -ramnopiranosil-β- <i>D</i> -glucopiranosido) | Semilla                      | 203        |
| Narirutina                                                                                                       | Semilla                      | 204,206    |
| Naringina                                                                                                        | Semilla                      | 204        |
| (2 <i>R</i> )-Pinocembrina-7-neohesperidósido                                                                    | Semilla                      | 204        |
| Litchiosido D                                                                                                    | Semilla                      | 205        |
| (-)-Pinocembrina-7- <i>O</i> -neohesperidósido                                                                   | Semilla                      | 205,206    |
| Pinocembrina-7- <i>O</i> -glucósido                                                                              | Semilla                      | 206        |
| (2 <i>S</i> )-Pinocembrina-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -α- <i>L</i> -arabinosil-β- <i>D</i> -glucopiranosido)    | Semilla                      | 206        |

|                                                                                                            |         |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----|
| Pinocembrina-7- <i>O</i> -[(6''- <i>O</i> - $\alpha$ -L-glucopiranosido)- $\beta$ -D-glucopiranosido]      | Semilla | 206 |
| Pinocembrina-7- <i>O</i> -[(2'',6''- <i>O</i> - $\alpha$ -L-diramnopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosido] | Semilla | 206 |

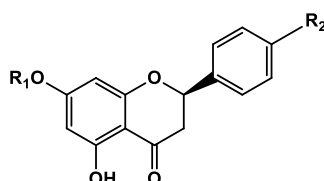


**(2*S*)-Pinocembrina-7-*O*-rutinosido** ( $R_1$ = rut;  $R_2$ = OH)

**Naringin** ( $R_1$ =  $\beta$ -neohesperósido;  $R_2$ = OH)

**Litchiosido D** ( $R_1$ = (2'',6''-*O*- $\alpha$ -L-diram)- $\beta$ -D-glc;  $R_2$ = H)

**(-)-Pinocembrin-7-*O*-neohesperósido** ( $R_1$ =  $\beta$ -neohesperósido;  $R_2$ = H)



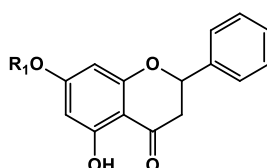
**(2*R*)-Naringenina-7-*O*-(3''-*O*- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucósido)** ( $R_1$ = 3''-*O*- $\alpha$ -L-ram- $\beta$ -D-glc;  $R_2$ = OH)

**Narirutina** ( $R_1$ = 6''-*O*- $\alpha$ -L-ram- $\beta$ -D-glc;  $R_2$ = OH)

**(2*R*)-Pinocembrina-7-neohesperidósido** ( $R_1$ = neohesperósido;  $R_2$ = H)

**Pinocembrina-7-*O*-glucósido** ( $R_1$ = glc;  $R_2$ = H)

**(2*S*)-Pinocembrina-7-*O*-(6''-*O*- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucósido)** ( $R_1$ =6''-*O*- $\alpha$ -L-ram- $\beta$ -D-glc;  $R_2$ = H)



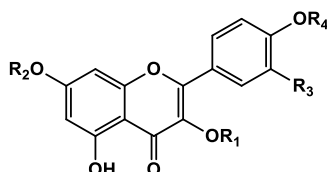
**Pinocembrina-7-*O*-[(6''-*O*- $\alpha$ -L-glucósido)- $\beta$ -D-glucósido]** ( $R$ = (6''-*O*- $\alpha$ -L-glc)- $\beta$ -D-glc)

**Pinocembrina-7-*O*-[(2'',6''-*O*- $\alpha$ -L-diramnósil)- $\beta$ -D-glucósido]** ( $R$ = (2'',6''-*O*- $\alpha$ -L-diram)- $\beta$ -D-glc)

*Flavonoles (Tabla 1.13)*

**Tabla 1.13.** Flavonoles identificados en lichi.

| Compuesto                                                              | Parte de la planta estudiada | Referencia |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|
| Canferol                                                               | Fruto                        | 207        |
| Quercetina                                                             | Semilla                      | 206        |
| Canferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucósido                            | Hoja                         | 202        |
| Canferol-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosido                      | Semilla                      | 206        |
| Canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -D-ramnósido                           | Hoja                         | 202        |
| Canferol-7- <i>O</i> -neohesperidósido                                 | Semilla                      | 205        |
| Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido                                     | Pulpa                        | 208,209    |
|                                                                        | Hoja                         | 202        |
| Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido-7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnósido | Pulpa                        | 208        |
| Tamarixetina-3- <i>O</i> -rutinósido                                   | Semilla                      | 205        |
| Narcisina                                                              | Semilla                      | 206        |



**Canferol** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ )

**Quercetina** ( $R_1=R_2=R_4=H$ ;  $R_3=OH$ )

**Canferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucósido** ( $R_1=glc$ ;  $R_2=R_3=R_4=H$ )

**Canferol-7-*O*- $\beta$ -D-glucósido** ( $R_1=R_3=R_4=H$ ;  $R_2=glc$ )

**Canferol-3-*O*- $\alpha$ -D-ramnósido** ( $R_1=Ramnosa$ ;  $R_2=R_3=R_4=H$ )

**Canferol-7-*O*-neohesperidósido** ( $R_1=R_3=R_4=H$ ;  $R_2=Hesperidósido$ )

**Quercetina-3-*O*-rutinósido** ( $R_1=Rutinosa$ ;  $R_2=R_4=H$ ;  $R_3=OH$ )

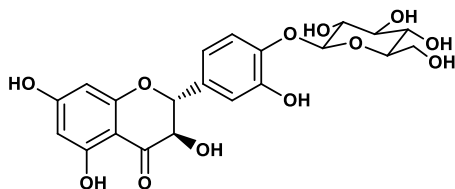
**Quercetina-3-*O*-rutinósido-7-*O*- $\alpha$ -L-ramnósido** ( $R_1=Rutinosa$ ;  $R_2=Ramnosa$ ;  $R_3=OH$ ;  $R_4=H$ )

**Tamarixetina-3-*O*-rutinósido** ( $R_1=Rutinosa$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=OH$ ;  $R_4=CH_3$ )

**Narcisina** ( $R_1=Rutinosa$ ;  $R_2=R_4=H$ ;  $R_3=OCH_3$ )

### Dihidroflavonoles

Se ha aislado taxifolina-4'-O-β-D-glucósido de la semilla de lichi.<sup>205</sup>

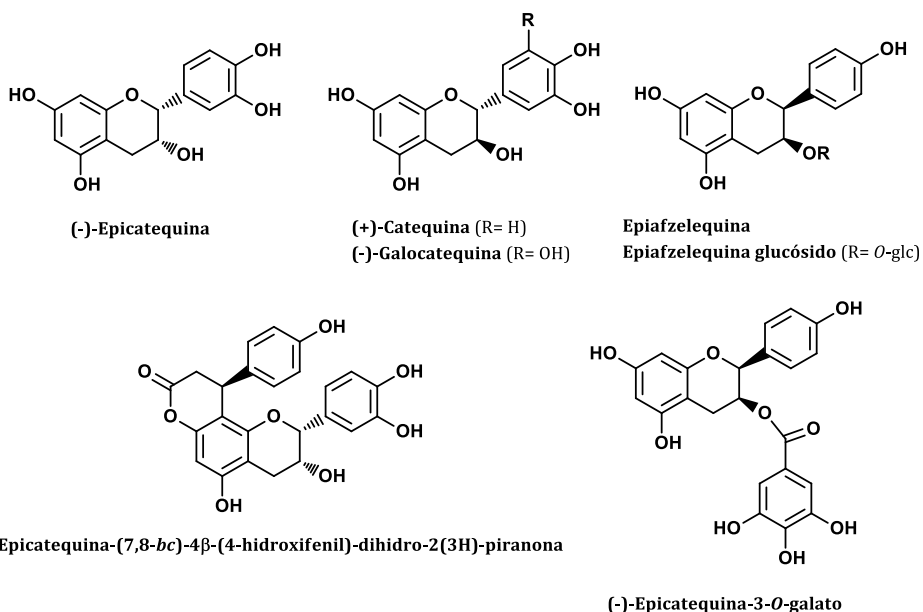


**Taxifolina-4'-O-β-D-glucopiranosido**

### Flavan-3-oles (Tabla 1.14)

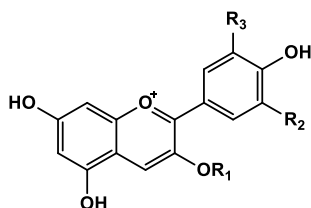
**Tabla 1.14.** Flavan-3-oles identificados en lichi.

| Compuesto                                                        | Parte de la planta estudiada | Referencia |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|
| (-)-Epicatequina                                                 | Fruto                        | 210-213    |
|                                                                  | Pulpa                        | 208,209    |
|                                                                  | Semilla                      | 187        |
|                                                                  | Flor                         | 214        |
|                                                                  | Hoja                         | 202        |
| (+)-Catequina                                                    | Pulpa                        | 209        |
| (-)-Galocatequina                                                | Fruto                        | 210        |
|                                                                  | Semilla                      | 215        |
| Epiafzelequina                                                   | Fruto                        | 210        |
| Epiafzelequina glucósido                                         | Fruto                        | 210        |
| (-)-Epicatequina-3-O-galato                                      | Semilla                      | 215        |
| Epicatequina-(7,8-bc)-4β-(4-hidroxifenil)-dihidro-2(3H)-piranona | Semilla                      | 187        |



### Antocianidinas

Se han aislado tres antocianidinas del fruto: cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-rutinósido y malvidina-3-*O*-glucósido.<sup>216</sup>



**Cianidina-3-*O*-glucósido** (R<sub>1</sub>= *O*-glc; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= OH)

**Cianidina-3-*O*-rutinósido** (R<sub>1</sub>= *O*-rut; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= OH)

**Malvidina-3-*O*-glucósido** (R<sub>1</sub>= *O*-glc; R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>= OCH<sub>3</sub>)

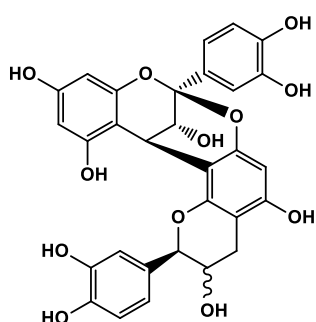
### Proantocianidinas (Tabla 1.15)

**Tabla 1.15.** Proantocianidinas identificadas en lichi.

| Compuesto        | Parte de la planta estudiada | Referencia |
|------------------|------------------------------|------------|
| Procianidina A-1 | Semilla                      | 187        |

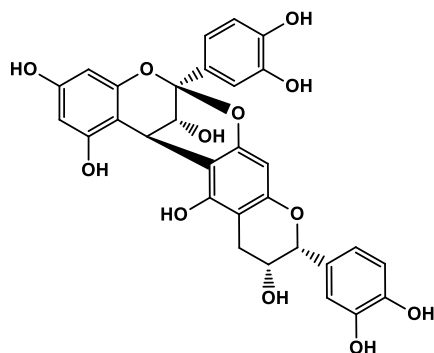


|                                                                                             |         |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|
|                                                                                             | Fruto   | 211,217,218 |
| Procianidina A-2                                                                            | Semilla | 187         |
|                                                                                             | Flor    | 214         |
|                                                                                             | Hoja    | 202         |
| Procianidina A-6                                                                            | Semilla | 187         |
| Procianidina B-2                                                                            | Fruto   | 212         |
|                                                                                             | Hoja    | 219         |
| Procianidina B-4                                                                            | Fruto   | 212         |
| Litchitanina A-1                                                                            | Semilla | 187         |
| Litchitanina A-2                                                                            | Semilla | 187         |
| Aesculitanina A                                                                             | Semilla | 187         |
| Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7, 4 $\beta$ →8)-<br>epiafzelequina-(4 $\alpha$ →8)-epicatequina | Semilla | 187         |
| Cinamtanina B-1                                                                             | Fruto   | 217         |
|                                                                                             | Hoja    | 220         |
| 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-<br>(4 $\beta$ →8)-catequina     | Semilla | 204         |
| 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-<br>(4 $\beta$ →8)-epicatequina  | Semilla | 204         |
| 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -Epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavan-<br>(4 $\beta$ →8)-epicatequina    | Semilla | 204         |

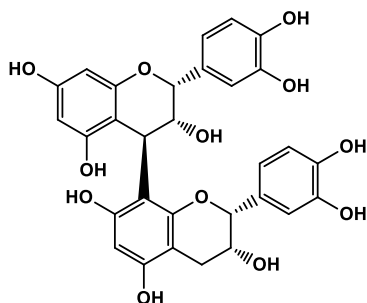


Procianidina A-1 (  $\sim$  =  $\sim$  )

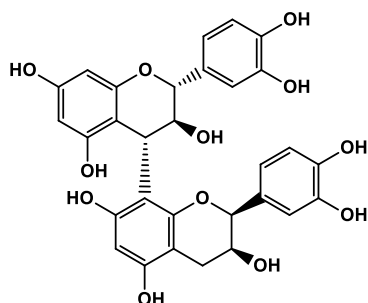
Procianidina A-2 (  $\sim$  =  $\blacktriangle$  )



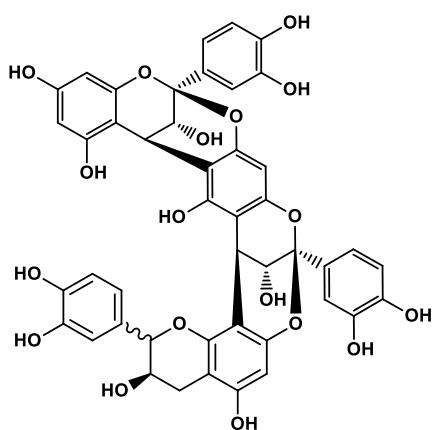
Procianidina A-6



**Procianidina B-2**

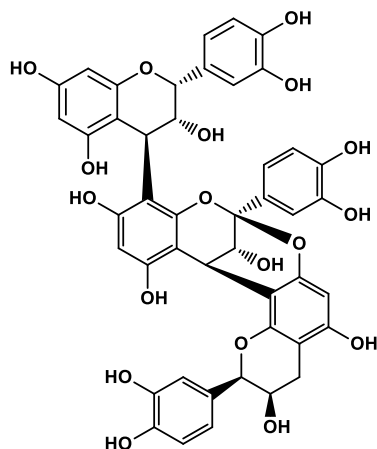


**Procianidina B-4**

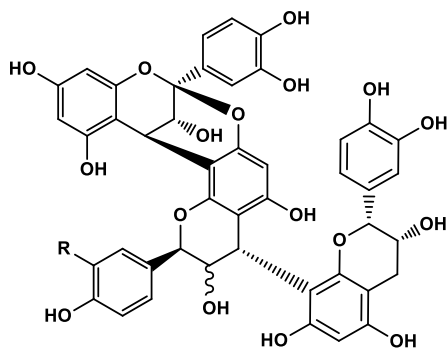


**Litchitanina A-1** (~~~~~ = )

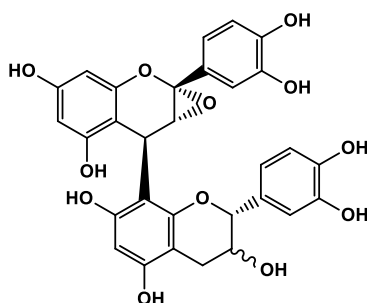
**Litchitanina A-2** (~~~~~ = ▲ )



**Aesculitanina A**

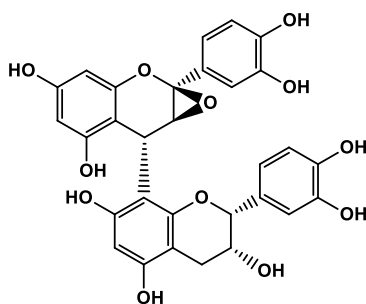


**Epicatequina-(2 $\beta$   $\Rightarrow$  O  $\Rightarrow$  7, 4 $\beta$   $\Rightarrow$  8)-epiafzelequina-(4 $\beta$   $\Rightarrow$  8)-epicatequina (R= H)  
**Cinamtanina B-1** (R= OH)**



2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Epoxi-5,7,3',4'-tetrahydroxiflavan-(4  $\Rightarrow$  8)-catequina (  $\curvearrowright$  =  $\blacktriangle$  )

2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Epoxi-5,7,3',4'-tetrahydroxiflavan-(4  $\Rightarrow$  8)-epicatequina (  $\curvearrowright$  =  $\curvearrowright$  )



2 $\beta$ ,3 $\beta$ -Epoxi-5,7,3',4'-tetrahydroxiflavan-(4  $\Rightarrow$  8)-epicatequina

También se han identificado mediante la técnica HPLC-MS, proantocianidinas triméricas de las subfamilias de las propelargonidinas, procianidinas y prodelfinidinas en el extracto obtenido a partir del fruto empleando una mezcla de metanol/agua como disolvente.<sup>221</sup>

- *Ácidos fenólicos*

También se han identificado ácidos fenólicos en diferentes partes de este árbol tropical. En un trabajo publicado por Chang *et al.*<sup>222</sup> se identificó el ácido gentísico como mayoritario, además de otros 9 ácidos fenólicos minoritarios en flor de lichi (los ácidos gálico, clorogénico, vanílico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico, siríngico y anísico). En el pericarpio se han aislado 3,4-dihidroxibenzoato de metilo, ácido 2-(2-hidroxi-5-(metoxycarbonil)fenoxi)benzoico y butilhidroxitolueno.<sup>207</sup> A partir de la semilla se han aislado dos compuestos de este tipo, ácido protocatéquico y ácido cumárico,<sup>204</sup> e identificado otros dos, ácido gálico<sup>215</sup> y ácido 3,5-dihidroxibenzoico<sup>223</sup>. Finalmente, en la pulpa han sido identificados los ácidos gálico, clorogénico y cafeico.<sup>209</sup>

➤ Esteroles y triterpenoides pentacíclicos

En 2010, Malik *et al.* aislaron un nuevo triterpenoide pentacíclico a partir de material vegetal procedente de las partes aéreas del lichi, lup-12,20(29)dien-3,27-diol, junto con ácido betulínico, lupeol,  $\beta$ -sitosterol, betulinol y estigmasterol.<sup>224</sup> Este último, además, ha sido identificado en el fruto.<sup>207</sup> De la semilla se aisló ácido 3-oxotricuralla-7,24-dien-21-oico.<sup>35</sup>

➤ Otros compuestos

Además de los compuestos indicados arriba, se han identificado, entre otros compuestos, una cumarina en semilla (escopoletina)<sup>204</sup> y cinco sesquiterpenos (los litchiósidos A y B, el pumilásido A, la funingensina A<sup>187</sup> y el pterodontriol-D-6-O- $\beta$ -D-glucopiranosido<sup>204</sup>), así como dos lignanos, schizandrisido<sup>225</sup> e isolariciresinol,<sup>207</sup> en hoja y en el pericarpio, respectivamente.

### **1.3.3. Arándano rojo americano**

#### **Descriptiva general**

El arándano rojo americano (en inglés *cranberry*) se conoce con el nombre botánico de *Vaccinium macrocarpon* Aiton y pertenece a la familia de las Ericaceae. Esta familia engloba a más de 100 géneros y aproximadamente 3.000 especies localizadas, principalmente, en el Sur de África, Norte de América, el Himalaya y el Suroeste de Europa (**Tabla 1.16**).<sup>226</sup>

**Tabla 1.16.** Clasificación botánica de la especie *Vaccinium macrocarpon* Aiton.

| Orden           | Familia          | Género           | Especie            |
|-----------------|------------------|------------------|--------------------|
| <u>Ericales</u> | Actinidiaceae    | Arbutus          | corymbosum         |
|                 | Balsaminaceae    | Arctostaphylos   | angustifolium      |
|                 | Diapensiaceae    | Calluna          | oxycoccus          |
|                 | Ebanaceae        | Daboecia         | <u>macrocarpon</u> |
|                 | <u>Ericaceae</u> | Erica            | myrtillus          |
|                 | Myrsinaceae      | Loiseleuria      | vitis-idaea        |
|                 | Theaceae         | Phyllodoce       |                    |
|                 |                  | Rhododendron     |                    |
|                 |                  | <u>Vaccinium</u> |                    |

La especie *macrocarpon* es un arbusto autóctono del este de los Estados Unidos y Canadá, que crece en terrenos cenagosos y pantanosos desde el estado de Carolina a Canadá.<sup>227</sup> Este pequeño arbusto perenne de 4–15 cm de altura presenta hojas de color verde azulado por el haz y verde más claro por el envés, oblongas, elípticas y levemente revolutas, y con unas dimensiones de 5–18 x 2–55 mm. También se observan fluorescencias en axilas de brácteas en forma de hojas en la base de los brotes del mismo año. Sus flores pueden ser blancas o ligeramente rosadas con los lóbulos del cáliz relativamente pequeños. Sus frutos son bayas esféricas de color rojo a rosa y con un diámetro comprendido entre 9–14 mm. Florece entre finales de primavera y principios de verano, y su fruto madura justo antes de comenzar el invierno (*Imagen 1.5*).<sup>228</sup>



**Imagen 1.5.** *Vaccinium macrocarpon* Ait.

## **Cultivo y variedades**

El cultivo del arándano rojo americano comenzó a principios del siglo XIX en Massachusetts y New Jersey y ha ido ganando popularidad a lo largo del siglo pasado, siendo un alimento imprescindible en importantes celebraciones tradicionales como “Thanksgiving” o “Christmas”. Actualmente, su cultivo se distribuye a lo largo de todo el planeta en terrenos situados entre las longitudes 70°–80° oeste y las latitudes 40°–50° norte.<sup>229</sup> El principal productor de esta fruta es Estados Unidos, con una producción media anual de 380.000 toneladas, centrándose su cultivo en los estados de Wisconsin, Massachusetts, New Jersey, Oregon y Washington.<sup>230</sup> También se localizan cultivos en otros países, como Canadá, Chile o Gran Bretaña. En Europa, se encuentran plantaciones de este arbusto en Estonia, Letonia y Bielorrusia. Todas las variedades que hoy en día se conocen surgieron a partir de cuatro variedades silvestres (‘Early Black’, ‘Howes’, ‘McFarlin’, ‘Searles’) que crecían libremente en zonas pantanosas. Algunas de las variedades actuales son ‘Early Black’, ‘Stevens’, ‘Howes’, ‘McFarlin’, ‘Crowley’, o ‘Bergman’,<sup>229</sup> aunque las dos primeras ocupan la mayor parte de la superficie cultivable.<sup>231</sup>

## **Aplicaciones y actividad biológica**

El arándano rojo americano se cultiva, principalmente, por su fruta, que se puede consumir fresca o seca, o utilizar para preparar zumos y compotas. Ésta presenta elevadas concentraciones de interesantes compuestos muy beneficiosos para la salud humana como flavonoides y proantocianidinas.<sup>232</sup> Algunos estudios clínicos han demostrado que el consumo de arándano o sus productos derivados puede reducir los niveles de colesterol LDL y aumentar los de HDL, elevar la capacidad antioxidante del plasma, reducir la concentración de la bacteria *Streptococcus mutans* en saliva, causante de las caries, modular la colonización de la bacteria gástrica *Helicobacter pylori*, proteger el tracto urinario contra las infecciones, etc.<sup>36,232</sup>

## Composición química

Sólo se han encontrado trabajos cuyo objeto de estudio es el fruto de *Vaccinium macrocarpon* Ait. A continuación se recogen los diferentes compuestos aislados e identificados en fruto de arándano rojo americano.

### ***Fracción volátil***

Recientemente, la composición volátil del fruto ha sido estudiada por Zhu *et al.*<sup>233</sup> identificando treinta y seis compuestos responsables del aroma del fruto, entre los que se encuentran aldehídos, alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres y cetonas. También se ha estudiado la porción volátil de mermelada preparada con esta fruta, detectando terpenos principalmente,<sup>234</sup> y la porción volátil del zumo.<sup>235</sup>

No se han encontrado trabajos estudiando la composición volátil de otras partes de esta planta.

### ***Fracción no volátil***

#### ➤ Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos más abundantes encontrados en *Vaccinium macrocarpon* Ait. son antocianidinas y proantocianidinas. Sólo la composición química del arándano ha sido estudiada.<sup>36,232,236</sup> No se han encontrado trabajos en los que se estudie otra parte de esta planta.

- *Flavonoides*

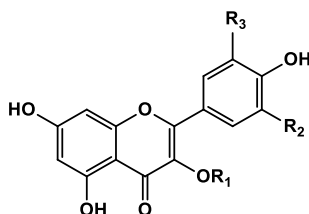
#### *Flavonoles*

El 75% de los flavonoles encontrados en arándano rojo americano son derivados glicosilados de quercetina,<sup>232,236,237</sup> predominando el compuesto quercetina-3-O-galactósido, aunque se han descrito otros once glucósidos minoritarios.<sup>36</sup> También se han identificado derivados glicosilados de canferol y miricetina (**Tabla 1.17**).

**Tabla 1.17.** Flavonoles identificados en arándano rojo americano.

| <b>Compuesto</b>                                       | <b>Referencia</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------------|
| Canferol                                               | 238               |
| Canferol-3- <i>O</i> -glucósido                        | 239               |
| Quercetina                                             | 238,240           |
| Quercetina-3- <i>O</i> -arabinósido                    | 239-243           |
| Quercetina-3- <i>O</i> -arabinofuranósido              | 242               |
| Quercetina 3-(6''- <i>p</i> -hidroxibencilgalactósido) | 244               |
| Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido                    | 239-244           |
| Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido                      | 240,242           |
| Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido                      | 239-242,244       |
| Quercetina-3- <i>O</i> -xilósido                       | 240-242           |
| Miricetina                                             | 238,240           |
| Miricetina-3- <i>O</i> -arabinósido                    | 239-242           |
| Miricetina-3- <i>O</i> -arabinofuranósido              | 244               |
| Miricetina-3- <i>O</i> -galactósido                    | 240-242,244       |
| Miricetina-3- <i>O</i> -ramnósido                      | 240               |
| Miricetina-3- <i>O</i> -xilóxido                       | 240               |





**Canferol** ( $R_1=R_2=R_3=H$ )

**Quercetina** ( $R_1=R_3=H$ ;  $R_2=OH$ )

**Canferol-3-O-glucósido** ( $R_1=glc$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )

**Quercetina-3-O-arabinósido** ( $R_1=Arabinosa$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )

**Quercetina-3-O-arabinofuranósido** ( $R_1=Arabinofuranosa$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )

**Quercetina-3-O-galactósido** ( $R_1=Galactosa$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )

**Quercetina-3-O-glucósido** ( $R_1=Glc$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )

**Quercetina-3-O-ramnósido** ( $R_1=Ramnosa$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )

**Quercetina-3-O-xilósido** ( $R_1=Xilosa$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )

**Miricetina** ( $R_1=H$ ;  $R_2=R_3=OH$ )

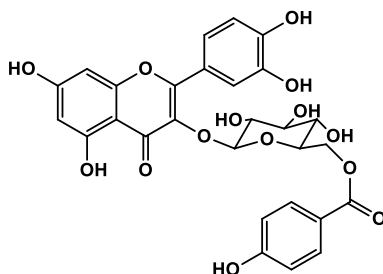
**Miricetina-3-O-arabinósido** ( $R_1=Arabinosa$ ;  $R_2=R_3=OH$ )

**Miricetina-3-O-arabinofuranósido** ( $R_1=Arabinofuranosa$ ;  $R_2=R_3=OH$ )

**Miricetina-3-O-galactósido** ( $R_1=Galactosa$ ;  $R_2=R_3=OH$ )

**Miricetina-3-O-ramnósido** ( $R_1=Ramnosa$ ;  $R_2=R_3=OH$ )

**Miricetina-3-O-xilósido** ( $R_1=Xilosa$ ;  $R_2=R_3=OH$ )



**Quercetin 3-(6''-p-hidroxibencilgalactosido)**

### Flavan-3-oles

Se han identificado los enantiómeros *dextro* y *levo* de catequina y epicatequina,<sup>36,236,240</sup> epigalocatequina, galato de epigalocatequina, galato de galocatequina y galato de catequina.<sup>245</sup>

### *Antocianidinas*

El color rojo del arándano rojo americano es debido, principalmente, a cuatro antocianidinas: cianidina-3-*O*-arabinósido, cianidina-3-*O*-galactósido, peonidina-3-*O*-galactósido y peonidina-3-*O*-arabinósido.<sup>246</sup> Además de éstas, se han identificado otras antocianidinas minoritarias en arándano rojo americano (**Tabla 1.18**).

**Tabla 1.18.** Antocianidinas identificadas en *cranberry*.

| Compuesto                                       | Referencia      |
|-------------------------------------------------|-----------------|
| Cianidina                                       | 238             |
| Cianidina-3-arabinósido                         | 234,239-242,246 |
| Cianidina-3-galactósido                         | 234,239-242     |
| Cianidina-3-glucósido                           | 234,239,246     |
| Delfidina-3- <i>O</i> -arabinósido              | 246,247         |
| Malvidina-3- <i>O</i> -arabinósido              | 247             |
| Malvidina-3- <i>O</i> -galactósido              | 247             |
| Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-4-vinilcatecol | 234             |
| Malvidina-6-acetyl-3-galactósido                | 234             |
| Pelargonidina-3- <i>O</i> -arabinósido          | 247             |
| Pelargonidina-3- <i>O</i> -galactósido          | 247             |
| Peonidina-3-arabinósido                         | 239-242,246     |
| Peonidina-3-galactósido                         | 239-242,246     |
| Peonidina-2,5-digalactósido                     | 247             |
| Peonidina-3-glucósido                           | 239             |
| Petunidina-3- <i>O</i> -galactósido             | 246,247         |

### *Proantocianidinas*

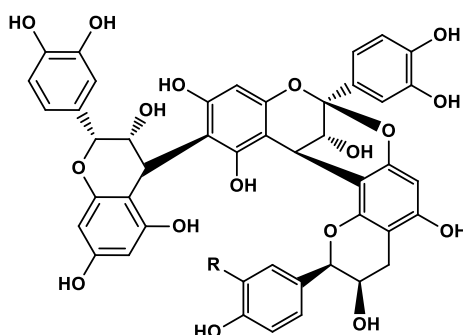
Se han detectado oligómeros de proantocianidina constituidos por hasta diez unidades de flavan-3-ol. En su estructura predomina (-)-epicatequina, mientras que (+)-catequina y (epi)galocatequina sólo están presentes en una baja proporción.<sup>36</sup> Por otro lado, el enlace tipo A está presente en una alta proporción del total de proantocianidinas identificadas en *cranberry*.<sup>248</sup> Aunque existen varias publicaciones

centradas en el estudio de las proantocianidinas del arándano, sólo se ha conseguido proponer la estructura individual de algunas de ellas mediante LC-MS, RMN y degradación química (**Tabla 1.19**).

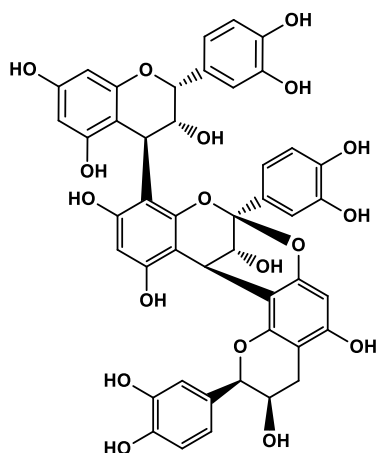
**Tabla 1.19.** Flavonoles identificados en arándano rojo americano.

| Compuesto                                                                           | Referencia |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Procianidina A-2 <sup>a</sup>                                                       | 249        |
| Procianidina B-2 <sup>a</sup>                                                       | 249        |
| Epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →7)-epicatequina | 249        |
| Cinamtanina B-1 <sup>a</sup>                                                        | 249        |
| Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina | 249        |

<sup>a</sup>Ver estructura en apartado 1.3.2.



Epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina



**Epicatequina-(4 $\beta$   $\Rightarrow$  8)-epicatequina-(2 $\beta$   $\Rightarrow$  O  $\Rightarrow$  7,4 $\beta$   $\Rightarrow$  8)-epicatequina**

- *Otros compuestos fenólicos*

También se han identificado ácidos fenólicos como *p*-cumárico, caféico, ferúlico, *p*-hidroxibenzoico, elágico o vanílico, entre otros.<sup>36,236,238,239</sup>

- Esteroles y triterpenoides pentacíclicos

Se han identificado los terpenos ácidos ursólico y oleanólico, así como, los esteroides  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.<sup>236,241,242</sup>

- Otros compuestos

Además de los compuestos indicados arriba, se han identificado, entre otros, ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas y carotenos.<sup>236</sup>



## 2. SECOIRIDOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

### 2.1. Rasgos estructurales

Los iridoides son monoterpenos irregulares que contienen en su estructura un ciclo de ciclopentano fusionado con otro de dihidropirano. Los secoiridoides se generan a partir de los iridoides como consecuencia de la ruptura del enlace que une los carbonos 7 y 8, produciéndose la apertura del anillo de cinco miembros (**Figura 2.1**).<sup>250</sup>

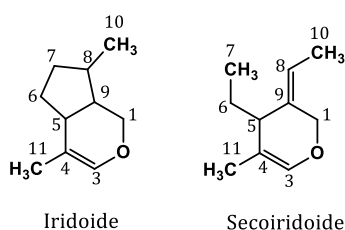


**Figura 2.1.** Estructura básica de iridoides y secoiridoides

### 2.2. Actividades biológicas

Los secoiridoides son compuestos naturales con gran relevancia desde el punto de vista farmacológico. Esto es debido a las numerosas actividades biológicas que han demostrado, como antidiabetes, antiinflamatorias, anticancerígenas o inmunosupresoras, entre otras.<sup>250-252</sup> También se ha comprobado que pueden actuar protegiendo y facilitando el buen funcionamiento de la proteína FCN (factor de crecimiento nervioso), presente en el sistema nervioso y responsable de la supervivencia de las neuronas en el periodo embrionario, reduciendo así el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson.<sup>253</sup> Por otro lado, en un trabajo de investigación publicado en 2013 se demostró que podrían presentar efectos positivos sobre personas con obesidad.<sup>254</sup>

## 2.3. Fuentes naturales de secoiridoides

Los secoiridoides están ampliamente distribuidos en la familia Oleaceae. Se han identificado en diferentes especies de esta familia botánica, como el fresno, el aligustre o el jazmín,<sup>251</sup> así como en el olivo y en el aceite de oliva obtenido del fruto.

Por otro lado, se han aislado compuestos de este tipo a partir de la parte leñosa de la poda del olivo.<sup>18,19</sup> Recientemente se ha estudiado la composición de las aguas residuales generadas en las almazaras durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen, como posible fuente de recuperación de secoiridoides.<sup>255</sup>

A continuación se presenta más en detalle la descriptiva del olivo y del aceite de oliva, ya que, son objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

### 2.3.1. Olivo

#### Descriptiva general

El olivo, conocido con el nombre botánico de *Olea europaea* L., pertenece a la familia Oleaceae. Esta familia está compuesta por 25 géneros y casi 600 especies repartidas ampliamente por todo el mundo, exceptuando las zonas frías del hemisferio norte.<sup>256</sup> El género *Olea* reúne unas 20 especies<sup>69</sup> entre las que destaca el olivo, la cual presenta gran interés por su impacto económico. Pero existen otras especies muy interesantes desde el punto de vista de la industria maderera, como los fresnos (*Fraxinus*), u ornamental, como el jazmín (*Jasminum*) o el aligustre (*Ligustrum*) (**Tabla 2.1**).<sup>256</sup>

**Tabla 2.1.** Clasificación botánica de la especie *Olea europaea* L.

| Orden           | Familia          | Género      | Especie         |
|-----------------|------------------|-------------|-----------------|
| Gentianales     | <u>Oleaceae</u>  | Fraxinus    | aquifolium      |
| Solanales       | Plantaginaceae   | Jasminum    | chrysophylla    |
| Boraginales     | Scrophulariaceae | Ligustrum   | <u>europaea</u> |
| <u>Lamiales</u> | Orobanchaceae    | <u>Olea</u> | ferruginea      |
|                 | Bignoniaceae     | Phillyrea   | fragnans        |
|                 | Acanthaceae      | Syringa     | gallica         |
|                 | Pedaliaceae      |             | lancifolia      |
|                 | Lentibulariaceae |             | laperrini       |
|                 | Verbenaceae      |             | officinarum     |
|                 | Avicenniaceae    |             | sativa          |
|                 | Lamiaceae        |             | verrucosa       |
|                 | Myoporaceae      |             |                 |

Se conocen 6 subespecies de *Olea europaea* L. con características morfológicas similares, pero áreas de distribución excluyentes. Éstas son: *O. europaea* subsp. *europaea* (Cuenca del Mediterráneo y algunas zonas atlánticas del suroeste de Europa), *O. europaea* subsp. *laperrinei* (Altas montañas del Sáhara), *O. europaea* subsp. *cuspidata* (sur y este de África, Península Arábigas y Asia Central), *O. europaea* subsp. *guanchica* (Islas Canarias), *O. europaea* subsp. *cerasiformis* (Isla de Madeira) y *O. europaea* subsp. *maroccana* (Montañas de Agadir, Marruecos).<sup>256</sup>

De la subespecie *europaea* se distinguen 2 grupos: *O. europaea* subs. *europaea* var. *europaea* (= *O. europaea* subs. *europaea* var. *sativa*), que presenta tallos no espinosos y hojas largas y engloba a todas aquellas variedades destinadas al cultivo, y *O. europaea* subs. *europaea* var. *sylvestris* (= *O. europaea* subs. *europaea* var. *oleaster*) con tallos más tortuosos, hojas más cortas y fruto más pequeño y que recoge los designados como olivos silvestres o acebuches.<sup>257</sup>



El olivo es un arbusto o árbol perenne que puede llegar hasta los 10 m, de troncos gruesos y tortuosos y de ramas jóvenes con corteza grisácea. Las hojas tienen una dimensión de 15–70 x 4–15 mm, forma oblongolanceolada, elíptica u obovada y de haz verde oscuro y envés grisáceo. Las flores de 5–7 mm aparecen durante la primavera en pequeños racimos más cortos que las hojas. El fruto, una drupa con forma elipsoidal de unas dimensiones de 8–20 mm, de color verde al inicio y negruzco tras la maduración (*Imagen 2.1*).<sup>257</sup>



*Imagen 2.1. Olea europaea L.*

### **Cultivo y variedades**

El olivo es uno de los primeros árboles frutales cultivados por el hombre y ha constituido un pilar fundamental para la sociedad a lo largo de la Historia. Su lugar de origen es incierto aunque se sitúa en Oriente Medio, hace 6.500 años, durante el periodo conocido como la Edad de Cobre<sup>258,259</sup> y, a partir de aquí, se extendió por toda la cuenca del Mediterráneo. En España, el comienzo se sitúa hace 3.000 años durante el Imperio Romano. La llegada del olivo a América fue posterior, concretamente en el siglo XVI, con el surgir de los viajes de colonizadores españoles hacia esas tierras, los cuales transportaron semillas hasta Perú. Desde aquí, el cultivo se extendió primero hasta países próximos de América del Sur, y más tarde, hasta México. Los Padres Franciscanos fueron los encargados de llevar este árbol hasta California e iniciar la

producción de aceite una década después.<sup>260</sup> Más recientemente, en el siglo XIX, ha sido introducido en Australia y de aquí a China y Japón. Actualmente se sabe que las numerosas variedades distribuidas por todo el mundo tienen su origen en el olivo silvestre mediterráneo o acebuche.<sup>261</sup>

Su hábitat se encuentra en aquellos territorios con influencia del clima mediterráneo, caracterizado por inviernos suaves y veranos secos y calurosos. En todo el mundo, más de 11.500.000 hectáreas repartidas en 58 países se dedican al cultivo del olivo. Europa, con un 54% se sitúa en primer lugar, seguidas de África (30%) y Asia (12%). En España se dedican 2.623.000 ha a este cultivo que producen casi 7.000.000 de toneladas de fruto. El 91.7% se destina para producción de aceite y el 8.3% a aceituna de mesa. El 60% de la superficie se encuentra en Andalucía, colocándose como el mayor productor mundial de aceite de oliva y aceituna de mesa. En Jaén, se producen 1.650.000 t de aceituna en 577.000 ha, destinadas principalmente a la producción de aceite de oliva (99.97%).<sup>262</sup>

La selección llevada a cabo durante siglos por cientos de agricultores, o debido a factores climáticos, ha inducido cambios genéticos y ha dado lugar a más de 2.000 variedades en todo el mundo. En España se conocen 262 variedades aproximadamente entre las que destacan por extensión las variedades 'Picual', 'Cornicabra' y 'Hojiblanca'.<sup>263</sup> En España, y concretamente en Jaén, 'Picual' es la variedad por excelencia. Se conocen otras muchas variedades, como 'Alfajara', 'Arbequina', 'Frantoio', 'Picudo', 'Kalamon' o 'Koroneiki', entre otras.<sup>264</sup>

### **Aplicaciones y actividad biológica**

El olivo ha sido cultivado desde tiempos inmemoriales en todas las zonas templadas del planeta y, en especial, en la cuenca del Mediterráneo, debido al interés que presenta su fruto, la aceituna. Ésta se puede consumir en fresco, tras una maceración con salmuera o en presencia de hidróxido de sodio. Sin embargo, el principal interés de su cultivo es la producción del aceite vegetal que se obtiene a partir del fruto. Esta grasa, líquida a temperatura ambiente debido a su alta concentración en ácidos grasos insaturados, es muy apreciada en cocina.<sup>69</sup> Por otro lado, la madera de olivo tiene aplicación en ebanistería y como combustible.

Otras partes del olivo también han sido empleadas tradicionalmente para combatir diferentes dolencias. El aceite procedente de la semilla, tomado de forma oral, actúa como laxante y se aplica como bálsamo en zonas de la piel que presentan inflamación. Al extracto obtenido a partir de la hoja se le han atribuido numerosas propiedades beneficiosas en el tratamiento de problemas intestinales, cardiovasculares, respiratorios, inflamatorios, de diabetes o infecciones causadas por bacterias en diferentes partes del cuerpo, como tracto urinario, ojos o boca. Infusiones de corteza han sido utilizadas en el sur de África para tratar infecciones causadas por la tenia. El aceite esencial obtenido a partir de la hoja se ha empleado para combatir el constipado y los dolores en el hígado. El aceite de oliva, aparte de su interés como alimento, ha sido usado como laxante y vermicida, antiinflamatorio o para prevenir la pérdida de cabello. Además, mezclado con zumo de limón es útil para tratar problemas causados por cálculos biliares. Por último, el aceite esencial obtenido a partir del fruto ha sido empleado para aliviar problemas de litiasis renal.<sup>260</sup>

### **Composición química**

A continuación se revisa la composición química del olivo y sus órganos, haciendo hincapié en los componentes no volátiles.

#### ***Fracción volátil***

La fracción volátil de *O. europaea* L. está poco estudiada. Se han encontrado algunos artículos en los que se estudia la composición del hidrodestilado obtenido a partir de las hojas<sup>265-270</sup> y el fruto<sup>268,271</sup>. También se ha caracterizado la fracción volátil obtenida a partir de la hoja de olivo silvestre.<sup>272</sup> Además, se han identificado volátiles emitidos por las hojas.<sup>273</sup> La fracción volátil de la madera de olivo se ha estudiado escasamente.<sup>274,275</sup>

### ***Fracción no volátil***

#### ➤ **Compuestos fenólicos**

La revisión se ha centrado en los compuestos fenólicos y se va a presentar dividida en cinco subgrupos: (a) fenoles simples, aldehídos fenólicos y alcoholes fenólicos; (b) ácidos fenólicos y derivados; (c) derivados glicosilados mixtos; (d) iridoides y secoiridoides; (e) flavonoides.

- ***Fenoles simples, aldehídos fenólicos y alcoholes fenólicos***

Se ha identificado un único compuesto con esqueleto C<sub>6</sub>, el catecol, en hoja y fruto de olivo.<sup>276,277</sup> También se ha descrito vainillina, un fenol aldehídico, en flor,<sup>278</sup> fruto,<sup>279,280</sup> hoja<sup>281,282</sup> y madera<sup>282,283</sup>.

Alcoholes fenólicos como tirosol, hidroxitirosol o derivados glicosilados de éstos han sido caracterizados en flor,<sup>278</sup> diferentes partes del fruto,<sup>278,284,285</sup> hoja<sup>282,286,287</sup> y madera.<sup>18,19,21,282</sup>

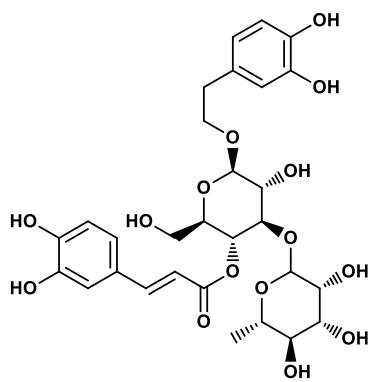
- ***Ácidos fenólicos y derivados***

En la hoja<sup>272,282,286,288</sup> y en distintas partes del fruto<sup>284,288,289</sup> del olivo se han identificado diferentes ácidos fenólicos con esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (ácidos hidroxibenzoicos), como ácido vanílico, siríngico o gálico, entre otros, y C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (ácidos hidroxicinámicos), como los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico, etc.

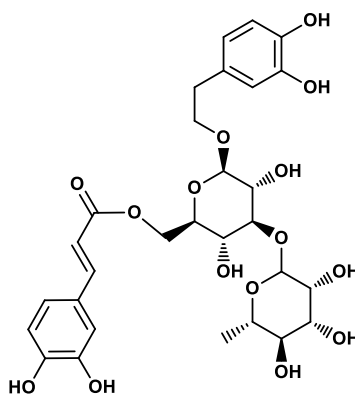
Recientemente, Ammar *et al.*<sup>282</sup> han estudiado el extracto obtenido de la madera empleando una mezcla de metanol/agua, y han identificado mediante la técnica combinada HPLC-MS seis ácidos fenólicos, cuatro de los cuales pertenecen al grupo de los ácidos hidroxibenzoicos y el resto al de los hidroxicinámicos.

- *Derivados glicosilados mixtos*

También se han identificado derivados glicosilados mixtos, como verbascósido (flor<sup>278,290,291</sup>, fruto<sup>278,292-295</sup>, hoja<sup>278,286,296,297</sup>, ramas<sup>282</sup>, madera<sup>282</sup>, raíz<sup>296</sup>) e isoverbascósido (flor<sup>278,290,291</sup>, fruto<sup>292</sup>, hoja<sup>278,296</sup>, ramas<sup>282</sup>, madera<sup>282</sup>, raíz<sup>296</sup>), que son ésteres del ácido cafeico con glucosa, la cual a su vez se encuentra unida a una ramnosa e hidroxitirosol.



Verbascósido



Isoverbascósido

- *Iridoides y secoiridoides*

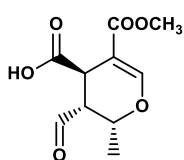
Constituyen el grupo de fenoles más abundante en olivo. Han sido identificadas más de 30 estructuras en este árbol, aunque su concentración depende de la variedad estudiada, factores agronómicos, climatología, etc. En madera se han aislado 12 compuestos de esta familia.<sup>21</sup>

El secoiridoide más simple es el ácido elenólico, y a partir de éste se forman todos los demás (**Tabla 2.2**).

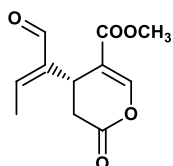
**Tabla 2.2.** Iridoides y secoiridoides identificados en olivo.

| Compuesto                            | Parte de la planta estudiada | Referencia |
|--------------------------------------|------------------------------|------------|
| Ácido elenólico                      | Fruto                        | 294,298    |
|                                      | Hoja                         | 299,300    |
| Ácido logánico                       | Fruto                        | 282        |
|                                      | Hoja                         | 282,296    |
|                                      | Tallo                        | 296        |
|                                      | Madera                       | 282        |
| Ácido 7- <i>epi</i> -logánico        | Fruto                        | 301        |
| 7- <i>epi</i> -Loganina              | Fruto                        | 301        |
|                                      | Hoja                         | 301        |
| 7-Cetologanina                       | Hoja                         | 301        |
| 8- <i>epi</i> -Kingísido             | Fruto                        | 301        |
|                                      | Hoja                         | 301        |
| Loganina                             | Hoja                         | 282,296    |
|                                      | Tallo                        | 296        |
|                                      | Madera                       | 282        |
| Ácido 7-desoxilogánico               | Hoja                         | 282        |
|                                      | Madera                       | 18,282     |
|                                      | Raíz                         | 296        |
| Oleósido                             | Fruto                        | 294,302    |
|                                      | Hoja                         | 282,303    |
|                                      | Tallo                        | 296        |
|                                      | Madera                       | 282        |
|                                      | Corteza                      | 303        |
|                                      | Raíz                         | 296        |
| Oleósido 11-metil éster              | Fruto                        | 304–306    |
|                                      | Hoja                         | 307        |
|                                      | Madera                       | 21         |
| Oleósido dimetil éster               | Hoja                         | 308        |
| 6'- $\beta$ -Glucopiranosil oleósido | Fruto                        | 295,309    |
| 6'- $\beta$ -Ramnopiranosil oleósido | Fruto                        | 295,309    |

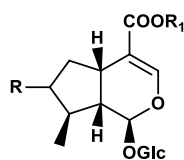
|                                                                    |         |             |
|--------------------------------------------------------------------|---------|-------------|
| Secologanósido                                                     | Fruto   | 306,310     |
|                                                                    | Hoja    | 303,308,311 |
|                                                                    | Tallo   | 296         |
|                                                                    | Corteza | 303         |
|                                                                    | Raíz    | 296         |
| 6'-O-[(2 <i>E</i> -2,6-Dimetil-8-hidroxi-2-octenoi]-secologanósido | Hoja    | 308         |
| Comselogósido                                                      | Fruto   | 292,312     |
|                                                                    | Hoja    | 308,312     |
|                                                                    | Raíz    | 296         |
| Elenólido                                                          | Fruto   | 313         |
|                                                                    | Hoja    | 313         |
|                                                                    | Corteza | 313         |



Ácido elenólico



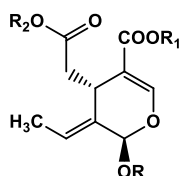
Elenólido



Ácido logánico (R= OH; R<sub>1</sub>=H)

Ácido desoxilogánico (R= H; R<sub>1</sub>= H)

Loganina (R= OH; R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>)



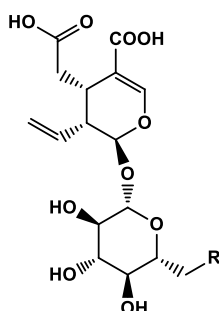
Oleósido (R= Glc; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= H)

Oleósido 11-metil éster (R= Glc; R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>= H)

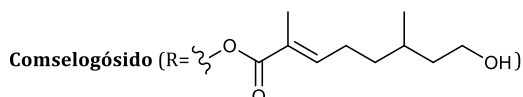
Oleósido dimetil éster (R= Glc; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>)

6'-β-Glucosil oleósido (R= Glc; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>= H)

6'-β-Ramnosil oleósido (R= Ramnósido; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= H)



Secologanósido (R= OH)



Se han identificado glucósidos del ácido logánico mediante la técnica combinada HPLC-MS en madera y hoja,<sup>282</sup> además, de un nuevo derivado del ácido desoxilogánico en el fruto.<sup>314</sup>

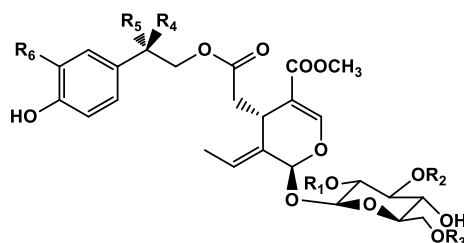
Se han descrito glucósidos secoiridoides en diferentes partes del árbol, como oleuropeína, ligustrósido y derivados de ambos. Estos están constituidos por un secoiridoide, normalmente ácido elenólico, unido a una molécula de hidroxitirosol o tirosol y a una o varias unidades de glucosa. La oleuropeína es el principal secoiridoide en fruto verde y hoja.<sup>315</sup> En madera se ha encontrado oleuropeína y ligustrósido (*Tabla 2.3*).<sup>21</sup>

**Tabla 2.3.** Secoiridoides glucosilados identificados en olivo.

| Compuesto                      | Parte de la planta estudiada | Referencia                      |
|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Oleuropeína                    | Fruto                        | 278,280,285,289,305,309,310,312 |
|                                | Flor                         | 278,291                         |
|                                | Hoja                         | 7,278,286,287,296,300,307,312   |
|                                | Tallo                        | 282,296,316,317                 |
|                                | Madera                       | 18,21,23,24,282                 |
|                                | Raíz                         | 296,316                         |
| Oleuropeína-3'-O-β-D-glucósido | Madera                       | 19                              |



|                                              |         |                 |
|----------------------------------------------|---------|-----------------|
| (2''R)-Hidroxiroleuropeína                   | Flor    | 291             |
|                                              | Madera  | 19,21           |
| (2''S)-Hidroxiroleuropeína                   | Flor    | 291             |
| (2''R)-Etoxiroleuropeína<br>(Lucidumosido C) | Flor    | 291             |
|                                              | Hoja    | 286             |
|                                              | Madera  | 24              |
| (2''S)-Etoxiroleuropeína<br>(Lucidumósido C) | Flor    | 291             |
|                                              | Hoja    | 286             |
|                                              | Madera  | 24              |
| 10-Hidroxiroleuropeína                       | Hoja    | 301             |
|                                              | Fruto   | 301             |
| Ligustrósido                                 | Fruto   | 292,294,305,318 |
|                                              | Flor    | 278,291         |
|                                              | Hoja    | 294,307,319     |
|                                              | Tallo   | 282,296         |
|                                              | Madera  | 18,21,24,282    |
|                                              | Raíz    | 296             |
| Ligustrósido-3'-O-β-D-glucósido              | Madera  | 19              |
| Ligustalósido B                              | Fruto   | 320             |
|                                              | Hoja    | 321             |
| 10-Hidroxiligustrósido                       | Hoja    | 301             |
| Jaspoliósido                                 | Hoja    | 322             |
|                                              | Tallo   | 296             |
|                                              | Madera  | 19,21           |
|                                              | Raíz    | 296             |
| Isojaspoliósido A                            | Madera  | 19,21           |
| Jaspolianósido                               | Semilla | 323             |
|                                              | Madera  | 19,21           |



**Oleuropeína** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$ ;  $R_6=OH$ )

**Oleuropeína-3'-O-β-D-glucósido** ( $R_1=R_3=R_4=R_5=H$ ;  $R_2=glc$ ;  $R_6=OH$ )

**2''-R-Hidroxioluropeína** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$ ;  $R_6=OH$ )

**2''-S-Hidroxioluropeína** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_6=H$ ;  $R_5=OH$ )

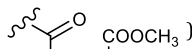
**2''-R-Etoxioleuropeína** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$ ;  $R_6=OCH_2CH_3$ )

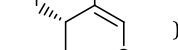
**2''-S-Etoxioleuropeína** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_6=H$ ;  $R_5=OCH_2CH_3$ )

**5''-Metoxioleuropeína** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$ ;  $R_6=OCH_3$ )

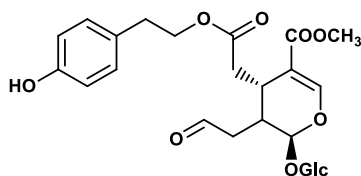
**Ligustrósido** ( $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=H$ )

**Ligustrósido-3'-O-β-D-glucósido** ( $R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=H$ ;  $R_2=glc$ )

**Jaspoliósido** ( $R_1=R_2=R_4=R_5=H$ ;  $R_6=OH$ ;  $R_3=$  )

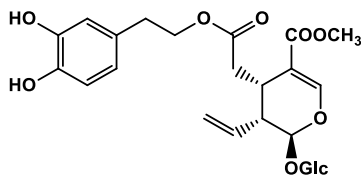
**Isojaspoliósido A** ( $R_2=R_3=R_4=R_5=H$ ;  $R_6=OH$ ;  $R_1=$  )

**Jaspolianósido** ( $R_1=R_2=R_4=R_5=R_6=H$ ;  $R_3=$  )



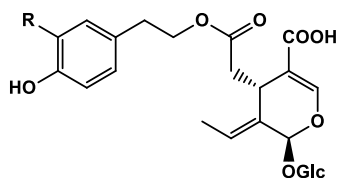
**Ligustalósido B**

Un isómero de la oleuropeína, conocido como oleurósido, ha sido identificado en el fruto,<sup>295,320</sup> en la hoja<sup>286,324,325</sup> y en la corteza<sup>303</sup> de este árbol.



**Oleurósido**

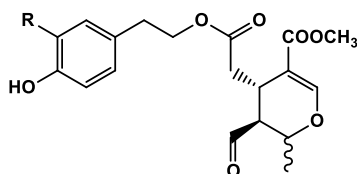
Ragazzi *et al.*<sup>326</sup> fueron los primeros en aislar y caracterizar la estructura de la desmetiloleuropeína a partir de aceituna madura. Más tarde, este compuesto fue identificado en diferentes partes del fruto.<sup>289</sup> Además se demostró que puede ser empleado como marcador para diferenciar variedades, ya que sólo se encuentra en algunas de ellas.<sup>327</sup> Otros autores han confirmado posteriormente su presencia aceituna.<sup>277,278,292,312</sup> También se ha descrito en flor,<sup>278,290</sup> hoja<sup>278,282,296,322</sup> y tallo<sup>282,296</sup>. Desmetilligustrósido, por su parte, sólo ha sido identificado en fruto.<sup>293,328</sup>



**Desmetiloleuropeína (R= OH)**

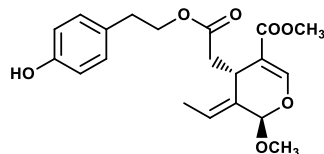
**Desmetilligustrósido (R= H)**

También se han descrito estructuras desglicosiladas, como las formas aldehídicas de la aglucona de oleuropeína, en hoja<sup>319,329</sup> y madera,<sup>20,21</sup> y ligustrósido (ligstral) en fruto,<sup>301</sup> así como el metil acetal del aglicón de ligustrósido en fruto.<sup>330</sup> Además se ha identificado oleaceína en hoja<sup>328,331</sup> y fruto,<sup>293-295</sup> y oleocantal en fruto,<sup>328</sup> dos dialdehídos derivados de la oleuropeína y ligustrósido, respectivamente.

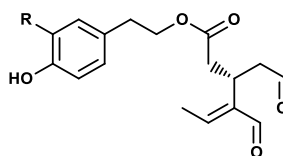


**Forma monoaldehídica de la aglucona de oleuropeína (R= OH)**

**Forma monoaldehídica de la aglucona de ligustrósido (R= H)**



Metil acetal de la aglucona de ligustrósido



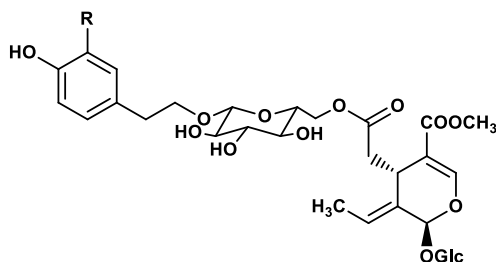
(-)-Oleaceína (R= OH)

(-)-Oleocantal (R= H)

Varios secoiridoides glucosidados constituidos por unidades de glucosa, de ácido elenólico e hidroxitirosol o tirosol, como nuzhenida, neo-nuzhenida y nuzhenida 11-metil oleósido, también se han descrito (**Tabla 2.4**).

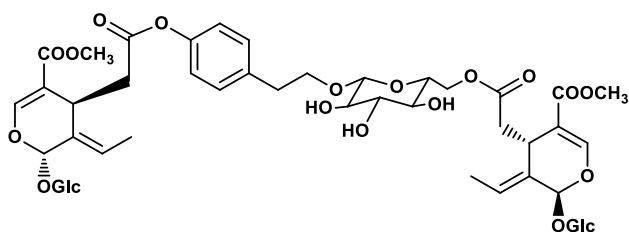
**Tabla 2.4.** Secoiridoides glucosilados identificados en olivo.

| Compuesto                   | Parte de la planta estudiada | Referencia |
|-----------------------------|------------------------------|------------|
| Nuzhenida                   | Fruto                        | 289,294    |
|                             | Semilla                      | 323,332    |
|                             | Flor                         | 278,290    |
|                             | Hoja                         | 303        |
| Neo-nuzhenida               | Fruto                        | 333        |
|                             | Semilla                      | 323        |
| Nuzhenida 11-metil oleósido | Fruto                        | 310        |
|                             | Semilla                      | 323,332    |



Neo-nuzhenida (R= OH)

Nuzhenida (R= H)



Nuzhenida 11-metil oleósido

- *Flavonoides*

En este subapartado se indican los diferentes compuestos correspondientes a la familia de los flavonoides que se han identificado en *O. europaea* L. Éstos se han organizado a su vez en sus diferentes clases: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavan-3-oles y antocianinas.

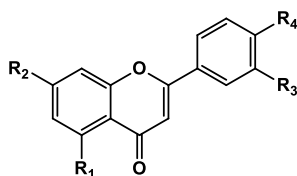
*Flavonas (Tabla 2.5)*

**Tabla 2.5.** Flavonas identificadas en olivo.

| Compuesto                         | Parte de la planta estudiada | Referencia          |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------|
| Apigenina                         | Fruto                        | 278,280,295,334     |
|                                   | Flor                         | 278,291             |
|                                   | Hoja                         | 278,335,336         |
| Apigenina-5- <i>O</i> -glucósido  | Fruto                        | 337                 |
|                                   | Hoja                         | 337                 |
| Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido  | Fruto                        | 278,334             |
|                                   | Flor                         | 278                 |
|                                   | Hoja                         | 278,294,296,338,339 |
|                                   | Ramas                        | 297                 |
| Apigenina-7- <i>O</i> -rutinósido | Fruto                        | 278,334             |
|                                   | Flor                         | 291                 |
|                                   | Hoja                         | 278,294,296         |

*Aislamiento y evaluación de compuestos bioactivos de origen vegetal.  
Contribución a la síntesis de derivados y análogos estructurales*

|                                 |       |                         |
|---------------------------------|-------|-------------------------|
| Apigenina-4'-O-glucósido        | Fruto | 337                     |
|                                 | Hoja  | 337                     |
| Apigenin-4'-O-ramnosilglucósido | Hoja  | 340                     |
| Crisoeriol                      | Fruto | 334                     |
|                                 | Hoja  | 340                     |
| Crisoeriol-7-O-glucósido        | Fruto | 334                     |
|                                 | Hoja  | 321,340                 |
| Diosmetina                      | Fruto | 302                     |
|                                 | Flor  | 278,291                 |
|                                 | Hoja  | 278,296                 |
| Diosmetina-7-O-glucósido        | Hoja  | 322,339                 |
| Luteolina                       | Fruto | 278,280,294,295,302,334 |
|                                 | Flor  | 278,291                 |
|                                 | Hoja  | 278,296,339             |
| Luteolina-7-O-glucósido         | Fruto | 280,289,294,295         |
|                                 | Flor  | 291                     |
|                                 | Hoja  | 321,322,339             |
|                                 | Rama  | 297,341                 |
|                                 | Raíz  | 341                     |
| Luteolina-7-rutinósido          | Fruto | 278,334                 |
|                                 | Flor  | 291                     |
|                                 | Hoja  | 278,296                 |
| Luteolina-4'-O-glucósido        | Fruto | 294,295,309             |
|                                 | Hoja  | 321,342                 |



**Apigenina** ( $R_1=R_2=R_4= \text{OH}$ ;  $R_3= \text{H}$ )

**Apigenina-5-O-glucósido** ( $R_1= O\text{-glc}$ ;  $R_2=R_4= \text{OH}$ ;  $R_3= \text{H}$ )

**Apigenina-7-O-glucósido** ( $R_1=R_4= \text{OH}$ ;  $R_2= O\text{-glc}$ ;  $R_3= \text{H}$ )

**Apigenina-7-O-rutinósido** ( $R_1=R_4= \text{OH}$ ;  $R_2= O\text{-rut}$ ;  $R_3= \text{H}$ )

**Apigenina-4'-O-glucósido** ( $R_1=R_2= \text{OH}$ ;  $R_3= \text{H}$ ;  $R_4= O\text{-glc}$ )

**Apigenina-4'-O-ramnoglucósido** ( $R_1=R_2= \text{OH}$ ;  $R_3= \text{H}$ ;  $R_4= O\text{-ram-O-glc}$ )

**Crisoeriol** ( $R_1=R_2=R_4= \text{OH}$ ;  $R_3= \text{OCH}_3$ )

**Crisoeriol-7-O-glucósido** ( $R_1=R_4= \text{OH}$ ;  $R_2= O\text{-glc}$ ;  $R_3= \text{OCH}_3$ )

**Diosmetina** ( $R_1=R_2=R_3= \text{OH}$ ;  $R_4= \text{OCH}_3$ )

**Diosmetina-7-O-glucósido** ( $R_1=R_3= \text{OH}$ ;  $R_2= O\text{-glc}$ ;  $R_3= \text{OCH}_3$ )

**Luteolina** ( $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OH}$ )

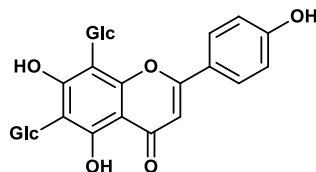
**Luteolina-5-O-glucósido** ( $R_1= O\text{-glc}$ ;  $R_2=R_3=R_4= \text{OH}$ )

**Luteolina-7-O-glucósido** ( $R_1=R_3=R_4= \text{OH}$ ;  $R_2= O\text{-glc}$ )

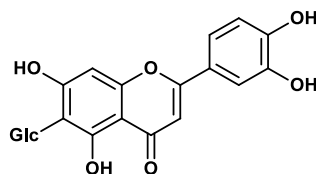
**Luteolina-7-O-rutinósido** ( $R_1=R_3=R_4= \text{OH}$ ;  $R_2= O\text{-rut}$ )

**Luteolina-4'-O-glucósido** ( $R_1=R_2=R_3= \text{OH}$ ;  $R_4= O\text{-glc}$ )

También se han identificado derivados C-glucosídicos en el fruto, como vicenina-2 y homoorientina.<sup>334</sup>



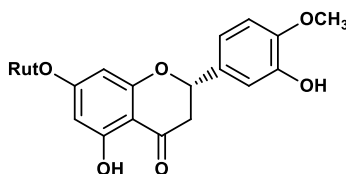
Vicenina-2



homoorientina

### Flavanonas

Únicamente se ha identificado hesperidina en fruto<sup>294</sup>, flor<sup>343</sup> y hoja<sup>294,337</sup> de olivo.



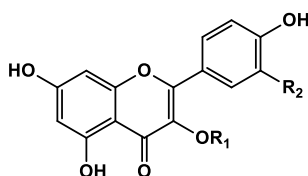
Hesperidina

### Flavonoles

En olivo se ha identificado canferol, quercetina y derivados glicosilados de ésta (**Tabla 2.6**).

**Tabla 2.6.** Flavonoles identificados en olivo.

| Compuesto                                       | Parte de la planta estudiada | Referencia          |
|-------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|
| Canferol                                        | Fruto                        | 276                 |
|                                                 | Hoja                         | 276,344-346         |
|                                                 | Brote                        | 347                 |
|                                                 | Rama                         | 348                 |
| Quercetina                                      | Fruto                        | 276,280,334         |
|                                                 | Hoja                         | 276,345,346         |
|                                                 | Brote                        | 347                 |
|                                                 | Rama                         | 348                 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido               | Fruto                        | 280,334             |
|                                                 | Hoja                         | 321,349             |
| Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido (Quercitrina) | Fruto                        | 295                 |
|                                                 | Hoja                         | 322,340             |
|                                                 | Brote                        | 347                 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido (Rutina)     | Fruto                        | 280,295,334         |
|                                                 | Hoja                         | 321,322,336,342,350 |
|                                                 | Rama                         | 341                 |
|                                                 | Raíz                         | 341                 |



**Canferol** ( $R_1=R_2=H$ )

**Quercetina** ( $R_1=H$ ;  $R_2=OH$ )

**Quercetina-3-*O*-glucósido** ( $R_1=O\text{-}glc$ ;  $R_2=H$ )

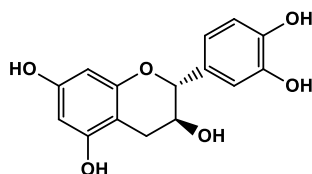
**Quercetina-3-*O*-ramnósido** ( $R_1=O\text{-}ram$ ;  $R_2=H$ )

**Quercetina-3-*O*-rutinósido** ( $R_1=O\text{-}rut$ ;  $R_2=H$ )



### Flavan-3-oles

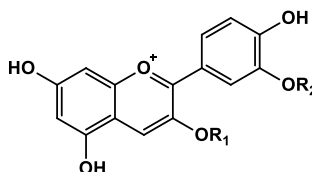
Se ha identificado el compuesto (+)-catequina en fruto <sup>276</sup>, hoja <sup>276</sup>, tallo <sup>341</sup> y raíz <sup>341</sup>.



(+)-Catequina

### Antocianinas

Las antocianinas son los compuestos responsables del color morado del fruto del olivo y su concentración va aumentando a medida que éste madura.<sup>351</sup> Las más abundantes encontradas en el fruto<sup>352-354</sup> son cianidina-3-*O*-glucósido y cianidina-3-*O*-rutinósido, habiéndose detectado ambas también en hoja.<sup>355</sup> Además, en hoja también se ha identificado peonidina-3-*O*-rutinósido.



**Cianidina-3-*O*-glucósido** ( $R_1 = O\text{-glc}$ ;  $R_2 = H$ )

**Cianidina-3-*O*-rutinósido** ( $R_1 = O\text{-rut}$ ;  $R_2 = H$ )

**Peonidina-3-*O*-rutinósido** ( $R_1 = O\text{-rut}$ ;  $R_2 = CH_3$ )

Aparte de todas estas moléculas, se han descrito también compuestos de la familia de los triterpenoides pentacíclicos en diferentes partes del olivo, cuya revisión se presenta en el apartado 3.3.1.

### **2.3.2. Aceite de oliva**

#### **Descriptiva general**

El aceite de oliva es una mezcla de composición principalmente lipídica y líquida a temperatura ambiente, obtenida a partir del fruto del olivo (*Olea europaea* L.). El fruto recolectado en el campo se transporta hasta las almazaras donde sufre diferentes procesos hasta que se obtiene el apreciado aceite. En primer lugar, se limpia de restos no deseados que lo puedan acompañar, generando como subproductos ramas y hojas, por un lado, y rocas y tierra por otro. Dependiendo de su procedencia puede necesitar, además, un lavado con agua caliente para eliminar restos de barro. Posteriormente, es triturado y la masa resultante, batida durante 30–45 minutos a no más de 28 °C para favorecer la agrupación de las gotas de aceite, lo cual facilita su extracción. A continuación, la mezcla de pulpa, piel, agua de vegetación y aceite es separada empleando, generalmente, centrifugadoras. En esta etapa se originan como subproductos orujo (restos sólidos) y alpechín (restos líquidos), aunque dependiendo del sistema de extracción que se emplee ambos residuos se pueden obtener conjuntamente como alperujo. Finalmente, se obtiene el aceite.

Aunque se conocen ocho tipos de aceite, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas, sólo 3 se obtienen en las almazaras, 3 en las refinerías y el resto tras la mezcla entre algunos de ellos. Los aceites de oliva vírgenes, obtenidos en la almazara y empleando únicamente procedimientos mecánicos, pueden ser: Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE), Aceite de Oliva Virgen (AOV) o Aceite de Oliva Virgen Lampante (AOVL). Por otro lado, a partir del orujo, mediante una extracción con disolventes orgánicos es posible conseguir el Aceite de Orujo de Oliva Crudo (AOOC). Éste y el AOVL son refinados para eliminar malos olores y sabores que los hacen no aptos para el consumo humano. Tras ello se obtiene el Aceite de Oliva Refinado (AOR) y el Aceite de Orujo de Oliva Refinado (AORR), los cuales son mezclados con un 10–15% de AOV para producir el Aceite de Oliva (AO) y el Aceite de Orujo de Oliva (AORR) (**Figura 2.2**). De los ocho tipos de aceites, solo AOVE, AOV, AO y AOR (ordenados de mayor a menor calidad) son considerados como categorías comerciales<sup>356</sup> y, por lo tanto, se pueden encontrar a la venta en tiendas. En este sentido es importante destacar

que los dos primeros presentan una considerable mayor calidad que el resto, por obtenerse directamente del fruto mediante procedimientos mecánicos, siendo el AOVE el mejor de todos.

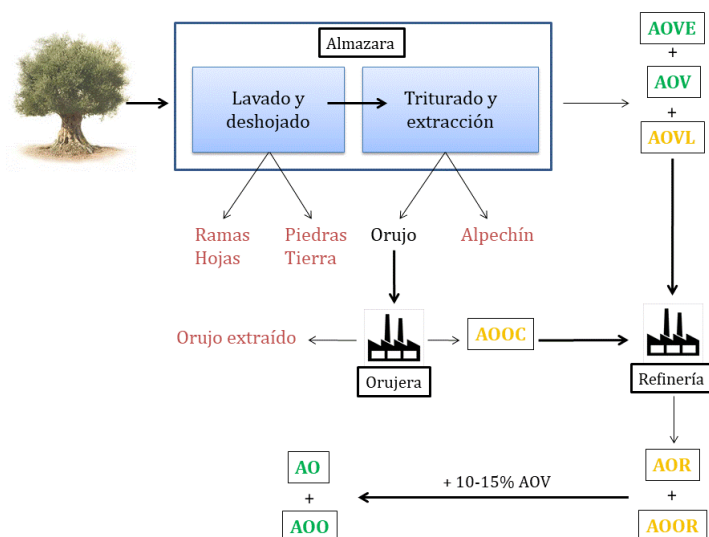


**Figura 2.2.** Proceso de obtención de los diferentes aceites: Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE), Aceite de Oliva Virgen (AOV), Aceite de Oliva Lampante (AOL), Aceite de Orujo de Oliva Crudo (AOOC), Aceite de Oliva Refinado (AOR), Aceite de Orujo de Oliva Refinado (AORR), Aceite de Oliva (AO) y Aceite de Orujo de Oliva (AORR). Se indican los aceites considerados como categorías comerciales (verde) y, por lo tanto, se pueden encontrar de venta en tiendas, y aquellos que necesitan ser procesados para poder ser puestos a la venta (amarillo), así como los diferentes residuos que se van generando durante el proceso y que pueden ser susceptibles de aprovechamiento (rojo).

Desde el punto de vista de su composición química, el aceite de oliva ha sido ampliamente estudiado, aún más en los últimos años, debido a que se han puesto de manifiesto numerosas propiedades beneficiosas para la salud humana.

El aceite en el fruto se encuentra repartido entre la pulpa (95%) y la semilla (5%)<sup>357</sup> y puede ir desde el color verde intenso, debido a la alta concentración en clorofilas, hasta el amarillo dorado, con alta concentración en carotenoides,

dependiendo de diferentes factores como variedad, época de recolección y procedimiento de extracción empleado.<sup>358</sup>

### **Aplicaciones y actividad biológica**

Numerosos estudios científicos han puesto de manifiesto las propiedades beneficiosas que presenta el aceite para la salud de las personas. Varios estudios han revelado que la “dieta mediterránea”, la cual emplea AOV y AOVE como principal fuente de grasa, está estrechamente relacionada con la reducción de casos de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer.<sup>315</sup>

Su alto contenido en ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado, disminuye la incidencia de enfermedades coronarias en personas que consumen habitualmente esta grasa vegetal. Algunos autores sostienen que esto puede ser debido al efecto que ejerce este compuesto sobre la reducción de los niveles de colesterol unido a las proteínas de baja densidad, denominadas “Low Density Lipoprotein” (LDL) o lo que se conoce comúnmente como “colesterol malo”.<sup>359</sup> Además, provoca una disminución de la presión arterial<sup>360</sup> y reduce el riesgo de sufrir un derrame cerebral.<sup>361</sup>

Como se ha comentado en el apartado anterior, el 1–2% del aceite de oliva está constituido por lo que se denominan compuestos minoritarios. Entre ellos se encuentran moléculas de diferente naturaleza, como secoiridoides, esteroides, lignanos, tocoferoles o hidrocarburos, entre otros. Éstos presentan numerosas propiedades biológicas, como antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antitumorales, etc.<sup>315</sup> Numerosos trabajos científicos se han llevado a cabo demostrando sus efectos terapéuticos sobre enfermedades que afectan a la población.<sup>9,362–366</sup>

### **Composición química**

A continuación se recoge la información encontrada acerca de la composición química del aceite de oliva, dividida en fracción volátil y no volátil, y organizada por familias de compuestos.

### ***Fracción volátil***

La fracción volátil del aceite de oliva ha sido ampliamente estudiada.<sup>367-375</sup> Se han identificado más de 300 compuestos volátiles de diferente naturaleza, como aldehídos, ésteres, alcoholes, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, éteres y cetonas, además de derivados de tiofeno y furano. Los que se han encontrado en mayor concentración son hexenal, *E*-hexen-2-al, hexan-1-ol y 3-metilbutanol.

### ***Fracción no volátil***

El aceite de oliva es una mezcla compleja de compuestos, formada principalmente por ácidos grasos, generalmente en forma de ésteres de glicerol, que constituyen lo que se denomina la fracción saponificable del aceite (98-99%).<sup>376</sup> En torno al 75% de esos ácidos grasos son monoinsaturados, principalmente ácido oleico, en torno al 10% son poliinsaturados (ácido linoleico) y el resto son saturados (ácido palmítico y esteárico) (**Tabla 2.7**).<sup>377</sup>

**Tabla 2.7.** Composición (%) de ácidos grasos en muestras de aceite de oliva.<sup>377</sup>

| Ácido graso                       | % en aceite de oliva |
|-----------------------------------|----------------------|
| Mirístico (C14:0) <sup>a</sup>    | 0.0-0.04             |
| Palmítico (C16:0) <sup>a</sup>    | 9.5-19.0             |
| Palmitoléico (C16:1) <sup>b</sup> | 0.60-2.5             |
| Margárico (C17:0) <sup>a</sup>    | 0.0-0.10             |
| Margaroléico (C17:1) <sup>b</sup> | 0.06-0.21            |
| Esteárico (C18:0) <sup>a</sup>    | 1.61-4.15            |
| Oléico (C18:1) <sup>b</sup>       | 55.3-79.9            |
| Linoléico (C18:2) <sup>c</sup>    | 4.40-18.0            |
| Linolénico (C18:3) <sup>c</sup>   | 0.24-0.71            |
| Araquídico (C20:0) <sup>a</sup>   | 0.23-0.45            |
| Eicosenóico (C20:1) <sup>b</sup>  | 0.09-0.42            |
| Behénico (C22:0) <sup>a</sup>     | 0.03-0.22            |
| Lignocérico (C24:0) <sup>a</sup>  | 0.0-0.16             |

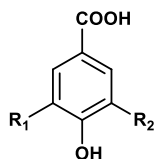
<sup>a</sup> Saturados; <sup>b</sup> Monoinsaturados; <sup>c</sup> Poliinsaturados.

➤ **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos del aceite de oliva han sido ampliamente estudiados. Muestra de ello son las diversas revisiones bibliográficas que se han publicado al respecto.<sup>378-382</sup> Es importante destacar que estos compuestos se pierden durante el proceso de refinado, por lo que solo están presentes en aceites de oliva vírgenes (AOVE y AOV). Los compuestos fenólicos afectan fuertemente a las propiedades organolépticas del aceite y son los responsables del sabor amargo, astringente y picante. Además, debido a su naturaleza antioxidante, aportan estabilidad al aceite lo que prolonga su vida útil y retrasa su enranciamiento.<sup>382</sup> Para facilitar su descripción se han agrupado en subgrupos ácidos fenólicos y derivados, alcoholes fenólicos, secoiridoides, lignanos, flavonoides y otros compuestos, que recogen aquellos que no pertenecen a ninguno de los grupos anteriores.

- *Ácidos fenólicos, fenilpropanoides y derivados*

Se han identificado 7 compuestos fenólicos con estructura C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>: el ácido benzoico<sup>383,384</sup> y 6 ácidos derivados de éste (ácidos *p*-hidroxibenzoico<sup>384,385</sup>, gálico<sup>384</sup>, protocatéquico<sup>384</sup>, sirínico<sup>298,385</sup>, sinápico y vanílico<sup>298,384-386</sup>). Con esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> se han identificado los ácidos 3- y 4-hidroxifenilacético<sup>387</sup> y homovanílico.<sup>388</sup> También con esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> se han encontrado 5 ácidos fenólicos: cafeico<sup>384,385</sup>, cinámico<sup>385</sup>, *o*-cumárico<sup>384</sup>, *p*-cumárico<sup>298,384-386</sup> y ferúlico<sup>298,384,385</sup>, y un derivado del ácido fenilacético (4-(acetoxietil)-1,2-dihidroxibenceno).<sup>385</sup>



Ác. benzoico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = H$ )

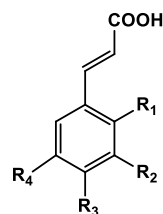
Ác. *p*-hidroxibenzoico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = H$ )

Ác. gálico ( $R_1 = OH$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = OH$ )

Ác. protocatéquico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = OH$ )

Ác. siríngico ( $R_1 = OCH_3$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = OCH_3$ )

Ác. vanílico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = OCH_3$ )



Ác. cafeico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = H$ )

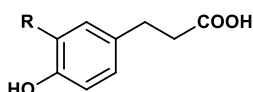
Ác. cinámico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = H$ ;  $R_4 = H$ )

Ác. *o*-cumárico ( $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = H$ ;  $R_4 = H$ )

Ác. *p*-cumárico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = H$ )

Ác. ferúlico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = H$ )

Ác. sinápico ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = OCH_3$ )



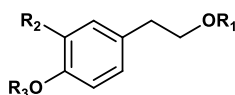
Ác. 3-hidroxifenilacético ( $R = H$ )

Ác. 4-hidroxifenilacético ( $R = OH$ )

Ác. homovanílico ( $R = OCH_3$ )

- *Alcoholes fenólicos*

Estos compuestos se forman por hidrólisis de los secoiridoides que están presentes en el aceite de oliva. Su concentración en aceites frescos es generalmente baja y aumenta durante el tiempo de almacenamiento.<sup>389-391</sup> Se han identificado libres (hidroxitirosol<sup>385,392-396</sup>, tirosol<sup>385,392-396</sup> y alcohol homovanílico<sup>386,395</sup>) o con algunos de sus grupos hidroxilos glucosilados.<sup>397</sup>



Tirosol ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = H$ )

Hidroxitirosol ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = H$ )

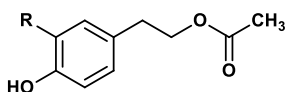
Alcohol homovanílico ( $R_1 = OH$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = H$ )

Hidroxitirosol-1-*O*-β-D-glucósido ( $R_1 = O\text{-glc}$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = H$ )

Hidroxitirosol-5-*O*-β-D-glucósido ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = O\text{-glc}$ ;  $R_3 = H$ )

Hidroxitirosol-6-*O*-β-D-glucósido ( $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = O\text{-glc}$ )

El hidroxitirosol-1-*O*- $\beta$ -D-glucósido ha sido identificado en aceite por varios autores.<sup>310,397-399</sup> Sin embargo, el resto de glucosilados solo han sido identificados por Bianco *et al.*<sup>397</sup> También se ha identificado hidroxitirosol y tirosol acetilados.<sup>385,395,396,400</sup>



Acetato de hidroxitirosilo (R= OH)

Acetato de tirosilo (R= H)

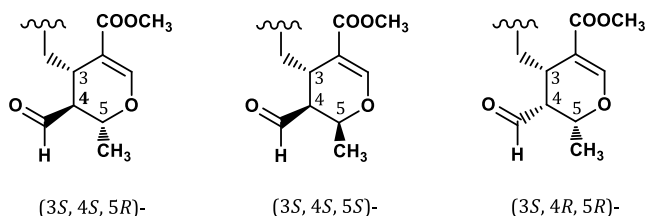
Además, Brenes *et al.*<sup>401</sup> en un trabajo llevado a cabo sobre composición fenólica de aceites destinados a refinado, en particular los denominados como “aceites de segunda centrifugación”, identificaron 4-etilfenol.

- *Secoiridoides y derivados*

El grupo de los secoiridoides representan la fracción más importante de compuestos fenólicos presentes en el aceite. Los secoiridoides y sus derivados, junto con tirosol, hidroxitirosol y sus derivados, constituyen el 87-92% de los compuestos fenólicos del AOVE y AOV.<sup>402</sup> Estos compuestos han sido ampliamente estudiados en numerosos trabajos sobre composición de aceite de oliva. En este apartado se citan sólo algunos de ellos.

Durante la obtención del aceite de oliva ocurren complejos procesos enzimáticos catalizados por la enzima  $\beta$ -glucosidasa, concretamente durante la etapa de la molienda del fruto y posterior batido de la masa resultante.<sup>389,403</sup> Como consecuencia de ello, en primer lugar se generan los aglucones de oleuropeína<sup>393,395,404</sup> y ligustrósido,<sup>393,395,404</sup> e inmediatamente después, debido a la baja estabilidad de estas moléculas en el medio,<sup>403</sup> se producen cambios estructurales que dan lugar a otros isómeros.<sup>395,405</sup> Se encuentran en mayor cantidad aquellos que presentan el heterociclo cerrado, como las formas monoaldehídicas de ambos secoiridoides<sup>394,396,406</sup> al ser más estables.





Una aglucona de este tipo fue aislada por primera vez a partir de aceite de oliva de la variedad ‘Moraiolo’ por Montedoro *et al.*<sup>406</sup> y, posteriormente, otros autores lo han confirmado.<sup>386,407</sup> Más tarde, la técnica combinada HPLC–RMN ha permitido identificar 3 diastereoisómeros derivados de la oleuropeína y otros 3 correspondientes al ligustrósido,<sup>393,395</sup> siendo el (3*S*, 4*S*, 5*R*) mayoritario.

También se han identificado aglucones con el heterociclo abierto, aunque en baja concentración, como son las formas enol-aldehídicas (oleomisional y oleokoronal)<sup>394,407–409</sup> y dialdehídicas (oleuropeindial y ligustrodial)<sup>394,409</sup> (**Figura 2.3**).

En un trabajo publicado en 2015 por Diamantakos *et al.*<sup>409</sup> se caracterizaron por RMN dos diastereoisómeros dialdehídicos de cada una de las agluconas de ambos secoiridoides, oleuropeindial y ligustrodial. No se ha identificado oleuropeína, ligustrósido, desmetiloleuropeína o desmetilligustrósido en esa muestra, ya que, su alta solubilidad en agua provoca que sean arrastrados por la fase acuosa durante el proceso de extracción.<sup>395</sup> Sin embargo, sí se han identificado en las aguas residuales procedentes del proceso de obtención del aceite, lo que justifica este hecho.<sup>410</sup>

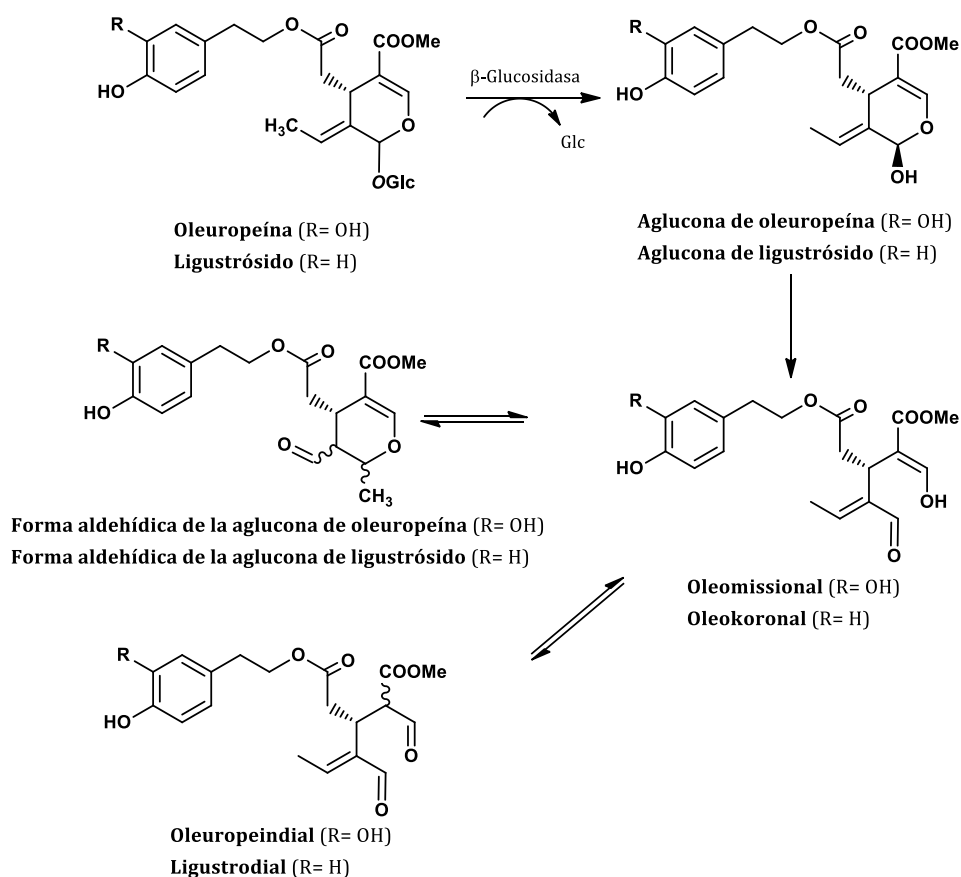


**Figura 2.3.** Formación de derivados de oleuropeína y ligustrósido durante el proceso de elaboración del aceite de oliva.

Otros dos derivados de los secoiridoides encontrados en el aceite, en una concentración relativamente alta, son oleaceína<sup>386,404,406,411</sup> y oleocantal,<sup>386,404,406,411</sup> también denominados como formas dialdehídicas descarboximetiladas de la aglucona de oleuropeína y ligustrósido, respectivamente. Su origen está asociado al proceso enzimático comentado anteriormente y se han propuesto dos posibles rutas, ambas con una forma dialdehídica común, si bien una partiría de oleuropeína o ligustrósido,<sup>403</sup> y la otra lo haría a partir de desmetiloleuropeína y desmetilligustrósido (**Figura 2.4**).<sup>410</sup>

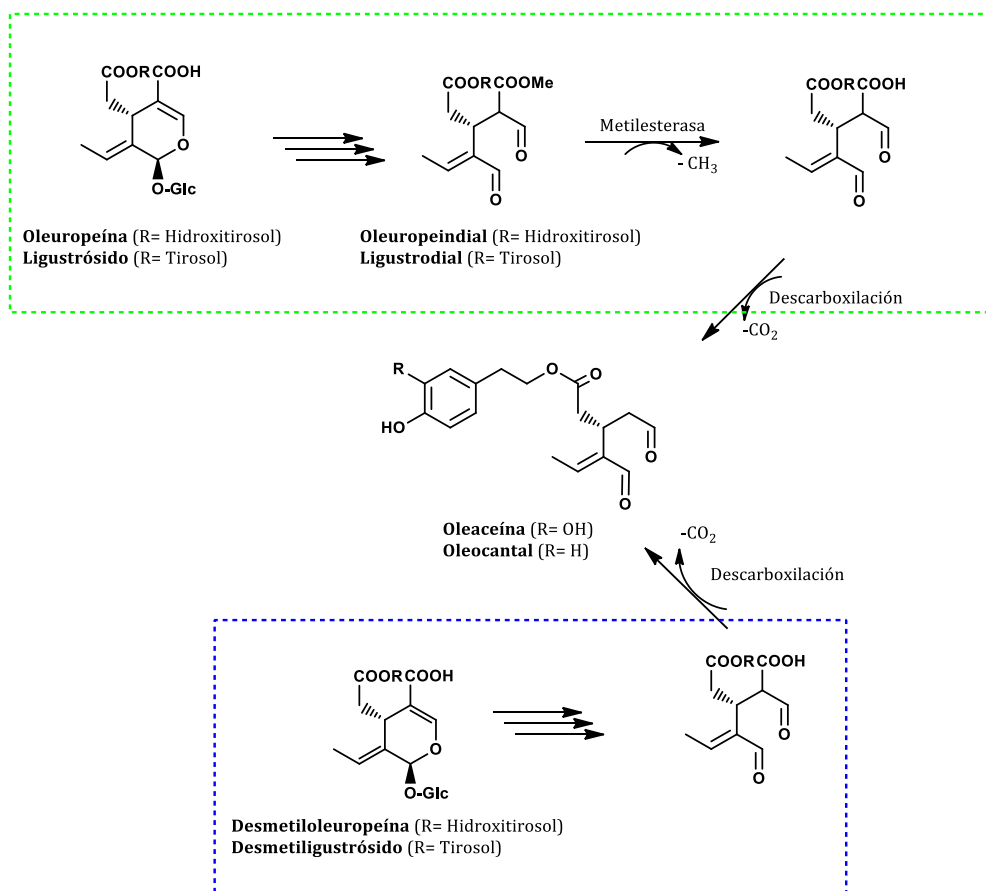
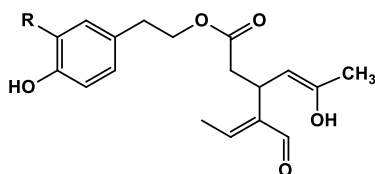


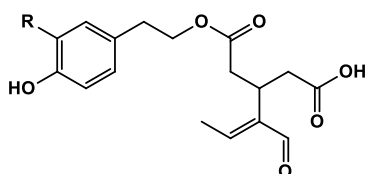
**Figura 2.4.** Rutas propuestas (recuadradas en verde y azul) para la formación enzimática de oleaceína y oleocantal durante el proceso de elaboración del aceite de oliva.

También se han identificado otros compuestos minoritarios derivados de los anteriores, como las formas hemiacetálicas de oleaceína y oleocantal<sup>395,406</sup> o los aislados por Angelis *et al.*<sup>411,412</sup> que presentan un ácido carboxílico en su estructura (ácidos oleuropeínico y oleocantálico) y proceden de oxidaciones que tienen lugar durante el proceso.



**Forma hemiacetálica de la oleaceína** (R= OH)

**Forma hemiacetálica del oleocantal** (R= H)

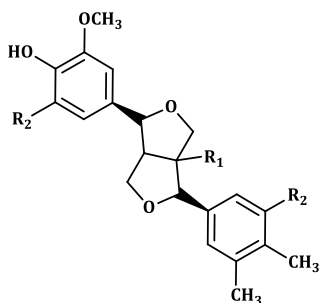


**Ácido oleuropeínico** (R= OH)

**Ácido oleocantálico** (R= H)

- *Lignanos*

Se han identificado cuatro compuestos pertenecientes a la familia de los lignanos: (+)-1-acetoxipinoresinol,<sup>395,413-416</sup> (+)-pinoresinol,<sup>393,395,396,414-416</sup> (+)-1-hidroxipinoresinol<sup>396,415,416</sup> y siringaresinol<sup>395,416</sup>. El 1-acetoxipinoresinol ha sido empleado para diferenciar el aceite procedente de la variedad 'Picual' de los obtenidos a partir de otras variedades.<sup>413</sup>



**(+)-Pinoresinol** (R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= H)

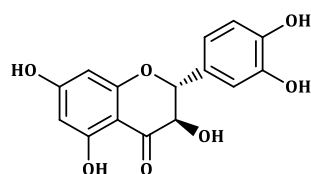
**(+)-1-Acetoxipinoresinol** (R<sub>1</sub>= COOMe; R<sub>2</sub>= H)

**(+)-1-Hidroxipinoresinol** (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H)

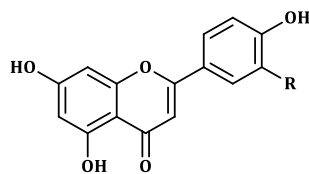
**Siringaresinol** (R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>)

- *Flavonoides*

Se han identificado tres compuestos de la familia de los flavonoides en el aceite de oliva, concretamente dos flavonas (apigenina<sup>393,395,415</sup>, luteolina<sup>393,395,415</sup>) y un flavonol ((+)-taxifolina<sup>415</sup>).



**(+)-Taxifolina**

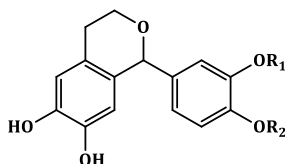


**Apigenina** (R= OH)

**Luteolina** (R= H)

- *Hidroxi-isocromanos*

Este tipo de compuestos fueron identificados por primera vez en aceite de oliva por Bianco *et al.* y se forman debido a la reacción entre el hidroxitirosol y un aldehído aromático (vanilina, benzaldehído).<sup>417</sup> Se han identificado las dos moléculas que se indican a continuación moléculas.<sup>417,418</sup>

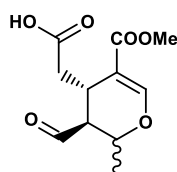


**1-fenil-6,7-dihidroisocromano** (R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= H)

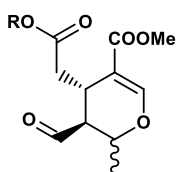
**1-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-6,7-dihidroisocromano** (R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= H)

- *Otros compuestos*

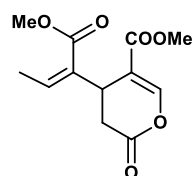
También han sido identificados dos diastereoisómeros del ácido elenólico<sup>395,419</sup>, así como de cada uno de sus derivados, el metiléster<sup>395,419</sup> y etiléster<sup>395,419</sup>. Aunque estos compuestos no se consideran secoiridoides, se generan a partir de los mismos, debido a la hidrólisis del éster que tiene lugar en el aceite, lo cual da lugar a un alcohol fenólico (tirosol o hidroxitirosol) y ácido elenólico. Un estudio más reciente ha puesto de manifiesto la presencia de un nuevo compuesto denominado elenólido. Estos autores sostienen que este compuesto se transforma en ácido elenólico durante el almacenamiento, si existe presencia de agua.<sup>420</sup>



**Ác. elenólico**



**Elenolato de metilo** (R= CH<sub>3</sub>)  
**Elenolato de etilo** (R= CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

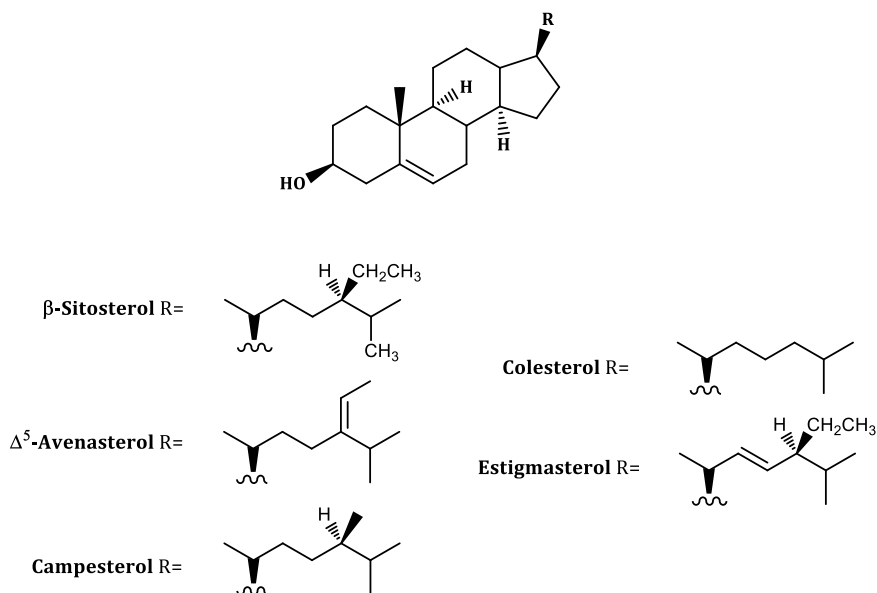


**(E)-Elenólido**

También se ha identificado vainillina.<sup>386,393,395,400</sup>

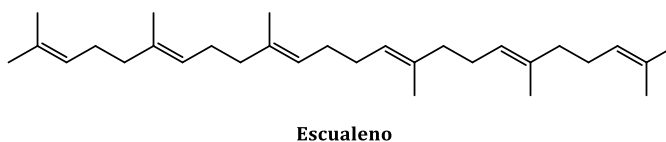
### ➤ Esteroles

Los esteroles vegetales o fitosteroles son alcoholes policíclicos compuestos por 27-29 átomos de carbono y están presentes en la mayoría de los aceites vegetales comestibles, como el aceite de oliva.<sup>421</sup> Estos compuestos constituyen la huella dactilar del aceite.<sup>422</sup> Por ello, su determinación se emplea para detectar adulteraciones y verificar la autenticidad del aceite. El  $\beta$ -sitosterol es el más abundante (80-92%), seguido de  $\Delta^5$ -avenasterol (4-14%) y campesterol (0.5-4%). Además se han identificado otros minoritarios como estigmasterol, colesterol, 24-metilcolesterol,  $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol,  $\Delta^7$ -campesterol,  $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol, sitostanol,  $\Delta^7$ -estigmastenol y  $\Delta^7$ -avenasterol.<sup>423-425</sup> También se han identificado metilesteroles como gramisterol, obtusifoliol, cicloeucalenol, citrostadienol y 24-etilofenol.<sup>424-426</sup> Además, su composición en esteroles y metilesteroles, junto con ácidos grasos, alcoholes e hidrocarburos, ha sido empleada para diferenciar aceites de diferentes denominaciones de origen de Andalucía.<sup>425</sup>



### ➤ Hidrocarburos

El hidrocarburo principal en el aceite de oliva es el escualeno. Se trata de un terpeno insaturado, precursor en la biosíntesis de fitoesteros. Se han encontrado altas concentraciones de este compuesto en aceites de oliva vírgenes.<sup>394,427,428</sup> Durante el proceso de refinado, se elimina la mayor parte de este hidrocarburo.



### ➤ Tocoferoles

Se conoce como vitamina E a un grupo de compuestos liposolubles entre los que se encuentran cuatro tocoferoles que han sido identificados en el aceite de oliva. Alrededor del 90% corresponde a  $\alpha$ -tocoferol. El resto son  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol.<sup>429</sup>

➤ Alcoholes alifáticos y ceras

Se han identificado alcoholes alifáticos saturados en el aceite de oliva, como hexacosanol, octacosanol, tetracosanol y docosanol, entre otros.<sup>423</sup>

También se han encontrado ésteres de alcoholes grasos con ácidos grasos (ceras).<sup>430</sup> Éstas corresponden, principalmente, a los ésteres formados a partir de ácido oleico y palmítico y pueden tener 36, 38, 40, 42, 44 o 46 carbonos.<sup>430</sup> Su concentración en aceites aumenta a medida que disminuye su calidad<sup>431</sup> y su análisis es de gran importancia, ya que permite detectar adulteraciones, estando su contenido máximo legislado en las diferentes categorías de aceites.<sup>432</sup>

➤ Pigmentos

En el aceite de oliva se han identificado dos grupos de pigmentos: clorofilas y carotenoides. Respecto al primer grupo se han identificado clorofila A y B y sus derivados feofitinas A y B, y feofórbidos.<sup>358,433,434</sup> La clorofila A solo está presente en baja concentración en aceites frescos y tempranos y se degrada con la exposición a la luz.<sup>435</sup> Por otro lado, la feofitina A es la que se encuentra en mayor concentración.<sup>433</sup>

En cuanto al segundo grupo, se han identificado componentes mayoritarios, como  $\beta$ -caroteno y luteolina, y otros minoritarios, como  $\beta$ -criptoxantina, o los derivados de la 5,6-epoxixantofila (neoxantina, violaxantina, anteraxantina y sus furanósidos).<sup>434,436</sup>





### 3. TRITERPENOIDES PENTACÍCLICOS

#### 3.1. Rasgos estructurales

Los triterpenoides pertenecen a la familia de los terpenos, que es uno de los grupos más extendidos de productos naturales. Estos compuestos poseen estructuras tetra o pentacíclicas, aunque también se han identificado acíclicos, mono, bi, tri y hexacíclicos.<sup>40</sup> Los triterpenoides pentacíclicos están constituidos por 30 átomos de carbono agrupados en cinco ciclos y con diferentes sustituyentes.<sup>437</sup> Se pueden clasificar en tres grupos principales: lupano, oleanano y ursano (**Figura 3.1; Tabla 3.1**).<sup>438</sup>

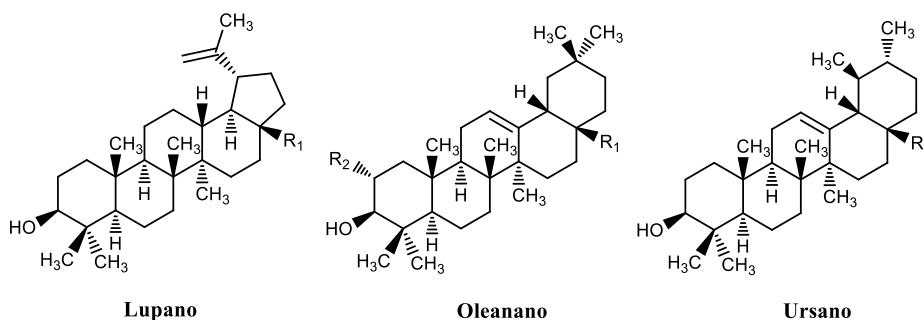


**Figura 3.1.** Estructura básica de los principales triterpenoides pentacíclicos.

**Tabla 3.1.** Compuestos triterpenoides pentacíclicos.<sup>438</sup>

| Familia  | Triterpenoide pentacíclico | R <sub>1</sub>     | R <sub>2</sub> |
|----------|----------------------------|--------------------|----------------|
| Lupano   | Lupeol                     | CH <sub>3</sub>    | -              |
|          | Betulina                   | CH <sub>2</sub> OH | -              |
|          | Ácido betulínico           | COOH               | -              |
| Oleanano | Eritrodiol                 | CH <sub>2</sub> OH | H              |
|          | Ácido oleanólico           | COOH               | H              |
|          | Ácido maslínico            | COOH               | OH             |
| Ursano   | Uvaol                      | CH <sub>2</sub> OH | -              |
|          | Ácido ursólico             | COOH               | -              |

Este tipo de moléculas se biosintetizan por la ruta del mevalonato a partir de acetil-CoA, empleándose unidades de construcción tipo isopreno. Posteriormente, la condensación de seis unidades de isopreno, da lugar a los triterpenos.<sup>439</sup> En aceituna se forman a partir del hidrocarburo lineal escualeno.<sup>439</sup>

### 3.2. Actividades biológicas

En la última década, estos compuestos han despertado el interés de la comunidad científica, debido a las numerosas actividades biológicas que presentan, como antiinflamatoria, antioxidante, antiviral, antimicrobiana,<sup>440</sup> antidiabética, así como, hepatoprotectora y cardioprotectora.<sup>40</sup> Además, estos compuestos han demostrado ser capaces de corregir desórdenes vasculares asociados a la hipertensión, obesidad, diabetes<sup>441</sup> y arterioesclerosis,<sup>442</sup> y podrían ser usados como agentes terapéuticos en la lucha contra el cáncer.<sup>443</sup> Aunque muchas de estas actividades se han probado sólo en ensayos *in vitro*,<sup>444</sup> algunas de ellas se han llevado a cabo en modelos animales, mostrando resultados prometedores.<sup>445</sup> Por otro lado, ciertos derivados sintéticos de los triterpenoides naturales podrían ser potentes agentes terapéuticos frente a algunos tipos de cáncer resistentes a tratamientos convencionales.<sup>446</sup>

### 3.3. Fuentes naturales de triterpenoides pentacíclicos

Se han identificado triterpenoides pentacíclicos en diversas frutas, como pera,<sup>438</sup> manzana,<sup>447</sup> mango,<sup>448</sup> y fresa,<sup>448</sup> y en plantas aromáticas, como orégano,<sup>438</sup> romero<sup>449</sup> y lavanda<sup>438</sup>. También se han descrito en hojas de eucalipto<sup>450</sup> y en corteza de abedul<sup>438</sup>.

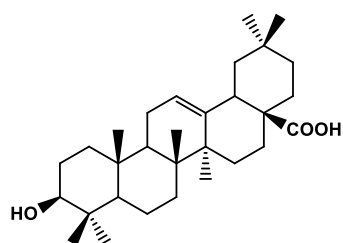
En olivo se han identificado en diferentes partes, como en hoja y fruto <sup>365,437</sup>, y en el aceite de oliva <sup>365</sup>.

#### 3.3.1. Olivo

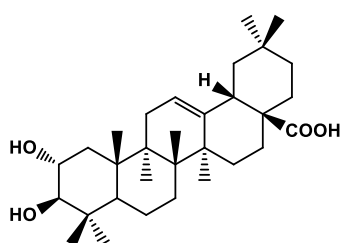
A continuación se revisa la composición química en triterpenoides descrita en olivo. La descripción botánica de este árbol, así como la revisión del resto de compuestos, se ha recogido previamente en el apartado 2.3.1.

Se han identificado los ácidos oleanólico, ursólico, maslínico y betulínico, así como los triterpenoides pentacíclicos eritrodiol y uvaol tanto en fruto como en hoja.<sup>437,451-454</sup> Recientemente, en un artículo publicado por Angelis *et al.* se describe por primera vez el aislamiento de los ácidos oleanólico y maslínico a partir de un extracto hidroalcohólico de flor del olivo.<sup>291</sup>

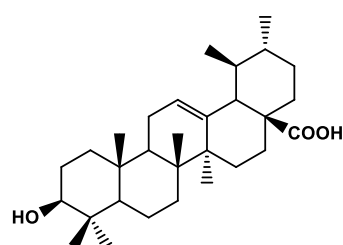
También se han detectado alcoholes y ácido triterpénicos en aceite de oliva. Su concentración en aceite de oliva aumenta a medida que disminuye la calidad, es decir, un AOVE tiene menor cantidad de estos compuestos que un aceite lampante, encontrándose el valor más elevado en aceite de orujo de oliva crudo.<sup>455</sup> Una significativa pérdida de estos compuestos se produce durante el proceso de refinado de los aceites no aptos para consumo humano.<sup>455</sup> Se han identificado principalmente tres ácidos triterpénicos pentacíclicos (ácidos oleanólico, ursólico y maslínico)<sup>456</sup> y dos alcoholes triterpénicos pentacíclicos (eritrodiol y uvaol). El contenido de eritrodiol, uvaol y de los diferentes esteroides está legislado y permite, junto con otros parámetros, detectar adulteraciones.<sup>432</sup>



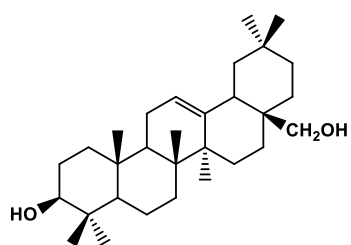
Ác. oleanólico



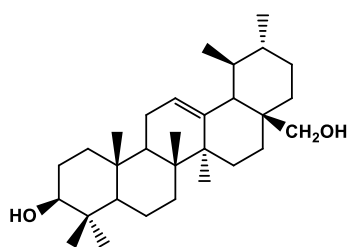
Ác. maslínico



Ác. ursólico



Eritrodiol



Uvaol

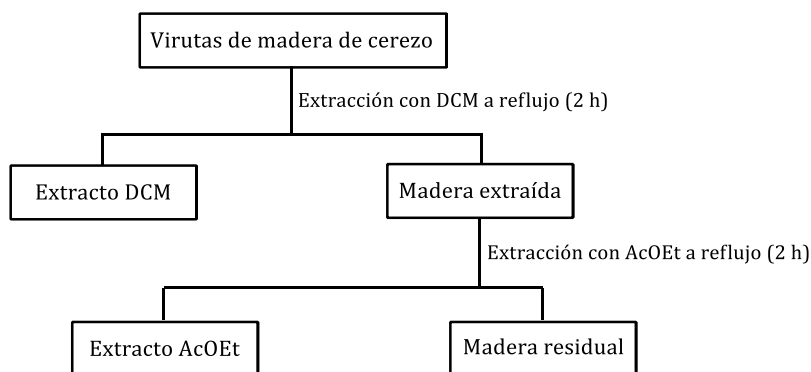
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y PROANTOCIANIDINAS EN *Prunus*, *Litchi* Y *Vaccinium***

##### **4.1 Estudio de la parte leñosa de poda de cerezo (*Prunus avium* L.)**

##### **4.1.1 Material vegetal, obtención de extractos de madera de cerezo y análisis**

Las muestras de madera de cerezo de siete variedades distintas se recogieron en una explotación agraria situada en la localidad de Torres (Jaén), coincidiendo con la época de poda de este frutal. Además, con la finalidad de conocer la posible influencia de las condiciones edafológicas y medioambientales, así como agronómicas, sobre la composición de dicha madera, se recogió otra muestra de una misma variedad ('Summit') en la localidad de Alcalá la Real (Jaén). Para la preparación de extractos fue necesario convertir las maderas en viruta para, de ese modo, hacer posible la extracción. Las extracciones se realizaron en caliente (reflujo) y secuencialmente, empleando primero diclorometano (DCM) y posteriormente acetato de etilo (AcOEt), según el procedimiento descrito en el **Esquema 4.1**. La finalidad de la extracción con DCM fue la de retirar compuestos apolares que pudieran interferir en el trabajo cromatográfico posterior. El AcOEt, por su parte, es capaz de extraer la mayoría de los compuestos fenólicos de polaridad media-alta presentes en la madera,<sup>24</sup> como flavonoides y proantocianidinas, siendo este extracto el objeto de estudio del presente trabajo.



**Esquema 4.1.** Procedimiento de extracción empleado para la madera de cerezo

Los rendimientos de extracción con ambos disolventes se situaron en la horquilla de 0.4–1.6%, siendo mayores los obtenidos con DCM que el obtenido con AcOEt, en casi todos los casos (**Tabla 4.1**). Centrando la atención sobre el extracto de AcOEt, se observa que el mayor valor corresponde a la variedad ‘Garrafal Napoleón’, seguida de ‘Burlat’, ‘Starking’ y ‘Summit’ (de Alcalá la Real).

**Tabla 4.1.** Rendimientos de extracción de las muestras de madera de cerezo de las diferentes variedades estudiadas.

| Referencia                 | Variedad          | DCM (%) | AcOEt (%) |
|----------------------------|-------------------|---------|-----------|
| Pa-M-1a(G) <sup>a</sup>    | Garrafal Napoleón | 1.5     | 1.0       |
| Pa-M-2a(P) <sup>a</sup>    | Picota            | 0.7     | 0.4       |
| Pa-M-3a(B) <sup>a</sup>    | Burlat            | 0.7     | 0.9       |
| Pa-M-4a(St) <sup>a</sup>   | Starking          | 0.9     | 0.9       |
| Pa-M-5a(Sm) <sup>a</sup>   | Summit            | 0.8     | 0.5       |
| Pa-SSu-5a(Sm) <sup>b</sup> | Summit            | 1.6     | 0.9       |
| Pa-M-6a(M) <sup>a</sup>    | Monzón            | 0.7     | 0.5       |
| Pa-M-7a(L) <sup>a</sup>    | Lapins            | 0.6     | 0.6       |

<sup>a</sup>Muestra recogida en Torres (Jaén); <sup>b</sup>Muestra recogida en Alcalá la Real (Jaén).

A continuación, con el objetivo de conocer el perfil cromatográfico de cada uno de los extractos de AcOEt de las diferentes variedades estudiadas, se llevó a cabo su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, método de elución A, véase apartado 11.1.2 en *Materials and Methods*). Los correspondientes cromatogramas HPLC se recogen en las **Figuras 4.1–4.8**. Si bien cada variedad parece presentar un perfil característico, la comparación de todos ellos pone de manifiesto que existen dos grupos diferentes de perfiles cromatográficos:



- a) El primer grupo presenta como mayoritarios los picos **5** y **10**, y en él se incluyen las variedades ‘Garrafal Napoleon’, ‘Picota’, ‘Starking’, ‘Summit’ y ‘Monzón’ (**Figuras 4.1–4.6**). De entre todos ellos, el extracto con mayor número de componentes correspondió al de la variedad ‘Starking’.

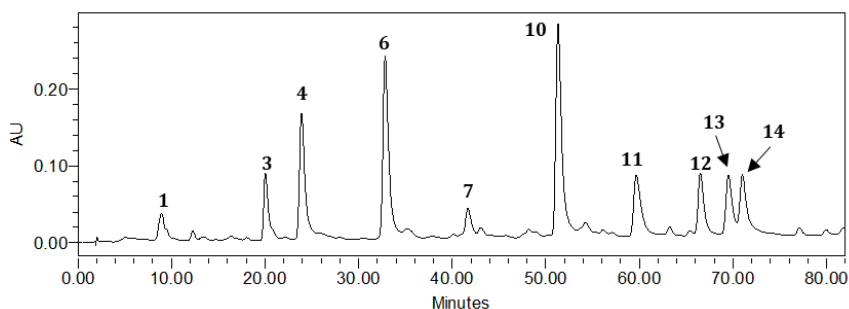


**Figura 4.1.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad ‘Garrafal Napoleón’ [Pa-M-1a(G)], a 280 nm.

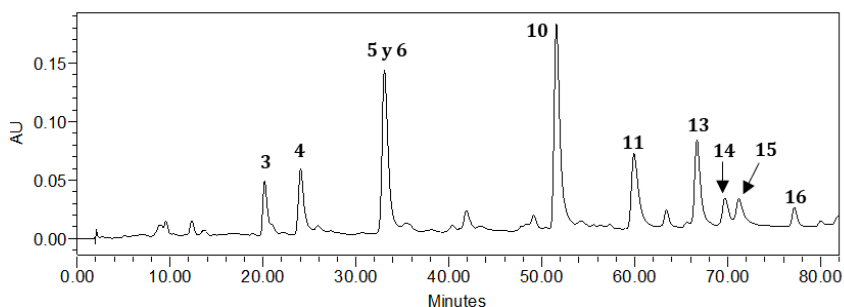


**Figura 4.2.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad ‘Picota’ [Pa-M-2a(P)], a 280 nm.

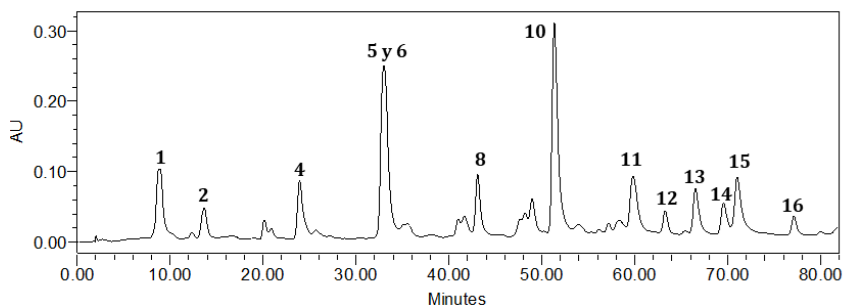


**Figura 4.3.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad ‘Starking’ [Pa-M-4a(St)], a 280 nm.

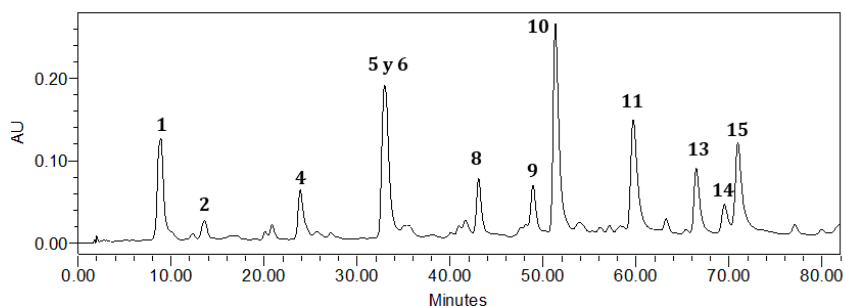


**Figura 4.4.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Summit' [Pa-M-5a(Sm)], a 280 nm.

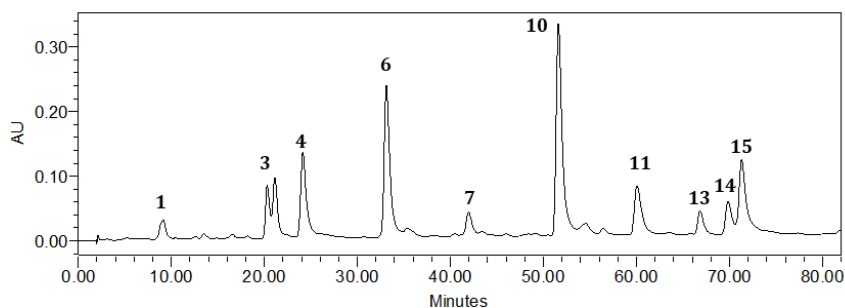


**Figura 4.5.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Summit' [Pa-SSu-5a(Sm)], a 280 nm.

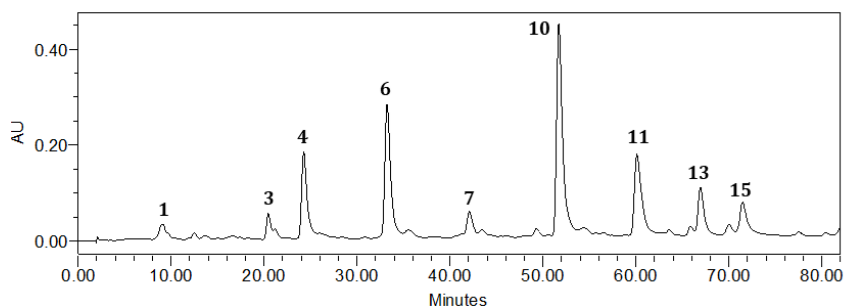


**Figura 4.6.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Monzón' [Pa-M-6a(M)], a 280 nm.

- b) El segundo grupo incluye las variedades 'Burlat' y 'Lapins' y se caracteriza por presentar como mayoritario al pico **1** (**Figuras 4.7 y 4.8**).

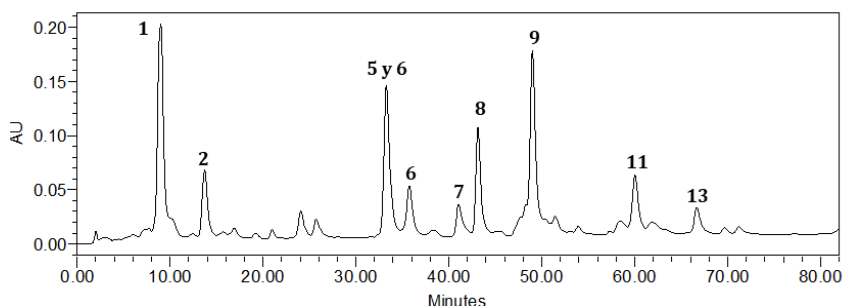


**Figura 4.7.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Burlat' [Pa-M-3a(B)], a 280 nm.

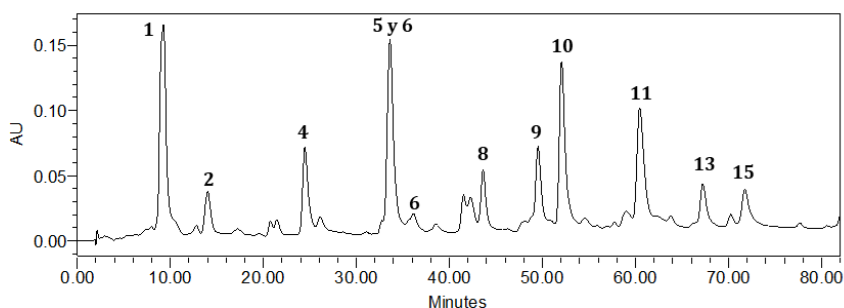


**Figura 4.8.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Lapins' [Pa-M-7a(L)], a 280 nm.

Con la finalidad de separar los picos 5 y 6 por HPLC–DAD se hicieron varias pruebas hasta encontrar que el método de elución B (Véase apartado 11.1.6 en *Materials and Methods*) era el más apropiado para mejorar la resolución de esa parte del cromatograma. Los cromatogramas obtenidos se recogen en los anexos de esta Memoria.

#### **4.1.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de cerezo y aislamiento de flavonoides**

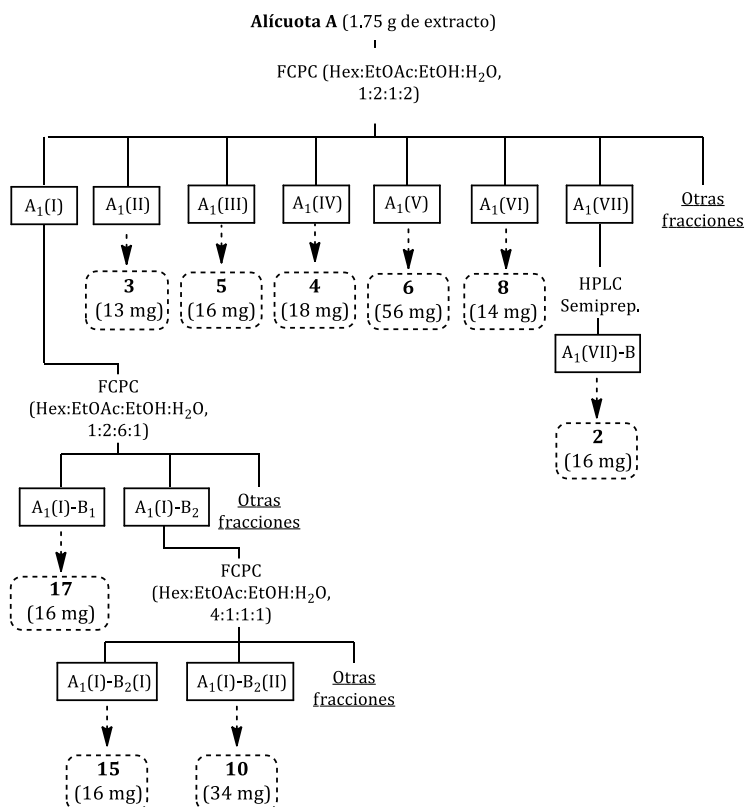
De entre todas las muestras analizadas por HPLC se seleccionó el extracto de la variedad 'Starking' para proceder al aislamiento e identificación de componentes, ya que presentaba un mayor número de picos y, en principio, permitiría acceder a un

mayor número de compuestos. El extracto de AcOEt de esta variedad se fraccionó, en primer lugar, mediante cromatografía de partición centrífuga rápida (en inglés, *Fast Centrifugal Partition Chromatography*, FCPC®) y seguidamente se llevó a cabo la purificación de componentes mediante una combinación de FCPC, cromatografía en columna (CC) de gel de sílice (SiO<sub>2</sub>) y de la técnica HPLC semipreparativa.

La técnica de FCPC presenta ciertas ventajas frente a otras técnicas convencionales, como la CC de gel de sílice. La FCPC permite recuperar prácticamente toda la masa de muestra que se inyecta, ya que, al carecer de un soporte sólido no se produce la retención irreversible de compuestos en la fase estacionaria, como sí ocurre con la gel de sílice, evitando de este modo pérdidas de muestra a lo largo del proceso de aislamiento. Esto permite trabajar con cantidades menores de extracto vegetal, con la consiguiente reducción en el consumo de disolventes y demás recursos. Además, es posible trabajar con compuestos susceptibles de sufrir degradación en contacto con la gel de sílice. Por último, el empleo de un colector de fracciones, del que dispone el equipo, permite automatizar todo el proceso.<sup>37,38,457</sup>

En un primer intento de fraccionamiento del extracto por FCPC se consiguió acceder a una serie de componentes empleando un sistema bifásico concreto como fase móvil (alícuota A), comprobándose que la modificación de las proporciones de los disolventes empleados (alícuotas B y C) conducían a fracciones a partir de las cuales era posible aislar otros compuestos diferentes. Ello pone de manifiesto la versatilidad de la técnica. A continuación se indica el fraccionamiento realizado a partir de tres alícuotas del mismo extracto de madera de cerezo.

- **Alícuota A.** 1.60 g de extracto de AcOEt se cromatografiaron por FCPC empleando una mezcla de disolventes compuesta por Hex:AcOEt:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:2:1:2, v/v/v/v) (*Esquema 4.2*).

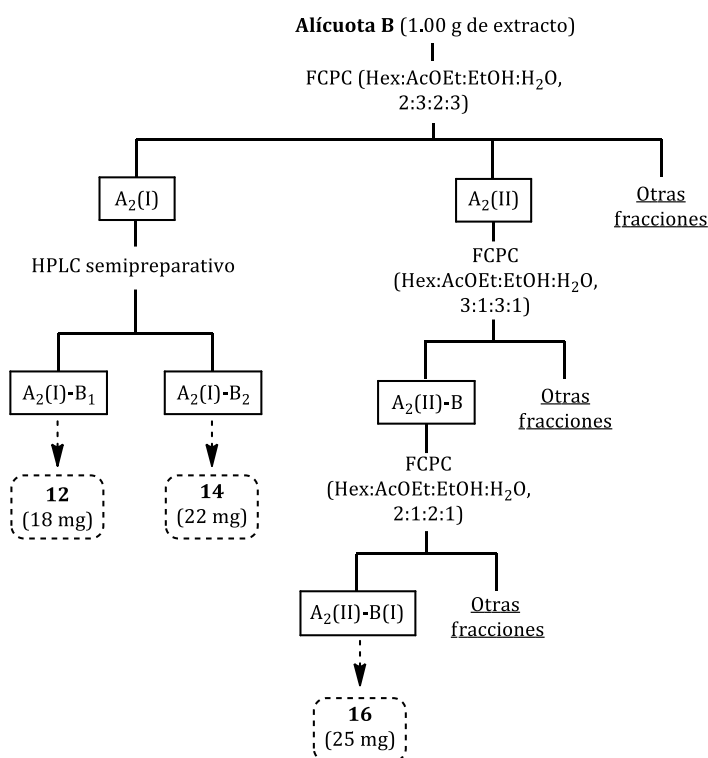


**Esquema 4.2.** Fraccionamiento y aislamiento de componentes del extracto de AcOEt de madera de cerezo de la variedad 'Starking' (alícuota A).

Las diferentes fracciones obtenidas se reunieron en cuatro agrupaciones (A<sub>1</sub>(I)–A<sub>1</sub>(VII)), tras su análisis por CCF y HPLC, y se desecharon las que no presentaban interés. Las agrupaciones A<sub>1</sub>(II), A<sub>1</sub>(III), A<sub>1</sub>(IV), A<sub>1</sub>(V) y A<sub>1</sub>(VI) contenían los compuestos **3**, **5**, **4**, **6** y **8**, respectivamente. La agrupación A<sub>1</sub>(IV) se cromatografió por HPLC semipreparativo, lo cual permitió aislar en estado puro el compuesto **2**. La agrupación A<sub>1</sub>(I) se volvió a cromatografiar por FCPC pero, en este caso, empleando los mismos disolventes en proporción 1:2:6:1 (v/v/v/v). Igualmente, las fracciones recogidas se reunieron en dos agrupaciones (A<sub>1</sub>(I)-B<sub>1</sub> y A<sub>1</sub>(I)-B<sub>2</sub>) y se desecharon las que carecían de interés. La fracción A<sub>1</sub>(I)-B<sub>1</sub> contenía en estado puro el compuesto **17**. La agrupación A<sub>1</sub>(I)-B<sub>2</sub> se cromatografió por FCPC empleando la misma mezcla de disolventes, pero ahora en proporción 4:1:1:1 (v/v/v/v). Las fracciones recogidas se

chequearon y se reunieron en dos agrupaciones,  $A_1(I)$ - $B_2(I)$  y  $A_1(I)$ - $B_2(II)$ , en las que se encontraban los compuestos **15** y **10**, respectivamente.

- **Alícuota B.** 1.00 g del mismo extracto de AcOEt se cromatografió por FCPC con una mezcla de disolventes compuesta por Hex:AcOEt:EtOH:H<sub>2</sub>O (4:1:1:1, v/v/v/v) (**Esquema 4.3**).

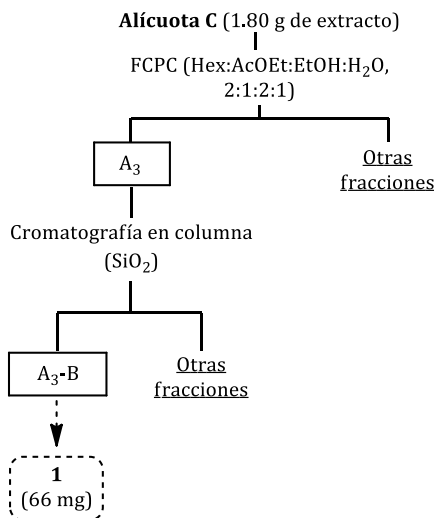


**Esquema 4.3.** Fraccionamiento y aislamiento de componentes del extracto de AcOEt de madera de cerezo de la variedad 'Starking' (alícuota B).

El análisis por CCF y HPLC de las fracciones obtenidas aconsejó hacer dos agrupaciones:  $A_2(I)$  y  $A_2(II)$ . La primera de ellas se cromatografió de nuevo por

HPLC semipreparativo para obtener los compuestos puros **12** y **14**. La segunda se fraccionó por FCPC con Hex:AcOEt:EtOH:H<sub>2</sub>O (3:1:3:1, v/v/v/v). De todas las fracciones recogidas, solo dos se reunieron en la agrupación A<sub>2</sub>(II)-B(I), para volver a cromatografiar por FCPC pero, en este caso, empleando Hex:AcOEt:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:1:2:1, v/v/v/v). Ello condujo al aislamiento del compuesto **16** puro.

- **Alícuota C.** 1.80 g del mismo extracto de AcOEt se cromatografiaron por FCPC con Hex:AcOEt:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:1:2:1, v/v/v/v), obteniéndose la agrupación A<sub>3</sub> y desechando el resto de fracciones por no presentar interés (**Esquema 4.4**).



**Esquema 4.4.** Fraccionamiento y aislamiento de componentes del extracto de AcOEt de madera de cerezo de la variedad 'Starking' (alícuota C).

Tras cromatografiar la agrupación A<sub>3</sub> por CC de gel de sílice, usando mezclas de diclorometano:etanol de polaridad creciente, fue posible aislar el compuesto **1** puro.

#### **4.1.3 Elucidación estructural de los compuestos aislados e identificados en madera de cerezo**

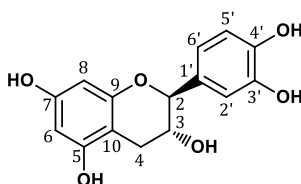
Se han aislado catorce compuestos (**1-8**, **10**, **12**, **14-17**) a partir del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Starking', cuya caracterización se ha realizado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS), así como por polarimetría de aquellos que presentaban quiralidad. Además, se ha propuesto tentativamente la estructura de otras tres moléculas (**9**, **11**, **13**) atendiendo a su patrón de fragmentación observado en el análisis por HPLC-DAD/ESI-MS.

A continuación, se discuten los datos espectroscópicos más significativos de las moléculas aisladas que han permitido su caracterización, ordenándolas atendiendo a sus tiempos de retención en el análisis por HPLC-DAD (**Figura 4.3**, apartado 4.1.1).

El compuesto **1** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  289  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{14}O_6$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar un sistema de espín de protones aromáticos del tipo ABX, con desplazamiento de 6.84 ppm (H-6'), 6.77 ppm (H-5') y 6.72 ppm (H-6'). Por otro lado, se observan otras dos señales aromáticas que aparecen como singletes anchos a un desplazamiento de 5.93 ppm y 5.86 ppm y que corresponde con H-6 y H-8, respectivamente. También se observan cuatro señales alifáticas: un doblete de metino a 4.57 ppm, que corresponde con H-2, un multiplete a 3.95-4.01 ppm, que podría corresponder con el protón H-3 y, por último, dos dobles dobletes a un desplazamiento de 2.85 ppm ( $^3J=5.4$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz) y 2.51 ppm ( $^3J=8.1$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz) y que son asignables a H-4b y H-4a, respectivamente. La multiplicidad del doblete asignado a H-2, así como sus constantes de acoplamiento, junto con las observadas para H-4a y H-4b, permiten concluir que la disposición relativa de los grupos unidos a C-2 y C-3 es 2,3-*trans*. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observan doce señales de carbonos aromáticos, cinco de las cuales corresponden con metino y las otras siete con carbonos cuaternarios, siendo cinco de ellos oxigenados. Por otro lado, aparecen tres señales asignables a carbonos alifáticos, dos metinos y un metileno. Con estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -3.4^\circ$ ,



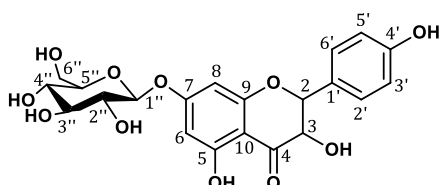
fue posible proponer la estructura de (-)-catequina para el compuesto **1**, lo cual se confirma por comparación con los datos espectroscópicos recogidos en bibliografía para esta molécula.<sup>31</sup>



(-)-Catequina (**1**)

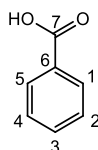
El compuesto **2** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  449  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{21}H_{22}O_{11}$ . Su espectro de RMN- $^1H$  presenta un sistema de espín de protones aromáticos del tipo  $A_2B_2$  formado por dos dobletes a 7.36 ppm y 6.83 ppm, con una constante de acoplamiento de  $^3J=8.6$  Hz para uno y  $^3J=8.6$  Hz para otro, asignables a H-2',6' y H-3',5', respectivamente. Estas señales son características de un anillo aromático *para*-sustituido. También se observan dos dobletes a 6.23 ppm y 6.20 ppm con una constante de acoplamiento pequeña de  $^4J=2.2$  Hz, correspondientes a los protones aromáticos H-6 y H-8. Por otro lado, aparecen dos dobletes de protones alifáticos a 5.02 ppm (H-2) y 4.59 ppm (H-3) con una constante de acoplamiento de 11.7 Hz para ambos. Por último, se observa un doblete que integra por un protón a 4.97 ppm ( $^3J=2.2$  Hz), dos dobles dobletes que integran por un protón, cada uno a 3.67 ppm ( $^3J=5.4$  Hz;  $^2J=12.3$  Hz) y 3.87 ppm ( $^3J=8.1$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz) y un multiplete a 3.35-3.49 ppm, que integra por cuatro protones. Estas señales son indicativas de una unidad de glucosa. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observa una señal de carbono carbonílico correspondiente a una cetona (197.37 ppm, C-4), seis señales de carbonos oxigenados (167.29 ppm, C-7; 164.75 ppm, C-9; 164.26 ppm, C-5; 159.27 ppm, C-4'; 84.11 ppm, C-2 y 73.76 ppm, C-3), dos señales de carbono cuaternario a menor desplazamiento químico (129.03 ppm, C-1' y 103.50 ppm, C-10), cuatro señales de metino (132.42 ppm, C-2',6'; 116.15 ppm, C-3',5'; 98.31 ppm, C-6 y 97.01 ppm, C-8). El resto de señales corresponden a los carbonos de la

unidad de glucosa. A partir de los experimentos bidimensionales de RMN se estableció la unión entre el aglicón y la unidad de glucosa. Todos estos datos espectroscópicos permitieron identificar el compuesto **2** como aromadendrina-7-*O*-glucósido, lo que se contrastó con la información bibliográfica.<sup>458</sup>



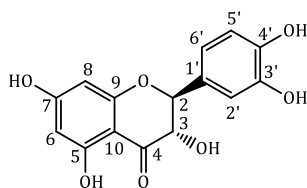
Aromadendrina-7-*O*-glucósido (**2**)

El compuesto **3** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  121  $[M-H]^-$ , coherente con una fórmula molecular de  $C_7H_6O_2$ . Su espectro de RMN- $^1H$  presenta tres señales de protones aromáticos, que en su conjunto integran por cinco protones a 8.01 ppm (doble doblete, H-1,5,  $^4J=1.3$  Hz;  $^3J=7.5$  Hz), a 7.57 ppm (triplete, H-3,  $^3J=7.5$  Hz) y a 7.45 ppm (triplete, H-2,4,  $^3J=7.5$  Hz), indicativo de un anillo aromático monosustituido. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observa una señal de carbono carbonílico correspondiente a un grupo carboxílico a 170.01 ppm, además de tres señales asignables a metinos aromáticos a 134.25 ppm (C-3), 130.91 ppm (C-1,5) y a 128.97 ppm (C-2,4). Por último, se observa una señal de carbono cuaternario aromático a 131.58 ppm (C-6). Todos estos datos espectroscópicos permitieron identificar el compuesto **1** como ácido benzoico, de acuerdo con lo recogido en bibliografía.<sup>459</sup>



Ácido benzoico (**3**)

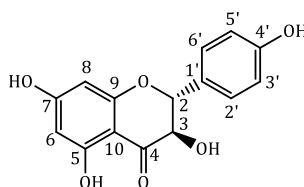
El compuesto **4** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  303  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{12}O_7$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar un sistema de espín de protones aromáticos del tipo ABX, como el compuesto **1**, con desplazamiento de 6.95 ppm (doblete, H-6',  $^3J=1.2$  Hz), 6.83 ppm (doble doblete, H-2',  $^4J=1.2$  Hz;  $^3J=8.1$  Hz) y 6.78 ppm (doblete, H-5',  $^3J=8.1$  Hz), indicativo de un anillo aromático 1,3,5-trisustituido. También se observan dos dobletes a 5.91 ppm (H-6) y a 5.88 ppm (H-8), ambos con una constante de acoplamiento de 1.5 Hz. Por último, aparecen otros dos dobletes a 4.90 ppm (H-2) y a 4.48 ppm (H-3), con una misma constante de acoplamiento de 11.6 Hz. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observa una señal de carbono carbonílico correspondiente a una cetona (198.40 ppm, C-4), siete señales de carbonos oxigenados (168.70 ppm, C-7; 165.30 ppm, C-5; 164.51 ppm, C-9; 147.14 ppm, C-4'; 146.31 ppm, C-3'; 85.11 ppm, C-2 y 73.67 ppm, C-3), dos señales de carbono cuaternario a menor desplazamiento químico (129.87 ppm, C-1' y 101.85 ppm, C-10) y cinco señales de metino (120.89 ppm, C-6'; 116.15 ppm, C-2'; 115.89, C-5'; 97.31 ppm, C-6 y 96.28 ppm, C-8). Esta información, junto con el valor de su rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -3.4^\circ$ , permitió proponer para el compuesto **4** la estructura de (-)-taxifolina, lo que se confirma con lo publicado en bibliografía.<sup>460</sup>



(-)-Taxifolina (**4**)

El compuesto **5** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  287  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{12}O_6$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  son similares a los del compuesto **2**, con la excepción de que en este caso no se observan señales correspondientes a una unidad de glucosa. Esta información, junto con el valor de su rotación específica de

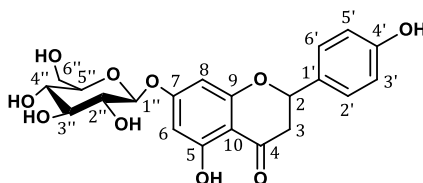
$[\alpha]_D^{25} +10.6^\circ$ , permitió proponer para el compuesto **5** la estructura de (+)-aromadendrina, lo que se confirma con lo publicado en bibliografía.<sup>461</sup>



(+)-Aromadendrina (**5**)

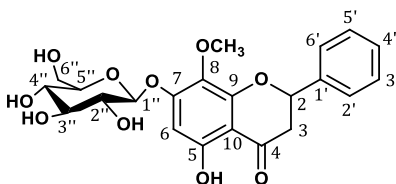
El compuesto **6** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  433  $[M-H]^-$ , coherente con una fórmula molecular de  $C_{21}H_{22}O_{10}$ . Su espectro de RMN- $^1H$ , como el del compuesto **2**, presenta un sistema de espín de protones aromáticos del tipo  $A_2B_2$  característico de un anillo aromático *para*-sustituido, formado por dos dobletes a 7.30 ppm y 6.82 ppm, con una constante de acoplamiento de  $^3J=8.6$  Hz para ambos, que se corresponden con H-2',6' y H-3',5', respectivamente. Presenta otras dos señales de protones aromáticos a 6.21 ppm (H-8) y 6.18 ppm (H-6) con una constante de acoplamiento de  $^4J=2.2$  Hz. Por otro lado se observan tres señales alifáticas de doblete asignables a metino, 5.35 ppm (H-2;  $^3J=2.8$  Hz;  $^3J=12.9$  Hz), y un metileno, a 3.15 ppm (H-3b;  $^3J=13.0$  Hz;  $^2J=17.2$  Hz) y 2.74 ppm (H-3a;  $^3J=2.9$  Hz;  $^2J=17.2$  Hz), que indica una disposición relativa *trans* de los grupos unidos a C-2 y C-3. Por último, como ocurría con el compuesto **2**, presenta señales características de una unidad de glucosa. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observa una señal de carbono carbonílico correspondiente a un cetona (198.53 ppm, C-4), cuatro señales de carbonos cuaternarios aromáticos oxigenados (167.01 ppm, C-7; 164.94 ppm, C-9; 164.59 ppm, C-5 y 159.07 ppm, C-4'), otras dos señales de carbonos cuaternarios aromáticos (130.85, C-1' y 104.91, C-10), dos señales de metinos aromáticos (96.91 ppm, C-8 y 98.00 ppm, C-6) y dos asignables a carbonos alifáticos (80.67 ppm, C-2 y 44.13 ppm, C-3). También aparecen señales características de los carbonos de una unidad de glucosa, cuya posición de unión con el aglicón se asignó a partir de las señales de cruce observadas en HMBC. Atendiendo a estos datos

espectroscópicos fue posible identificar el compuesto **6** como naringenina-7-*O*-glucósido, los cuales estaban de acuerdo con los publicados en bibliografía.<sup>462</sup>



Naringenina-7-*O*-glucósido (**6**)

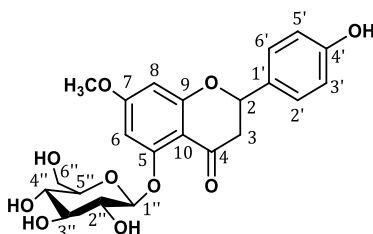
El compuesto **7** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  447  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{22}H_{24}O_{10}$ . En los experimentos de  $MS^2$  se observa como pico base el fragmento a  $m/z$  285  $[M-H-162\text{ Da}]^-$ , resultante de la pérdida de una unidad de glucosa. Además, se observan otros picos secundarios a  $m/z$  165 y  $m/z$  183, ambos atribuibles a fragmentaciones *retro*-Diels-Alder (RDA) asignables a  $[A^{0,3}-162]^-$  y  $[A^{1,3}-162]^-$ , respectivamente, y que indican la presencia de un anillo aromático A trioxigenado, conteniendo un grupo hidroxilo y un metoxilo, aparte de la unidad de glucosa. Estos datos han permitido identificar tentativamente al compuesto **7** como dihidrowogonina-7-*O*-glucósido.<sup>463</sup>



Dihidrowogonina-7-*O*-glucósido (**7**)

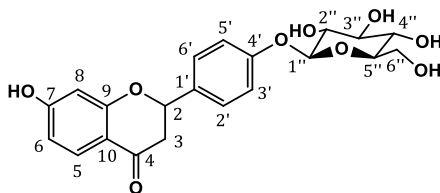
El compuesto **8** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  447  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de

$C_{22}H_{24}O_{10}$ . Su espectro de RMN- $^1H$  es muy parecido al del compuesto **6**, pero en este caso, se observan señales de metoxilo a 3.82 ppm (s) en RMN- $^1H$  y a 56.42 ppm en RMN- $^{13}C$ . De acuerdo con las señales de cruce observadas en el espectro bidimensional de HMBC fue posible establecer la unión de la unidad de glucosa y el grupo metoxilo al esqueleto de flavonoide. Estos datos espectroscópicos han permitido proponer para el compuesto **8** la estructura de sakuranetina-5-*O*-glucósido, lo cual fue confirmado por comparación con los datos espectroscópicos descritos en bibliografía.<sup>464</sup>



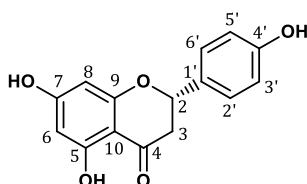
Sakuranetina-5-*O*-glucósido (**8**)

El compuesto **9** presenta un ion quasimolecular de  $m/z$  417  $[M-H]^-$  en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo), compatible con una fórmula molecular de  $C_{21}H_{22}O_9$ . En los experimentos de  $MS^2$  se observa como pico base el fragmento a  $m/z$  255  $[M-H-162 Da]^-$ , resultante de la pérdida de una unidad de glucosa. También se observa otro pico secundario a  $m/z$  279 originado por una fragmentación RDA ( $[^{1,3}A]^-$ ), asignable a un anillo B unido a una unidad de glucosa, y una pérdida de 138 Da indicativo de un anillo A con un grupo hidroxilo. Estos datos han permitido identificar tentativamente al compuesto **9** como liquiritina.<sup>465</sup>



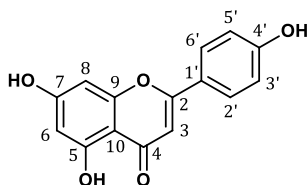
Liquiritina (**9**)

El compuesto **10** presenta un ion quasimolecular de  $m/z$  271  $[M-H]^-$  en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo), compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{12}O_5$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  coinciden con los del compuesto **6**, con la excepción de que en este caso no se observan señales asignables a una subestructura de glucosa. Con estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -7.7^\circ$ , fue posible asignar al compuesto **10** la estructura de (-)-naringenina, lo cual coincide con lo descrito en bibliografía.<sup>466</sup>



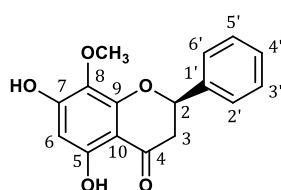
(-)-Naringenina (**10**)

El compuesto **11** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular de  $m/z$  269  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{10}O_5$ . En los experimentos de  $MS^2$  se observa como pico base el fragmento a  $m/z$  151, resultante de una fragmentación RDA ( $[^{1,3}A]^-$ ). También aparecen otros picos secundarios asignables todos ellos a fragmentaciones RDA a  $m/z$  177 ( $[M-H-C_6H_6O]^-$ ), 125 ( $[1,4A]^-$ ), 119 ( $[1,3B]^-$ ), 107 ( $[0,4A]^-$ ) y 93 ( $[C_6H_6O]^-$ ). Estas fragmentaciones son indicativas de una flavona con un anillo A y B sustituido por dos y un grupo hidroxilo, respectivamente. Estos datos han permitido identificar tentativamente al compuesto **11** como apigenina.<sup>85</sup>



Apigenina (**11**)

El compuesto **12** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular a  $m/z$  285  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{16}H_{14}O_5$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  coinciden con los del compuesto **10**, con la excepción de una nueva señal a 3.74 ppm (s) y 61.50 ppm atribuible a un grupo metoxilo. Las señales de cruce observadas en el espectro bidimensional HMBC permitieron establecer la posición de dicho grupo. Esta información, junto con el valor positivo de su rotación específica a  $[\alpha]_D^{25} +20.3^\circ$ , permitió proponer para el compuesto **12** la estructura de (+)-dihidrowogonina, lo que se confirma con lo publicado en bibliografía.<sup>113</sup>

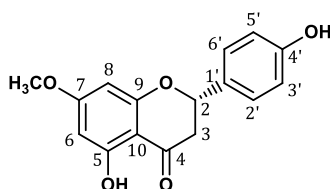


(+)-Dihidrowogonina (**12**)

El compuesto **13** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular a  $m/z$  255  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{12}O_4$ . En los experimentos de MS<sup>2</sup> se observan picos de fragmentaciones RDA a  $m/z$  213 ( $[M-H-C_2H_2O]^-$ ), 211 ( $[M-H-CO_2]^-$ ) y 151 ( $[^{1,3}A]^-$ ), compatibles con un anillo A sustituido por dos grupos hidroxilo. Además, se observa una pérdida de 104 Da, lo cual es indicativo de un anillo B sin sustitución. Debido a la similitud de estos datos con los del compuesto (+)-pinocembrina (**15**), aislado y caracterizado por RMN, el compuesto **13** podría corresponder con un isómero de éste.

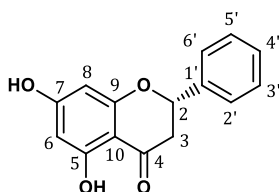
El compuesto **14** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular de  $m/z$  285  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{16}H_{14}O_5$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  coinciden con los del compuesto **8**, pero en este caso no se observan señales de unidad de glucosa. Por ello se propuso para el compuesto **14** la estructura de sakuranetina, lo que se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>467</sup>





Sakuranetina (**14**)

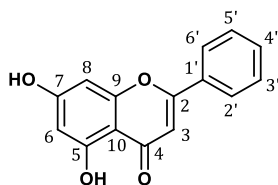
El compuesto **15** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular de  $m/z$  255  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{12}O_4$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  coinciden con los del compuesto **10**, pero en este caso sólo se observan dos señales correspondientes a carbonos oxigenados a 165.49 ppm (C-5) y a 168.47 ppm (C-7). A partir de estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica a  $[\alpha]_D^{25} +28.4^\circ$ , fue posible proponer para el compuesto **15** la estructura de (+)-pinocembrina, lo cual fue confirmado por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>468</sup>



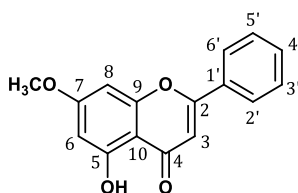
(+)-Pinocembrina (**15**)

El compuesto **16** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular a  $m/z$  253  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{10}O_4$ . Su espectro de RMN- $^1H$  presenta dos conjuntos de señales de protones aromáticos a 7.82-7.84 ppm (m, H-2',6') y 7.45-7.49 ppm (m, H-3',4',5') que integran por dos y tres protones, respectivamente. Por otro lado, se observan dos singletes correspondientes a protones aromáticos a 6.23 ppm (H-6) y 6.40 ppm (H-8). Por último, aparece un singlete a 6.59 ppm asignable a un protón olefínico (H-3). En el

espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se observa una señal de carbono carbonílico correspondiente a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (182.59 ppm, C-4), cuatro señales de carbonos oxigenados (164,33 ppm, C-7; 164.13 ppm, C-2; 161.72 ppm, C-9; 158,15 ppm, C-5), dos señales de carbonos cuaternarios aromáticos (131.34 ppm, C-1'; 104.88 ppm, C-10), cinco señales de metinos aromáticos (131.86 ppm, C-4'; 129.09 ppm, C-3',5'; 126.35 ppm, C-2',6'; 99.46 ppm, C-6; 94.50 ppm, C-8) y otras dos señales de carbonos no aromáticos a 164.13 ppm, de carbono cuaternario (C-2), y a 105.05 ppm, de metino (C-3). A partir de estos datos espectroscópicos fue posible proponer para el compuesto **16** la estructura de crisina, lo cual fue confirmado por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>468</sup>

Crisina (**16**)

El compuesto **17** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular a  $m/z$  267  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ . Sus espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  coinciden con los del compuesto **16**, pero en este caso se observa una señal de RMN- $^1\text{H}$  que integra por 3 protones a 3.88 ppm y que se correlaciona mediante HSQC con un carbono a 55.96 ppm, correspondiente a un grupo metoxilo. La posición de unión de este grupo se determinó a partir de la señal de cruce observada en el espectro bidimensional de HMBC entre los protones a 3.88 ppm y el carbono cuaternario aromático a 165.79 ppm. A partir de estos datos espectroscópicos fue posible proponer para el compuesto **17** la estructura de tectocrisina, lo cual fue confirmado por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>469</sup>



Tectocrisina (**17**)

En la **Tabla 4.2** se recogen todos los compuestos identificados en el extracto de acetato de etilo de madera de cerezo de la variedad estudiada. Todos los compuestos identificados son de naturaleza flavonoide, a excepción del compuesto **3**.

**Tabla 4.2.** Compuestos aislados e identificados en el extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad ‘Starking’.

| Pico | t <sub>R</sub> (min) | Identificación                                     |
|------|----------------------|----------------------------------------------------|
| 1    | 9.6                  | (-)-Catequina <sup>a</sup>                         |
| 2    | 14.2                 | Aromadendrin-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>   |
| 3    | 31.1                 | Ácido benzoico <sup>a</sup>                        |
| 4    | 35.6                 | (-)-Taxifolina <sup>a</sup>                        |
| 5    | 36.7                 | (+)-Aromadendrina <sup>a</sup>                     |
| 6    | 27.6                 | Naringenin-7- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>     |
| 7    | 30.7                 | Dihidrowogonin-7- <i>O</i> -glucósido <sup>b</sup> |
| 8    | 31.1                 | Sakuranetin-5- <i>O</i> -glucósido <sup>a</sup>    |
| 9    | 35.6                 | Liquiritina <sup>b</sup>                           |
| 10   | 36.7                 | (-)-Naringenina <sup>a</sup>                       |
| 11   | 41.4                 | Apigenina <sup>b</sup>                             |
| 12   | 45.0                 | (+)-Dihidrowogonina <sup>a</sup>                   |
| 13   | 46.8                 | Isómero de pinocembrina <sup>b</sup>               |
| 14   | 47.1                 | Sakuranetina <sup>a</sup>                          |
| 15   | 48.4                 | (+)-Pinocembrina <sup>a</sup>                      |
| 16   | 53.8                 | Crisina <sup>a</sup>                               |
| 17   | 58.5                 | Tectocrisina <sup>a</sup>                          |

<sup>a</sup> Aislado y caracterizado por RMN; <sup>b</sup> Identificado tentativamente por HPLC-DAD/ESI-MS.

Se aislaron trece compuestos a partir del extracto de la madera de cerezo de la variedad 'Starking'. Además, fue posible proponer la estructura tentativa de otros cuatro compuestos a partir de su patrón de fragmentación observado en el análisis por HPLC-DAD/ESI-MS. Todas las moléculas aisladas, a excepción del ácido carboxílico (**3**), pertenecen al grupo de los flavonoides, concretamente, a las subfamilias de los flavan-3-oles (**1**), flavanonoles (**2**, **4** y **5**), flavanonas (**6**, **7**, **8**, **10**, **12**, **14** y **15**) y flavonas (**16** y **17**). Todos los compuestos, a excepción de **1**, **4** y **12**, habían sido identificados en diferentes órganos vegetales de *P. avium* L. El enantiómero *levo* de catequina (**1**) no se había identificado en cerezo anteriormente a esta Tesis, aunque sí se había encontrado en la especie *salicina* de este género.<sup>470</sup> La forma *dextro*, más común y ampliamente distribuida en la naturaleza, sí que ha sido aislada a partir de madera de cerezo<sup>120</sup> e identificada en numerosas especies del género *Prunus*.<sup>70</sup> Tampoco habían sido identificados en este frutal los enantiómeros *levo* de taxifolina (**4**) y *dextro* de dihidrowogonina (**12**). Sin embargo, sí que se ha descrito la presencia de (+)-taxifolina en madera de cerezo<sup>85,471</sup> y en otras especies de *Prunus*,<sup>70</sup> y de (-)-dihidrowogonina, también en madera de este árbol.<sup>120</sup> Por otro lado, los compuestos aromadendrin-7-*O*-glucósido (**2**), dihidrowogonin-7-*O*-glucósido (**7**) y sakuranetin-5-*O*-glucósido (**8**), junto con **1**, **4** y **12**, se han aislado por primera vez a partir de madera de cerezo. El compuesto **2** se aisló y caracterizó por primera vez de la albura de la madera de las especies *mahaleb* y *persica* del género *Prunus*.<sup>472</sup> Además, se ha identificado tentativamente en infusiones preparadas a partir de rabos de cereza.<sup>463</sup> El compuesto **7** se ha aislado del floema y de la capa dura de células que cubren una herida (callo) en cerezo,<sup>123</sup> y el compuesto **8** se ha obtenido a partir de rabo de cereza<sup>473</sup> y corteza de *P. avium*,<sup>474</sup> y se ha identificado en cerezas.<sup>475</sup> Tampoco habían sido obtenidos de madera de cerezo los compuestos ácido benzoico (**3**) y apigenina (**11**), aunque sí identificados tentativamente en ésta.<sup>85</sup>

Practicamente todos los compuestos aislados e identificados (**1**, **2**, **4**–**17**) en este extracto de madera de cerezo son flavonoides, y es bien sabido el interés de esta familia de compuestos desde el punto de vista farmacológico (Véase apartado 1.2 en Antecedentes Bibliográficos). Algunos de ellos, como la naringenina (**10**) posee evidentes efectos antitumorales, antivirales, antiinflamatorios, cardioprotectores y neuroprotectores, entre otros.<sup>476</sup> Por otro lado, concentraciones bajas de naringenina-7-

*O*-glucósido (**6**) poseen efectos anti-diabéticos.<sup>477</sup> Además, otros como (+)-aromadendrina (**5**) muestran actividades antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante.<sup>478</sup> Respecto al resto de componentes del extracto de cerezo, merece la pena destacar los efectos que podría tener el compuesto (–)-taxifolina (**4**) para inhibir la proteasa principal del virus SARS-CoV-19, responsable de la pandemia mundial que nos invade, tras un *screening* computacional llevado a cabo con 606 millones de moléculas.<sup>479</sup>

#### ***4.1.4 Cuantificación de los flavonoides identificados en los extractos de AcOEt de madera de cerezo de las diferentes variedades estudiadas***

Con el fin de conocer la concentración de cada compuesto fenólico en los extractos de AcOEt obtenidos a partir de madera de cerezo de las diferentes variedades estudiadas, se llevó a cabo una cuantificación mediante HPLC–DAD empleando el método de calibración externa. Los diferentes flavonoides identificados se agruparon en cuatro familias: a) flavan-3-oles; b) dihidroflavonoles; c) flavanonas y d) flavonas. Los compuestos pertenecientes al mismo grupo se cuantificaron empleando la recta patrón elaborada con un estándar de la misma familia, correlacionando el valor de área de cada señal obtenida en el equipo HPLC–DAD a 280 nm frente a la concentración de cada uno de los patrones. Así, fue necesario construir cuatro rectas de calibrado, una para cada grupo de flavonoides, empleando disoluciones patrón en metanol de concentraciones comprendidas entre 0.05 y 1.00 mg/mL de (–)-catequina, con la que se cuantificó el compuesto **1**; (+)-taxifolina, empleada para los compuestos **2**, **4** y **5**; eriodictiol, para determinar la concentración de **6–10**, **12–15**, y finalmente, apigenina, usada para los compuestos **11**, **16** y **17**. Las expresiones matemáticas para cada una de las rectas patrón se recogen en la **Tabla 4.3**.

**Tabla 4.3.** Rectas de calibrado empleadas para la cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de las muestras de madera de cerezo de las diferentes variedades estudiadas.

| Compuesto      | Recta de calibrado                          |
|----------------|---------------------------------------------|
| (-)-Catequina  | $y = 9000000x - 129376$ ( $r^2 = 0.9934$ )  |
| (+)-Taxifolina | $y = 30000000x - 749964$ ( $r^2 = 0.9957$ ) |
| Eriodictiol    | $y = 40000000x - 882321$ ( $r^2 = 0.9939$ ) |
| Apigenina      | $y = 20000000x - 551134$ ( $r^2 = 0.9996$ ) |

Interpolando el valor del área del pico a 280 nm de cada uno de los compuestos presentes en los extractos en la curva de calibrado pertinente, se determinó la concentración de cada uno de ellos (**Tabla 4.4**).

**Tabla 4.4.** Cuantificación de flavonoides en los extractos de AcOEt de madera de cerezo de las diferentes variedades estudiadas.

|                        | Variedad estudiada <sup>a</sup> |        |        |          |                     |                     |        |        |
|------------------------|---------------------------------|--------|--------|----------|---------------------|---------------------|--------|--------|
|                        | Garrafal<br>Napoleón            | Picota | Burlat | Starking | Summit <sup>b</sup> | Summit <sup>c</sup> | Monzón | Lapins |
| <b>Flavan-3-ol</b>     |                                 |        |        |          |                     |                     |        |        |
| <b>1</b>               | 0.36                            | 0.01   | 1.80   | 1.00     | 0.67                | 0.28                | 0.21   | 0.91   |
| <b>Dihidroflavonol</b> |                                 |        |        |          |                     |                     |        |        |
| <b>2</b>               | -                               | -      | 0.19   | 0.15     | 0.05                | 0.04                | 0.03   | 0.08   |
| <b>4</b>               | 0.47                            | 0.07   | 0.10   | 0.23     | 0.10                | 0.35                | 0.27   | 0.13   |
| <b>5</b>               | -                               | 0.04   | 0.39   | 0.29     | 0.13                | -                   | -      | 0.18   |
| <i>Total</i>           | 0.47                            | 0.11   | 0.68   | 0.67     | 0.28                | 0.39                | 0.30   | 0.39   |
| <b>Flavanona</b>       |                                 |        |        |          |                     |                     |        |        |
| <b>6</b>               | 0.42                            | 0.13   | 0.06   | 0.33     | 0.14                | 0.46                | 0.29   | 0.11   |
| <b>7</b>               | 0.10                            | 0.03   | 0.09   | -        | -                   | 0.10                | 0.07   | -      |
| <b>8</b>               | 0.06                            | 0.02   | 0.19   | 0.16     | 0.08                | -                   | 0.02   | 0.07   |
| <b>9</b>               | -                               | -      | 0.31   | -        | -                   | -                   | -      | 0.09   |
| <b>10</b>              | 0.61                            | 0.16   | -      | 0.58     | 0.28                | 0.67                | 0.52   | 0.19   |
| <b>12</b>              | 0.06                            | 0.03   | -      | 0.08     | -                   | -                   | -      | -      |
| <b>13</b>              | 0.21                            | 0.08   | 0.09   | 0.15     | 0.10                | 0.10                | 0.12   | 0.07   |
| <b>14</b>              | 0.18                            | 0.03   | -      | 0.10     | 0.05                | 0.12                | 0.04   | 0.04   |
| <b>15</b>              | 0.17                            | 0.03   | -      | 0.16     | 0.14                | 0.24                | 0.10   | 0.07   |
| <i>Total</i>           | 1.81                            | 0.51   | 0.74   | 1.56     | 0.79                | 1.69                | 1.16   | 0.64   |
| <b>Flavonas</b>        |                                 |        |        |          |                     |                     |        |        |
| <b>11</b>              | 0.46                            | 0.15   | 0.22   | 0.38     | 0.35                | 0.40                | 0.50   | 0.29   |

|                          |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>16</b>                | 0.09 | 0.04 | -    | 0.13 | 0.05 | -    | -    | -    |
| <b>17</b>                | 0.08 | 0.03 | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Total</i>             | 0.63 | 0.22 | 0.22 | 0.51 | 0.40 | 0.40 | 0.50 | 0.29 |
| <b>Total<sup>d</sup></b> | 3.27 | 0.85 | 1.64 | 3.74 | 2.14 | 2.76 | 2.17 | 2.23 |

<sup>a</sup>Valores (mg compuesto/g madera seca) expresados como el valor medio de las dos réplicas. En todos los casos la desviación estándar fue inferior a 0.001; <sup>b</sup>Muestra recogida en Torres (Jaén); <sup>c</sup>Muestra recogida en Alcalá la Real (Jaén). <sup>d</sup>Concentración total de flavonoides.

El mayor valor de concentración de flavonoides correspondió al extracto de la variedad 'Starking', seguido de 'Garrafal Napoleón'. En cuanto al contenido total por familias de compuestos, la variedad 'Garrafal Napoleón' presentó el mayor valor de flavanonas y flavonas, y la variedad 'Burlat', el de flavan-3-ol y dihidroflavonoles. Por otro lado, las variedades 'Burlat', 'Starking', 'Summit' (recogida en Torres) y 'Lapins' presentan el pico **1** como el de mayor concentración. Sin embargo, esto no ocurre con las variedades 'Garrafal Napoleón', 'Picota', 'Summit' (recogida en Alcalá) y 'Monzón', en cuyo caso, se observa como mayoritario el compuesto **10**.

## 4.2 Estudio de la parte leñosa de poda de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.)

### 4.2.1 Material vegetal, obtención de extractos de madera de ciruelo europeo y análisis

Las muestras de madera de ciruelo europeo se recogieron en dos fincas situadas en la localidad de Jaraíz de la Vera (Cáceres) en noviembre de 2015 durante la época de poda de este frutal. Los diferentes extractos de madera se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento empleado para las muestras de cerezo (*Esquema 4.1*, apartado 4.1.1). Los rendimientos de extracción obtenidos se recogen en la *Tabla 4.5*.

**Tabla 4.5.** Rendimientos de extracción de las muestras de madera de ciruelo europeo de las diferentes variedades estudiadas.

| Referencia                 | Variedad            | DCM (%) | AcOEt (%) |
|----------------------------|---------------------|---------|-----------|
| Pd-CC-1a(RCV) <sup>a</sup> | Reina Claudia Verde | 1.1     | 1.8       |
| Pd-CC-2a(CT) <sup>a</sup>  | Claudia de Tolosa   | 0.6     | 1.2       |
| Pd-CC-3a <sup>a</sup>      | Standley            | 0.9     | 1.7       |
| Pd-CC-4a <sup>a</sup>      | De la Rosa          | 1.2     | 3.3       |
| Pd-CC-5a(RCV) <sup>b</sup> | Reina Claudia Verde | 1.2     | 2.4       |
| Pd-CC-6a(CT) <sup>b</sup>  | Claudia de Tolosa   | 1.1     | 1.2       |

<sup>a</sup>Parcela 1; <sup>b</sup>Parcela 2.

En todos los casos, el rendimiento de extracción cuando se usa DCM como disolvente fue inferior al obtenido en la extracción con AcOEt. Centrando la atención en este último extracto, que es el objeto de estudio de este trabajo, se observa que el mayor valor se obtiene para la variedad ‘De la Rosa’, seguido de ‘Reina Claudia Verde’ recogida en la parcela 2. Por el contrario, el menor valor corresponde con las muestras de la variedad ‘Claudia de Tolosa’.

A continuación, los diferentes extractos de AcOEt obtenidos se analizaron mediante HPLC (Método de elución C; véase apartado 11.2.2 en *Materials and Methods*) con el fin de conocer su perfil cromatográfico. En las **Figuras 4.9–4.14** se recogen los cromatogramas HPLC de todos los extractos de AcOEt obtenidos. Si bien cada una de las variedades presentan un perfil característico, la comparación entre todos ellos puso de manifiesto que existen dos grupos diferentes de perfiles cromatográficos:

- El primer grupo se caracteriza por presentar todos los picos **18–26** en su perfil cromatográfico, con la excepción de la variedad ‘Standley’, en la que no se ha identificado el compuesto **24** (**Figuras 4.9–4.12**).



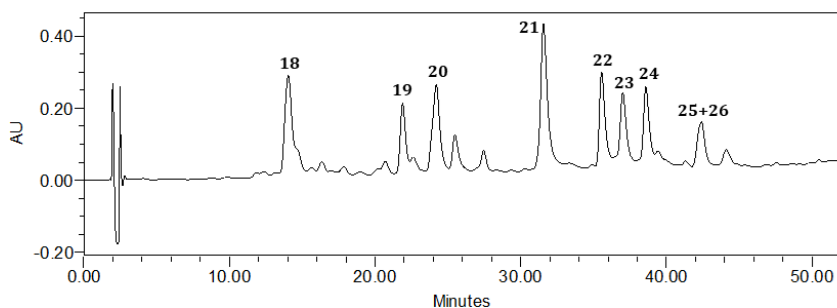


**Figura 4.9.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, variedad 'Reina Claudia Verde' [Pd-CC-1a(RCV)], a 230 nm.

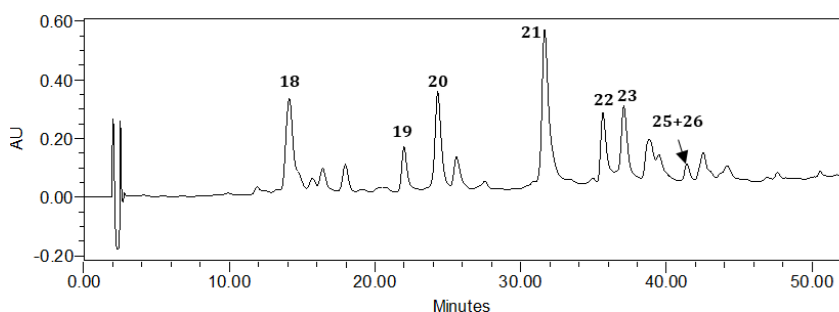


**Figura 4.10.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, variedad 'Standley' [Pd-CC-3a], a 230 nm.

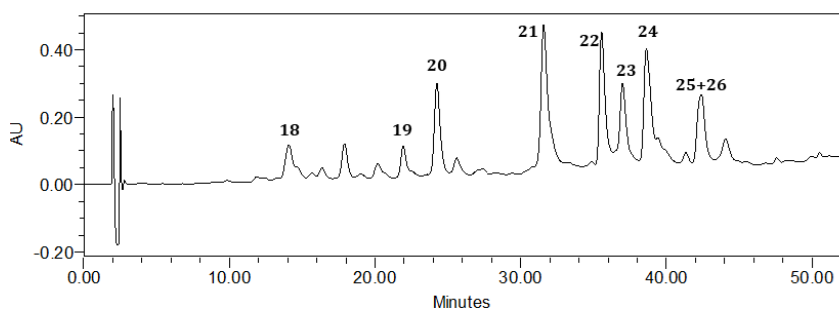


**Figura 4.11.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa' [Pd-CC-4a], a 230 nm.

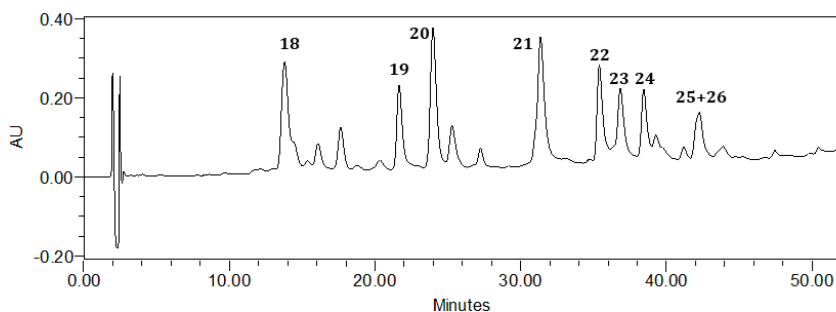


**Figura 4.12.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, variedad 'Reina Claudia Verde' [Pd-CC-5a(RCV)], a 230 nm.

- b) El segundo grupo se caracteriza por presentar el pico **18** como mayoritario. Aunque en el cromatograma de la variedad 'Claudia de Tolosa' (recogida en la parcela 1) (**Figura 4.13**), el resto de picos se muestran con una relativa baja abundancia, no ocurre así, en el de 'Claudia de Tolosa' (recogida en la parcela 2) (**Figura 4.14**), que presenta el pico **18** mayoritario, pero también se observan los picos **21**, **23**, **25** y **26** entre los de mayor intensidad.

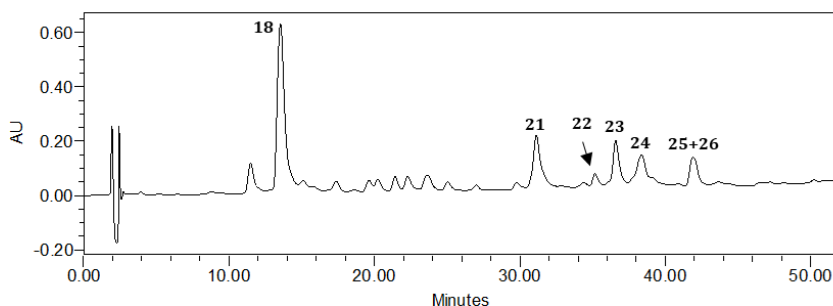


**Figura 4.13.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, variedad 'Claudia de Tolosa' [Pd-CC-2a(CT)], a 230 nm.

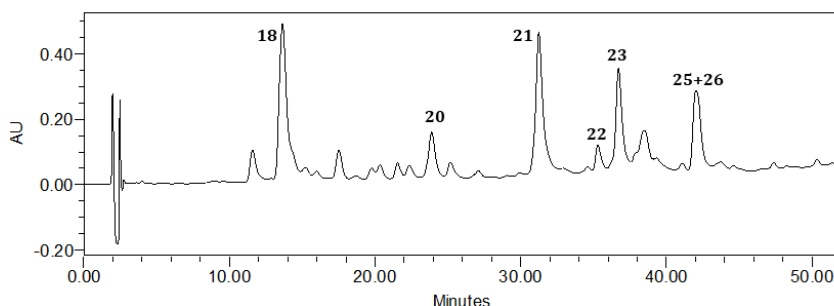
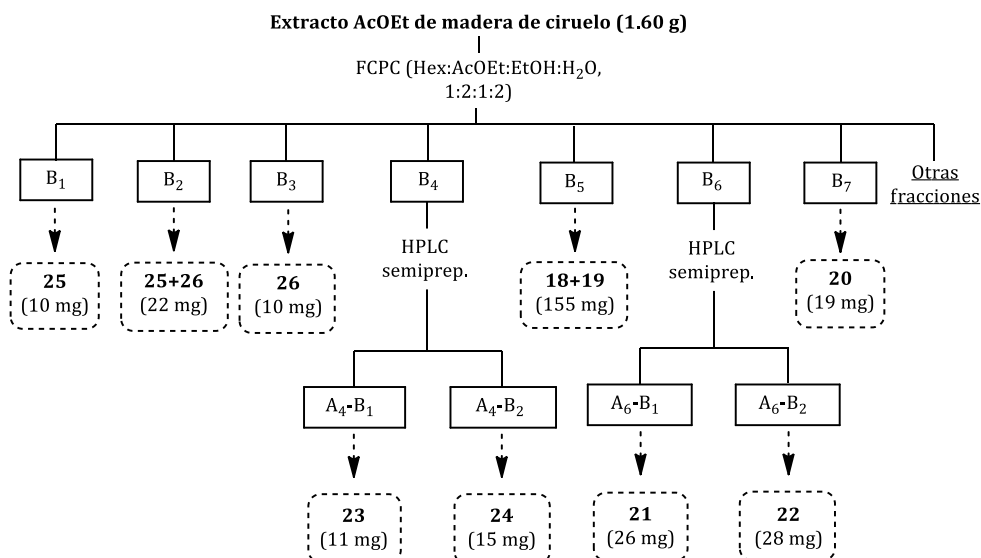


**Figura 4.14.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, variedad 'Claudia de Tolosa' [Pd-CC-6a(CT)], a 230 nm.

#### **4.2.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de ciruelo europeo y aislamiento de flavonoides y proantocianidinas**

De entre todos los extractos de madera de ciruelo europeo estudiados, se seleccionó, atendiendo a su mayor rendimiento de extracción y a su perfil cromatográfico, el de la variedad 'De la Rosa', para continuar con la siguiente etapa de aislamiento de compuestos. En primer lugar se llevó a cabo un fraccionamiento del extracto (1.60 g) empleando la técnica de FCPC. Las diferentes fracciones recogidas se chequearon por HPLC y CCF, se reunieron aquellas que presentaban igual composición y se desecharon las que no presentaban interés. Esto permitió obtener 7 fracciones principales a partir de las cuales se aislaron los productos mostrados en el **Esquema 4.5**.



**Esquema 4.5.** Fraccionamiento y aislamiento de componentes del extracto de AcOEt de madera de ciruelo de la variedad 'De la Rosa'.

Como se observa en la **Figura 4.15**, la agrupación B<sub>2</sub> estaba constituida por los compuestos **25** y **26**, los cuales presentan una polaridad muy parecida. A la vista del cromatograma (**Figura 4.15**) se puede apreciar la complejidad de separar ambas estructuras mediante HPLC semipreparativo o cromatografía en columna. Sin embargo, la técnica FCPC permitió obtener fracciones enriquecidas en el compuesto **25** (agrupación B<sub>1</sub>) y en el compuesto **26** (agrupación B<sub>3</sub>), lo que hizo posible su elucidación estructural mediante RMN.

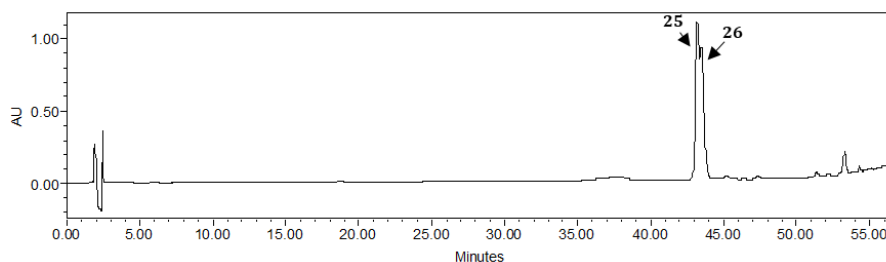


**Figura 4.15.** Perfil cromatográfico de la agrupación B<sub>2</sub> obtenida a partir del fraccionamiento del extracto de ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa', a 280 nm.

La agrupación B<sub>4</sub> se cromatografió por HPLC semipreparativo, empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo y agua, que permitieron el aislamiento de los compuestos puros **23** y **24**.

Se comprobó que la agrupación B<sub>5</sub>, tras su análisis por HPLC-DAD, estaba constituida por dos compuestos principalmente, **18** y **19**, los cuales presentaban un tiempo de retención de 13.8 y 21.4 minutos, respectivamente.

La agrupación B<sub>6</sub> se cromatografió de nuevo por HPLC semipreparativo con mezclas de acetonitrilo y agua, obteniéndose los compuestos puros **21** y **22**. Por último, la agrupación B<sub>7</sub> contenía el compuesto **20** puro.

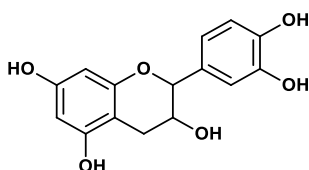
#### ***4.2.3 Elucidación estructural de los compuestos aislados e identificados en madera de ciruelo europeo***

El trabajo cromatográfico descrito en el apartado anterior, llevado a cabo sobre el extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, permitió el aislamiento de siete compuestos (**20–26**), cuya caracterización se efectuó por RMN, EM y polarimetría. Además, fue posible identificar otras dos moléculas (**18** y **19**), en base a sus espectros de masas (HPLC-DAD/ESI-MS) y tiempos de retención en HPLC de muestras disponibles y caracterizadas en el laboratorio previamente.<sup>31</sup>

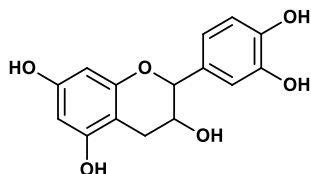
A continuación se describen las características espectroscópicas de los compuestos aislados, así como de los identificados tentativamente, ordenados atendiendo a su tiempo de retención en HPLC.

Los compuestos **18** y **19** presentaban un tiempo de retención en HPLC-DAD (**Figura 4.11**, apartado 4.2.1) de 13.8 y 21.4 minutos, respectivamente, coincidente con el de muestras auténticas de catequina y epicatequina. La identificación se confirmó analizando los fragmentos de sus espectros de masas. En ambos casos se observó un mismo pico base a  $m/z$  245, correspondiente a la pérdida de un grupo CH<sub>2</sub>CHOH. Además, se observan otros fragmentos a  $m/z$  205 y 179, debido a fragmentaciones RDA, el primero de ellos originado por la pérdida del anillo A y el segundo por la del anillo

B.<sup>480</sup> Puesto que no se llegaron a aislar completamente estos flavan-3-oles, no fue posible medir sus rotaciones ópticas, no siendo posible determinar el enantiómero del que se trata en cada caso.

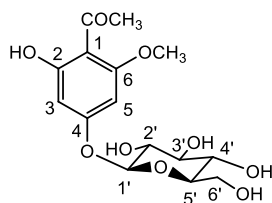


Catequina (**18**)



Epicatequina (**19**)

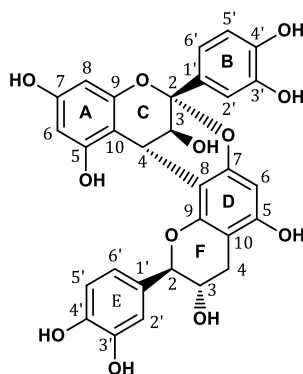
El compuesto **20** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  343  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{16}H_{22}O_8$ . Su espectro de RMN- $^1H$  presenta dos señales doblete aromáticas a 6.10 ppm (H-3) y 6.30 ppm (H-5), con acoplamiento pequeño ( $^4J=2.5$  Hz), que integran ambas por un protón cada una de ellas. También se observan dos señales singlete que integran por tres protones cada una y aparecen a un desplazamiento de 3.80 ppm ( $OCH_3$ ) y de 2.70 ppm ( $CO-CH_3$ ). El resto de señales corresponden a la unidad de glucosa, cuya unión con el aglicón se ha determinado a partir de la señal de cruce en el espectro bidimensional de HMBC entre el hidrógeno anomérico del azúcar (H-1') y el carbono 4. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observa, en primer lugar, una señal de cetona a 205.17 ppm ( $\underline{C}O$ ), dos señales de carbonos aromáticos oxigenados a 167.56 ppm (C-2,6) y a 162.22 ppm (C-4), dos señales de carbonos aromáticos a 96.42 ppm (C-3) y a 94.78 ppm (C-5), y una señal de carbono aromático cuaternario no oxigenado a 107.53 ppm (C-1). También se observan dos señales de carbonos metílicos a 56.14 ppm ( $O-\underline{C}H_3$ ) y a 35.56 ppm ( $CO-\underline{C}H_3$ ). Por último, se pueden ver las señales correspondientes a la unidad de glucosa. Las asignaciones se realizaron de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. Estos datos espectroscópicos junto con el valor de su rotación óptica específica  $[\alpha]_D^{25} -77.6^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **20** la estructura de (-)-anfenona lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>481</sup>



(-)-Anfenona (**20**)

El compuesto **21** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  575  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{12}$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar dos sistemas de espín AMX de protones aromáticos, característicos de anillos 1,3,4-trisustituido. El primero de ellos está formado por una señal doblete a 7.14 ppm (H-2'(B),  $^4J=2.1$  Hz), un doble doblete a 7.02 ppm (H-6'(B),  $^4J=2.1$  Hz;  $^3J=8.3$  Hz) y otro doblete a 6.81 ppm (H-5'(B),  $^3J=8.3$  Hz). Al segundo le corresponden las señales que se observan a 6.96 ppm (doblete, H-2'(E),  $^4J=1.5$  Hz) y a 6.84-6.86 ppm (multiplete, H-5'(E), 6'(E)). También se observa un singlete a 6.07 ppm (H-6(D)), y dos dobletes a 6.05 ppm (H-8(A)) y a 5.92 ppm (H-6(A)) que integran por un protón cada uno de ellos y presentan una constante de acoplamiento pequeña ( $^4J=2.4$  Hz). Además, se observa un sistema de espín AB aislado constituido por dos señales doblete a 4.12 ppm (H-3(C)) y a 4.23 ppm (H-4(C)) con una constante de acoplamiento de 3.5 Hz, y que es característico de los protones del anillo C de una procianidina tipo A<sup>482</sup>. Por último, se observa un doblete a 4.73 ppm (H-2(F)) con una constante de acoplamiento de 7.5 Hz que refleja una configuración relativa *trans* y, por lo tanto, una unidad inferior de catequina, además de un multiplete a 4.06 ppm (H-3(F)) y dos dobles dobletes a 2.54 ppm (H-4 $\alpha$ ,  $^3J=8.6$  Hz;  $^2J=16.3$  Hz) y a 2.94 ppm (H-4 $\beta$ (F),  $^3J=5.5$  Hz;  $^2J=16.2$  Hz). En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observan 24 señales correspondientes a carbonos aromáticos, diez de ellas corresponden a carbonos cuaternarios oxigenados a 158.18 ppm (C-7(A)), 156.68 ppm (C-5(A)), 156.17 ppm (C-5(D)), 154.11 ppm (C-9(A)), 152.23 ppm (C-7(D)), 150.85 ppm (C-9(D)), 146.82 ppm (C-3'(E)), 146.76 ppm (C-3'(B)), 146.43 ppm (C-4'(E)) y 145.67 ppm (C-4'(B)), cinco a carbonos cuaternarios a 132.24 ppm (C-1'(B)), 130.96 ppm (C-1'(E)), 106.57 ppm (C-8(D)), 104.06 ppm (C-10(A)) y 102.83 ppm (C-10(D)), y nueve a metinos a 120.33 ppm

(C-6'(E)), 119.86 ppm (C-6'(B)), 116.36 ppm (C-2'(E)), 115.74 ppm (C-2'(B)), 115.64 ppm (C-5'(E)), 115.45 ppm (C-5'(B)), 98.17 ppm (C-6(A)), 96.61 ppm (C-8(A)) y 96.56 ppm (C-6(D)). También se observa una señal típica de un carbono cetálico a 100.43 ppm (C-2(C)) que confirma la estructura de procianidina tipo A. El resto de señales corresponden a carbonos alifáticos a 83.90 ppm (C-2(F)), 68.40 ppm (C-3(F)), 67.67 ppm (C-3(C)), 29.25 ppm (C-4(C)) y 28.84 ppm (C-4(F)). Las señales fueron asignadas de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -88.0^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **21** la estructura de (-)-*ent*-epicatequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>483</sup> Esta procianidina tipo A, en forma *levo*, fue sintetizada por Sharma *et al.*<sup>483</sup> haciendo uso de reacciones estereoselectivas y a partir de productos de partida de quiralidad conocida, por lo que consideramos que su estructura y estereoquímica se establecieron inequívocamente.

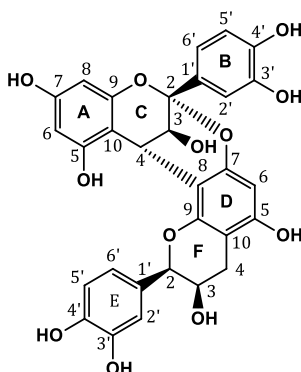


(-)-*ent*-Epicatequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catequina (**21**)

El compuesto **22** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  575  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{12}$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  coinciden con los del compuesto **21**, con la excepción de que ahora no se observa un doblete (4.73 ppm, H-2(F)) de constante de acoplamiento grande ( $^3J=7.5$  Hz), sino un singlete a 5.01 ppm (H-2(F)) indicativo de una configuración relativa *cis* y, por lo tanto, assignable a una unidad inferior de



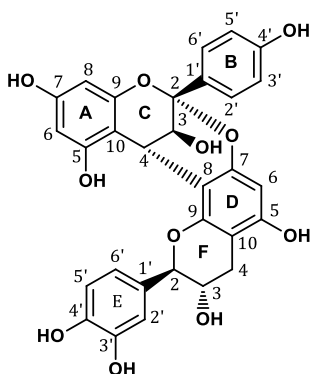
epicatequina. Los datos de RMN y de EM, junto con el valor de rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -169.0^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **22** la estructura de (-)-*ent*-epicatequina-( $2\alpha \rightarrow O \rightarrow 7, 4\alpha \rightarrow 8$ )-epicatequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía<sup>483</sup> por Sharma *et al.*, para una procianidina tipo A obtenida inequívocamente por síntesis asimétrica.



(-)-*ent*-Epicatequina-( $2\alpha \rightarrow O \rightarrow 7, 4\alpha \rightarrow 8$ )-epicatequina (**22**)

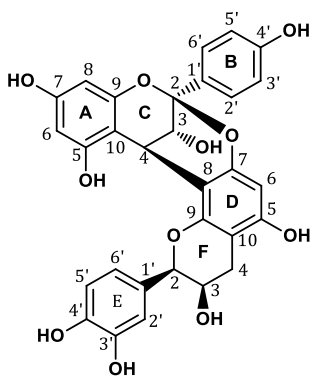
El compuesto **23** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  559  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{11}$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar un sistema de espín de protones aromáticos  $A_2B_2$  y otro AMX, indicativo de un anillo aromático 1,4-disustituido y otro 1,3,4-trisustituido. El primero de ellos está formado por las señales que aparecen a 7.49-7.53 ppm (multiplete, H-2'(B), 6'(B)) y a 6.82-6.86 ppm (multiplete, H-3'(B), 5'(B)). Al segundo corresponden las señales a 6.96 ppm (doblete, H-2'(E),  $^4J=2.2$  Hz) y 6.82-6.86 ppm (multiplete, 5'(E), 6'(E)). También se observan otras señales de protones aromáticos a 6.08 ppm (singlete, H-6(D)), y dos dobletes a 6.05 ppm (H-8(A)) y 5.93 ppm (H-6(A)) con una constante de acoplamiento de  $^4J=2.3$  Hz en ambos casos. Para este compuesto también se aprecia una señal doblete a 4.74 ppm (H-2(F)) indicativa de una configuración relativa *trans* y, por lo tanto, asignable a una unidad inferior de catequina. También se observan otras señales correspondientes a protones alifáticos: dos dobletes a 4.25 ppm (H-4(C)) y 4.13 ppm (H-3(C)) con una constante de

acoplamiento de  $^4J=3.5$  Hz y que son características de los protones del anillo C de una procianidina tipo A,<sup>482</sup> un doble triplete a 4.05 ppm (H-3(F),  $^3J=5.5$  Hz;  $^3J=8.3$  Hz) y dos dobles dobles a 2.94 ppm (H-4 $\beta$ (F),  $^3J=5.5$  Hz;  $^2J=16.2$  Hz) y 2.54 ppm (H-4 $\alpha$ ,  $^3J=8.6$  Hz;  $^2J=16.2$  Hz). En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se observan 22 señales correspondientes a carbonos aromáticos, nueve de ellas corresponden a carbonos cuaternarios oxigenados (158.93 ppm, (C-4'(B); 158.17 ppm, C-7(A); 156.67 ppm, C-5(A); 156.16 ppm, C-5(D); 154.11 ppm, C-9(A); 152.22 ppm, C-7(D); 150.86 ppm, C-9(D); 146.75 ppm, C-3'(E); y 146.41 ppm, C-4'(E)), cinco con carbonos cuaternarios (131.64 ppm, C-1'(B); 130.96 ppm, C-1'(E); 106.59 ppm, C-8(D); 104.04 ppm, C-10(A); y 102.86 ppm, C-10(D)) y ocho con metinos (129.53 ppm, C-2'(B),6'(B); 120.34 ppm, C-6'(E); 116.37 ppm, C-5'(E); 115.54 ppm, C-3'(B),5'(B); 115.45 ppm, C-2'(E); 98.20 ppm, C-6(A); 96.62 ppm, C-8(A); 96.57 ppm, C-6(D)). En este caso también se observa una señal a 100.55 ppm, característica de un carbono cetálico, confirmando la estructura de proantocianidina tipo A. El resto de señales corresponden a carbonos alifáticos (83.90 ppm, C-2(F); 68.38 ppm, C-3(F); 67.63 ppm, C-3(C); 29.28 ppm, C-4(C); y 28.82 ppm, C-4(F)). Las señales fueron asignadas de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. En este caso, como ocurría con los compuestos **21** y **22**, cuya estereoquímica había sido descrita inequívocamente,<sup>483</sup> el valor negativo de  $[\alpha]_D^{25}$  podría hacer pensar también en una unión interflavonoide  $\alpha$ . Por lo tanto, para el compuesto **23** se ha propuesto la estructura de (-)-*ent*-epiafzelequina-(2 $\alpha \rightarrow O \rightarrow 7$ , 4 $\alpha \rightarrow 8$ )-catequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>484</sup>



(-)-*ent*-Epiafzelequina-(2 $\alpha \rightarrow O \rightarrow 7$ , 4 $\alpha \rightarrow 8$ )-catequina (**23**)

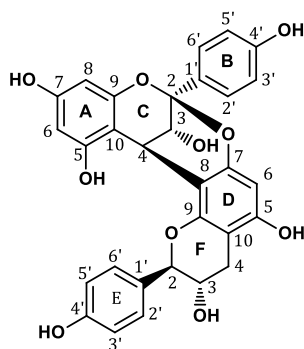
El compuesto **24** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  559  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{11}$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  coinciden con los del compuesto **23**, con la excepción de que en este caso, como ocurría con el compuesto **22**, no se observa un doblete a 4.74 ppm (H-2(F),  $^3J=8.1$  Hz), sino un singlete a 5.03 ppm (H-2(F)) indicativo de una configuración relativa *cis* y, por lo tanto, assignable a una unidad inferior de epicatequina. En este caso, el valor positivo de  $[\alpha]_D^{25}$ , contrario al determinado para los compuestos **21** y **22**, cuya unión interflavonoide era  $\alpha$ , podría hacernos pensar que la unión entre monómeros en **24** será  $\beta$ . De hecho, todas las proantocianidinas diméricas tipo A con unión interflavonoide  $\beta$  descritas en bibliografía, de las que se conoce su poder rotatorio, son dextrorrotatorias.<sup>485-487</sup> Por ello se ha propuesto para el compuesto **24** la estructura de (+)-epiafzelequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>488</sup>



(+)-Epiafzelequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina (**24**)

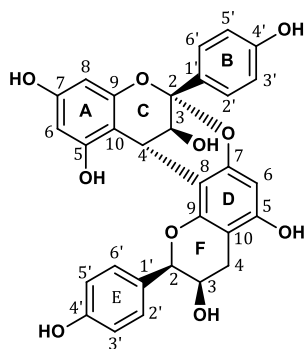
El compuesto **25** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  543  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{10}$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar dos sistemas de espín de protones aromáticos  $A_2B_2$  que indican la presencia de dos anillos aromáticos 1,2-disustituídos. El primero de ellos está formado por las señales que aparecen a 7.49-7.52 ppm

(multiplete, H-2'(B), 6'(B)) y a 6.81-6.84 ppm (multiplete, H-3'(B), 5'(B)) e integran por 2 hidrógenos cada una de ellas. El segundo lo constituyen las señales que se observan a 7.35-7.38 ppm (multiplete, H-2'(E), 6'(E)) y a 6.86-6.887 ppm, y que igualmente integran por dos protones cada una de ellas. También se observan otras señales asignables a protones aromáticos: un singlete a 6.08 ppm (H-6(D)) y dos dobletes, uno a 6.05 ppm (H-8(A)) y otro a 5.92 ppm (H-6(A), ambos con una constante de acoplamiento de  $^4J=2.4$  Hz. En este caso, como también ocurría para los compuestos **21** y **23**, se observa un doblete a 4.76 ppm (H-2(F)) con una constante de 8.3 Hz, lo cual es indicativo de una configuración relativa *trans* y, por tanto, asignable a una unidad inferior de afzelequina. Igualmente, como en los casos anteriores, también aparecen dos señales doblete a 4.23 ppm (H-4(C)) y 4.12 ppm (H-3(C)) con una constante de acoplamiento de 3.7 Hz, y que corresponden a los protones del anillo C de una proantocianidina tipo A. Por último, aparecen otras señales características de protones alifáticos a 4.08 ppm (doble triplete, H-3(F),  $^3J=5.4$  Hz;  $^3J=8.6$  Hz), a 2.98 ppm (doble doblete, H-4 $\beta$ (F),  $^3J=5.5$  Hz;  $^2J=16.3$  Hz) y a 2.55 ppm (doble doblete, H-4 $\alpha$ (F),  $^3J=9.2$  Hz;  $^2J=16.3$  Hz). En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se observan 19 señales asignables a carbonos aromáticos, de las cuales, ocho corresponden a carbonos cuaternarios oxigenados (158.94 ppm, C-4'(E); 158.90 ppm, C-4'(B); 158.19 ppm, C-7(A); 156.71 ppm, C-5(D); 156.15 ppm, C-5(A); 154.11 ppm, C-9(A); 152.26 ppm, C-7(D); y 150.96 ppm, C-9(D)), cinco a carbonos cuaternarios (131.66 ppm, C-1'(E); 131.23 ppm, C-1'(B); 106.62 ppm, C-8(D); 104.01 ppm, C-10(A); 102.97 ppm, C-10(D)) y seis a metinos (129.97 ppm, C-2'(B), 6'(B); 129.53 ppm, C-2'(E), 6'(E); 116.35 ppm, C-3'(B), 5'(B); 115.53 ppm, C-3'(E), 5'(E); 98.14 ppm, C-6(A); 96.59 ppm, C-8(A), 6(D)). También aparecen una señal a 100.55 ppm (C-2(C)), característica de carbono cetálico, confirmando la estructura de proantocianidina tipo A. Otras señales aparecen a 83.89 ppm (C-2(F)), 68.38 ppm (C-3(F)), a 67.66 ppm (C-3(C)) y 29.29 ppm (C-4(C), 4(F)). Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} +22.2^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **25** la estructura de (+)-epiafzelequina-(2 $\beta \rightarrow O \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$ )-afzelequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>485</sup>



(+)-Epiafzelequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-afzelequina (**25**)

El compuesto **26** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  543  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{10}$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  coinciden con los del compuesto **25**, con la excepción de que en este caso, como ocurría con los compuestos **22** y **24**, no se observa un doblete a 4.74 ppm (H-2(F),  $^3J=8.1$  Hz), sino un singlete a 5.07 ppm (H-2(F)), indicativo de una configuración relativa *cis* y, por lo tanto, asignable a una unidad inferior de epiafzelequina. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -55.5^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **26** la estructura de (-)-*ent*-epiafzelequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epiafzelequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>489</sup>



(-)-*ent*-Epiafzelequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epiafzelequina (**26**)

En total, se han encontrado nueve compuestos en el extracto de madera de ciruelo europeo, de entre los cuales, siete se han aislado y caracterizado por RMN, EM y polarimetría, y dos se han identificado por comparación con muestras auténticas (**Tabla 4.6**). En cuanto a las seis proantocianidinas dimérica, dos pertenecieron a la subfamilia de las procianidinas (**21** y **22**) y el resto a la de las propelargonidinas (**23–26**).

**Tabla 4.6.** Compuestos aislados e identificados en el extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo, variedad ‘De la Rosa’.

| Compuesto | t <sub>R</sub> (min) | Identificación                                                                     |
|-----------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 18        | 13.8                 | Catequina <sup>a</sup>                                                             |
| 19        | 21.4                 | Epicatequina <sup>a</sup>                                                          |
| 20        | 24.3                 | (–)-Anfenona <sup>b</sup>                                                          |
| 21        | 31.2                 | (–)-ent-Epicatequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catequina <sup>b</sup>        |
| 22        | 35.2                 | (–)-ent-Epicatequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epicatequina <sup>b</sup>     |
| 23        | 36.6                 | (–)-ent-Epiafzelequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catequina <sup>b</sup>      |
| 24        | 38.2                 | (+)-Epiafzelequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina <sup>b</sup>         |
| 25        | 42.1                 | (+)-Epiafzelequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-afzelequina <sup>b</sup>          |
| 26        | 42.1                 | (–)-ent-Epiafzelequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epiafzelequina <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> Identificado por HPLC–DAD/ESI–MS y tiempo de retención en HPLD–DAD; <sup>b</sup> Aislado y caracterizado por RMN.

Los compuestos **20–26** se han aislado por primera vez a partir de *Prunus domestica* L. durante esta Tesis, si bien algunos de ellos se habían encontrado previamente en otras especies del género *Prunus*. Así, por ejemplo, el compuesto **20** se ha identificado en el pasado en raíz de *P. armeniaca* L.,<sup>490</sup> y los compuestos **21–23** y **26** se han aislado a partir de flores y ramas de *P. spinosa* L.<sup>491,492</sup> Los compuestos **23**, **24** y **26** se han aislado también de raíz y partes aéreas de *P. armeniaca* L.,<sup>484,489,493</sup> y el compuesto **25** a partir de raíz de *Geranium niveum* S. Watson<sup>485</sup> Por último, el compuesto **26** se ha encontrado en las partes aéreas de *P. prostata* L.<sup>494</sup> Algunos de estos compuestos también se han identificado en especies de otros géneros, como *Artemisia annua* L. (**20**),<sup>481</sup> *Pawetta owariensis* P. Beauv (**21**),<sup>495</sup> *Ephedra* sp. (**22** y **26**)<sup>496</sup> y *Carallia brachiate* L. (**26**).<sup>497</sup> En trabajos más recientes se ha aislado el

compuestos **23** a partir de *Spenceria ramalana* Trim.,<sup>482</sup> y el **26** del tallo de *Ephedra sínica* Stapf.<sup>498</sup>

Los extractos de madera de ciruelo europeo son ricos en compuestos polifenólicos, como proantocianidinas y flavan-3-oles. Estos compuestos son interesantes desde el punto de vista farmacológico debido a sus numerosas propiedades biológicas (Véase apartado 1.2 en Antecedentes Bibliográficos). Más específicamente, el compuesto **21** presenta una potencial actividad inhibitoria de la enzima 5-lipoxigenasa,<sup>499</sup> el **23** reduce la formación de productos finales de la glicación avanzada (*advanced glycation end-products*, AGEs) en pacientes con diabetes y que son responsables de complicaciones vasculares,<sup>482</sup> y el **26** ha demostrado actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa.<sup>497</sup> Por otro lado, la anfenona (**20**) presenta interesantes actividades biológicas como antioxidante,<sup>500</sup> antituberculosis,<sup>501</sup> antiviral contra la Hepatitis B,<sup>502</sup> antiproliferativa de la línea celular humana HepG2 de cáncer de hígado,<sup>503</sup> así como efectos positivos para prevenir y tratar la osteoporosis promoviendo la formación de colágeno y la mineralización ósea,<sup>504</sup> y para inducir apoptosis en células pulmonares con fibroplastia en ensayos *in vitro*.<sup>505</sup>

#### ***4.2.4 Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de madera de ciruelo europeo de las diferentes variedades estudiadas***

La concentración de cada uno de los compuestos identificados en madera de ciruelo europeo se determinó por calibración externa haciendo uso de la técnica HPLC-DAD. En este caso fue necesario el empleo de tres rectas de calibrado, una por cada familia de compuestos (como se ha descrito en el apartado 4.1.4 para la madera de cerezo), que correlacionaran la señal obtenida (a 280 nm para (-)-anfenona y a 230 nm para el resto de compuestos) en el equipo HPLC-DAD con la concentración de compuesto en cada caso. Para ello se prepararon disoluciones patrón de concentraciones comprendidas en el rango de 0.05 mg/mL a 1.00 mg/mL de (-)-catequina, con la que se cuantificaron los compuestos **18** y **19**; (-)-anfenona, usada para determinar la concentración del compuesto **20**; y procianidina A-2, empleada para

cuantificar los dímeros tipo A **21-26** La expresión matemática de cada recta patrón se recoge en la **Tabla 4.7**.

**Tabla 4.7.** Rectas de calibrado empleadas para la cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de las muestras de madera de ciruelo europeo de las diferentes variedades estudiadas.

| Compuesto        | Recta de calibrado                          |
|------------------|---------------------------------------------|
| (-)-Catequina    | $y = 44016x - 907133$ ( $r^2 = 0.9934$ )    |
| (-)-Anfenona     | $y = 30000000x - 58648$ ( $r^2 = 0.9989$ )  |
| Procianidina A-2 | $y = 40000000x - 842819$ ( $r^2 = 0.9986$ ) |

Interpolando el valor del área del pico a 280 nm (en la curva de calibrado pertinente) para el compuesto **20**, y a 230 nm para el resto de moléculas identificadas en los extractos, se determinó la concentración de cada uno de ellos (**Tabla 4.8**).

**Tabla 4.8.** Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de madera de ciruelo europeo de las diferentes variedades estudiadas.

| Variedad                         | Compuesto <sup>a</sup> |      |                    |                   |      |      |      |      |       |                    |
|----------------------------------|------------------------|------|--------------------|-------------------|------|------|------|------|-------|--------------------|
|                                  | Flavan-3-oles          |      |                    | Proantocianidinas |      |      |      |      |       |                    |
|                                  | 18                     | 19   | Total <sup>b</sup> | 20                | 21   | 22   | 23   | 24   | 25+26 | Total <sup>c</sup> |
| Reina Claudia Verde <sup>d</sup> | 0.99                   | 0.44 | 1.43               | 1.37              | 1.23 | 0.64 | 0.51 | 0.50 | 0.45  | 3.33               |
| Claudia de Tolosa <sup>d</sup>   | 1.37                   | 0.13 | 1.50               | 0.25              | 0.50 | 0.12 | 0.33 | 0.27 | 0.29  | 1.51               |
| Standley                         | 1.05                   | 0.40 | 1.45               | 1.52              | 1.56 | 0.55 | 0.63 | -    | 0.33  | 3.07               |
| De la Rosa                       | 0.82                   | 0.61 | 1.43               | 2.34              | 2.49 | 1.72 | 1.04 | 1.95 | 1.31  | 8.51               |
| Reina Claudia Verde <sup>e</sup> | 1.32                   | 0.77 | 2.09               | 2.21              | 1.41 | 0.75 | 0.65 | 0.55 | 0.60  | 3.36               |
| Claudia de Tolosa <sup>e</sup>   | 1.07                   | 0.11 | 1.18               | 0.49              | 0.94 | 0.16 | 0.56 | -    | 0.56  | 2.22               |

<sup>a</sup> Valores (mg compuesto/g madera seca) expresados como el valor medio de las dos réplicas. En todos los casos la desviación estándar fue inferior a 0.001; <sup>b</sup> Contenido total de flavan-3-oles: Suma de **18** y **19**; <sup>c</sup> Contenido total de proantocianidinas: Suma de **21-26**. <sup>d</sup>Muestra recogida en la parcela 1; <sup>e</sup>Muestra recogida en la parcela 2.



Centrando la atención en la familia de flavan-3-oles se observa que en todos los extractos analizados, la cantidad de catequina (**18**) encontrada es superior a la de epicatequina (**19**), presentando la variedad 'Claudia de Tolosa' (parcela 1) el mayor valor del primero, y el de 'Reina Claudia Verde' (parcela 2) la concentración más alta del segundo. En cuanto al contenido total en este grupo de flavonoides, la concentración total encontrada se situó entre 1.18 ('Claudia de Tolosa', parcela 2) y 2.09 ('Reina Claudia Verde', parcela 2) mg de compuesto por gramo de madera seca. Respecto al compuesto **20**, el valor más alto fue detectado en la variedad 'De la Rosa'. Por último, la familia de las proantocianidinas es la más abundante en todas las muestras estudiadas. El valor de concentración total más elevado fue el de la variedad 'De la Rosa' y el más pequeño el de 'Claudia de Tolosa' (parcela 1). También se observa que las procianidinas (**21** y **22**) son más abundantes que las propelargonidinas (**23-26**). De acuerdo a los resultados de cuantificación obtenidos, la madera de la variedad 'De la Rosa' es la fuente natural más interesante para continuar aislando este tipo de compuestos en el futuro, si fuera necesario, dado que presenta unos valores de concentración muy superiores al resto de variedades.

#### **4.3 Estudio de la parte leñosa de poda de ciruelo japonés (*Prunus salicina* L.)**

Otro de los objetivos planteados para esta Tesis fue el de estudiar la madera de poda de ciruelo japonés. Para ello se seleccionaron una serie de variedades cultivadas en España, teniendo en cuenta diferentes aspectos como propiedades organolépticas o época de maduración del fruto, con el fin de estudiar aquellas más representativas del conjunto.

##### **4.3.1 Material vegetal, obtención de extractos de madera de ciruelo japonés y análisis**

Las muestras de madera de poda de las seis variedades seleccionadas se recogieron en octubre de 2015 en el centro IFAPA "Las Torres-Tomejil", situado en la

localidad de Alcalá del Río (Sevilla), coincidiendo con la época de poda de este frutal. Se recogieron muestras de cultivo convencional y una misma muestra cultivada de forma ecológica ('Angeleno'). El mismo día también se recogió una muestra de la variedad 'Angeleno' en una explotación agraria situada en Guadalquivir (Córdoba), con el fin de conocer la influencia de las condiciones edafológicas, medioambientales y agronómicas sobre la composición química de la madera. Todas las muestras se extrajeron siguiendo el procedimiento empleado con las maderas de cerezo y ciruelo europeo (*Esquema 4.1*, apartado 4.1.1) (*Tabla 4.8*).

**Tabla 4.8.** Rendimientos de extracción de las muestras de madera de ciruelo japonés de las diferentes variedades estudiadas.

| Variedad                    | Variedad  | DCM (%) | AcOEt (%) |
|-----------------------------|-----------|---------|-----------|
| Ps-SE-1a(Sg) <sup>a</sup>   | Songold   | 0.1     | 0.9       |
| Ps-SE-2a(An) <sup>a</sup>   | Angeleno  | 0.4     | 0.9       |
| Ps-SE-3a(An) <sup>a,b</sup> | Angeleno  | 0.3     | 0.7       |
| Ps-CO-1a(An) <sup>c</sup>   | Angeleno  | 0.5     | 1.0       |
| Ps-SE-4a(Fo) <sup>a</sup>   | Fortune   | 0.3     | 0.6       |
| Ps-SE-5a(Rb) <sup>a</sup>   | Red Beaut | 0.4     | 1.2       |
| Ps-SE-6a(So) <sup>a</sup>   | Souvenir  | 0.7     | 1.1       |
| Ps-SE-7a(Sh) <sup>a</sup>   | Showtime  | 0.4     | 1.5       |

<sup>a</sup> Muestras recogidas en Alcalá del Río (Sevilla); <sup>b</sup> Muestra procedente de cultivo ecológico; <sup>c</sup> Muestra recogida en Guadalquivir (Córdoba).

Del mismo modo que ocurría con las maderas de ciruelo europeo (Apartado 4.2.1), los rendimientos de extracción con AcOEt de las maderas de ciruelo japonés son mayores que los obtenidos con DCM (*Tabla 4.8*). Centrando la atención en el extracto de AcOEt, se observa que el mayor valor lo ofrece la variedad 'Showtime' y el menor la variedad 'Fortune'. Respecto a las tres muestras de la variedad 'Angeleno' estudiadas, no se observan grandes diferencias en cuanto a su rendimiento de extracción, siendo el mayor para la muestra recogida en Córdoba y el menor para la recogida en Sevilla, procedente de cultivo ecológico.

Los extractos de AcOEt obtenidos se analizaron por HPLC–DAD con el fin de conocer su perfil cromatográfico (**Figuras 4.16-4.23**). La comparación de todos ellos permite deducir que guardan una gran similitud entre sí, a diferencia de lo que sucedía con las variedades de ciruelo europeo (o también de cerezo). Al mismo tiempo, los cromatogramas HPLC de las variedades de ciruelo japonés presentan una gran similitud con los observados para las muestras de ciruelo europeo, lo cual permitió identificar los diferentes picos en los cromatogramas por comparación de sus tiempos de retención y sus patrones de fragmentación observados en el análisis por HPLC–DAD/ESI–MS.

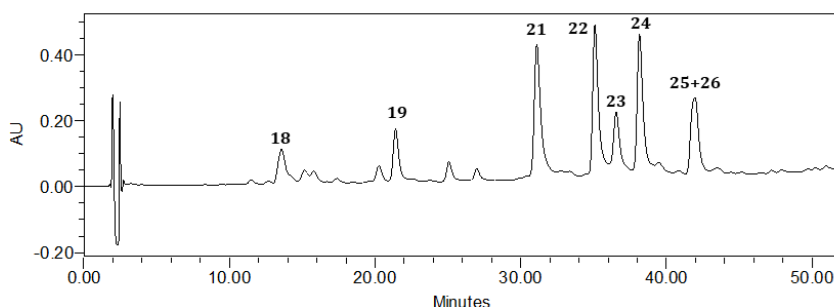


**Figura 4.16.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Songold' [Ps-SE-1a(Sg)], a 230 nm.

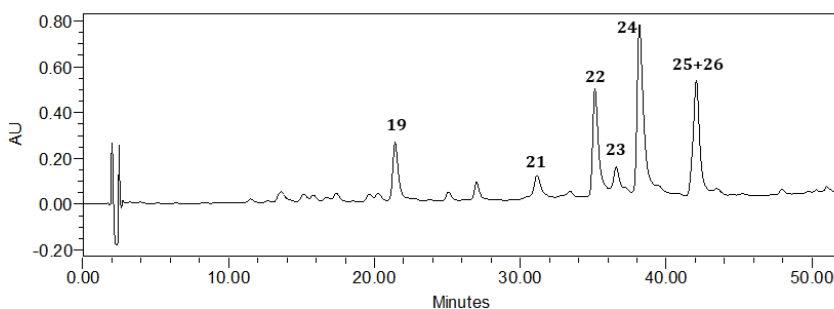


**Figura 4.17.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Angeleno' [Ps-SE-2a(An)], a 230 nm.

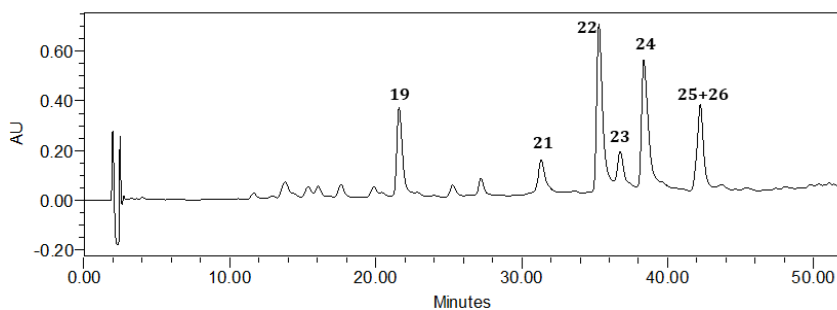


**Figura 4.18.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Angeleno' [Ps-SE-3a(An)] ecológico, a 230 nm.

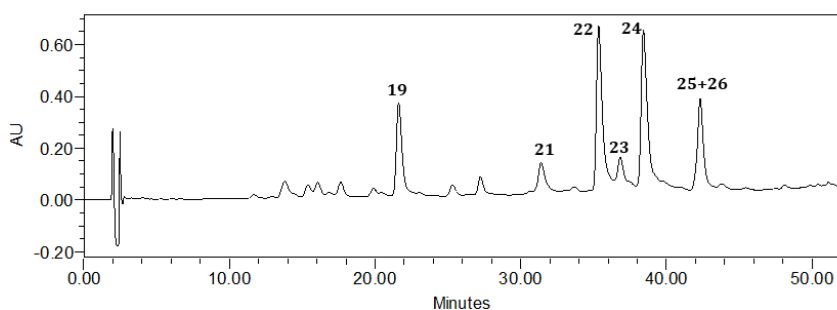


**Figura 4.19.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Angeleno' [Ps-CO-1a(An)], a 230 nm.

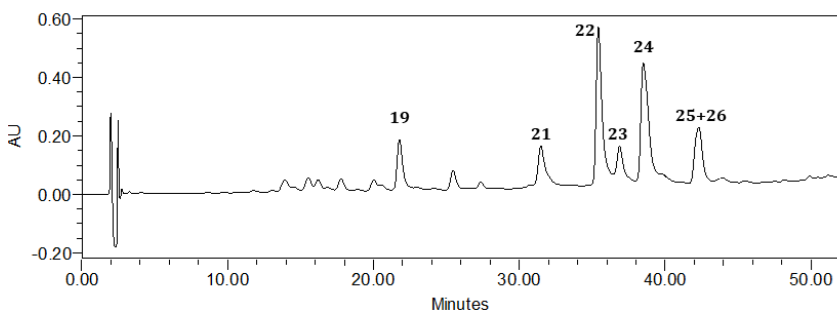


**Figura 4.20.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Fortune' [Ps-SE-4a(Fo)], a 230 nm.

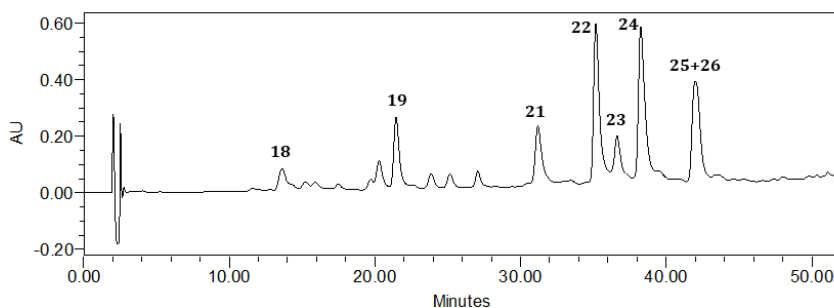


**Figura 4.21.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Red Beaut' [Ps-SE-5a(Rb)], a 230 nm.

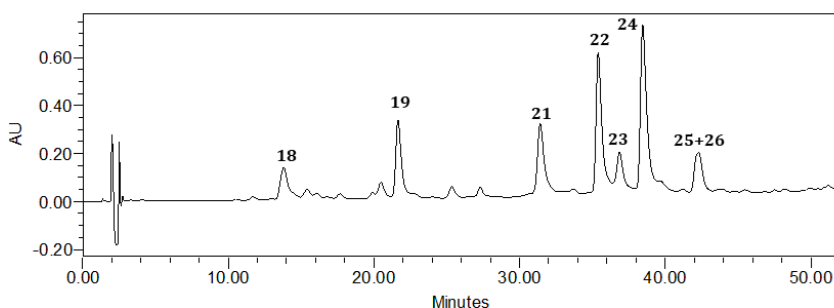


**Figura 4.22.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Souvenir' [Ps-SE-6a(So)], a 230 nm.

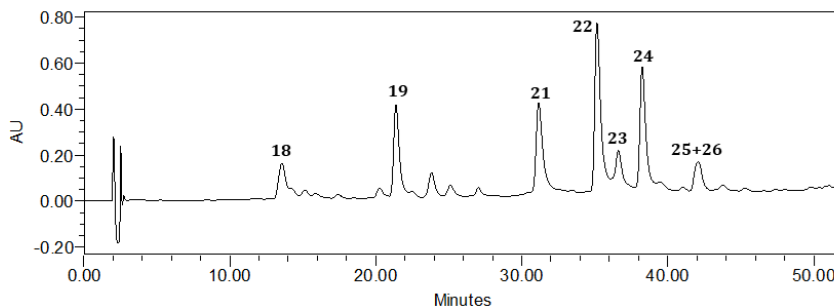


**Figura 4.23.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés, variedad 'Showtime' [Ps-SE-7a(Sh)], a 230 nm.

Atendiendo al perfil cromatográfico de los extractos de AcOEt de las variedades de ciruelo japonés estudiadas se deduce que los picos más destacados son **19**, **22**, **24**, **25** y **26**. En el de la variedad 'Songold', además, se encuentra el componente **21** entre los principales. Por otra parte, sólo en las variedades 'Songold', 'Red Beaut', 'Souvenir' y 'Showtime' se detectaron cantidades significativas del pico **18** (**Figuras 4.16, 4.21-4.23**).

### 4.3.2 Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de madera de ciruelo japones de las diferentes variedades estudiadas

Como se ha comentado en el apartado anterior, la identificación de componentes en los extractos de ciruelo japonés se ha podido realizar a partir de los resultados obtenidos para ciruelo europeo, por lo que la concentración de dichos componentes se ha hecho empleando las mismas rectas de calibrado elaboradas para ciruelo europeo y que están descritas en el apartado 4.2.4. La cuantificación de componentes se recoge en la **Tabla 4.9**.

**Tabla 4.9.** Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de madera de ciruelo japonés de las diferentes variedades estudiadas.

| Variedad                | Compuesto <sup>a</sup> |      |                    |                   |      |      |      |       |                    |
|-------------------------|------------------------|------|--------------------|-------------------|------|------|------|-------|--------------------|
|                         | Flavan-3-oles          |      |                    | Proantocianidinas |      |      |      |       |                    |
|                         | 18                     | 19   | Total <sup>b</sup> | 21                | 22   | 23   | 24   | 25+26 | Total <sup>c</sup> |
| Songold                 | 0.21                   | 0.23 | 0.44               | 0.60              | 0.58 | 0.25 | 0.54 | 0.42  | 2.39               |
| Angeleno <sup>d</sup>   | 0.10                   | 0.33 | 0.43               | 0.17              | 0.59 | 0.13 | 0.99 | 0.71  | 2.59               |
| Angeleno <sup>d,e</sup> | 0.11                   | 0.34 | 0.45               | 0.18              | 0.64 | 0.14 | 0.56 | 0.38  | 1.90               |
| Angeleno <sup>f</sup>   | 0.16                   | 0.52 | 0.68               | 0.22              | 0.90 | 0.18 | 0.99 | 0.54  | 2.83               |
| Fortune                 | 0.06                   | 0.17 | 0.23               | 0.18              | 0.49 | 0.12 | 0.48 | 0.25  | 1.52               |
| Red Beaut               | 0.22                   | 0.43 | 0.65               | 0.42              | 0.92 | 0.24 | 0.97 | 0.81  | 3.36               |
| Souvenir                | 0.31                   | 0.51 | 0.82               | 0.55              | 0.89 | 0.24 | 1.11 | 0.38  | 3.17               |
| Showtime                | 0.51                   | 0.85 | 1.36               | 1.01              | 1.55 | 0.34 | 1.13 | 0.41  | 4.44               |

<sup>a</sup> Valores (mg compuesto/g madera seca) expresados como el valor medio de las dos replicas. En todos los casos la desviación estándar fue inferior a 0.001; <sup>b</sup> Contenido total de flavan-3-oles: Suma de **18** y **19**; <sup>c</sup> Contenido total de proantocianidinas: Suma de **22-26**. Muestra recogida en <sup>d</sup>Sevilla y <sup>e</sup>Córdoba. <sup>e</sup>Muestra procedente de cultivo ecológico.

La concentración total de flavan-3-oles en las muestras de madera de ciruelo japonés (0.23–1.36 mg/g madera) fue inferior a la encontrada en ciruelo europeo (1.18–2.09 mg/g madera; apartado 4.2.2), aunque en este caso, el compuesto epicatequina (**19**) fue más abundante que catequina (**18**). El valor de concentración

más alto en el grupo de los flavonoides correspondió a la variedad 'Showtime', seguida de 'Souvenir' y de 'Angeleno' (recogido en Córdoba). Por el contrario, la concentración total en proantocianidinas en esta especie (1.52–4.44 mg/g madera) sí que se situó en el rango del ciruelo europeo (1.51–3.56 mg/g madera), sin incluir la variedad 'De la Rosa', la cual presentó un valor muy superior al resto (8.51 mg/g madera). En cuanto al grupo de las proantocianidinas, la concentración total más alta se encontró en el extracto de la variedad 'Showtime', seguida de 'Red Beaut' y 'Souvenir', siendo el compuesto **22** mayoritario en las variedades 'Angeleno' (cultivo ecológico), 'Fortune' y 'Showtime', mientras que **24** fue mayoritario en los extractos de las variedades 'Angeleno' (recogidas en Sevilla y Córdoba), 'Red Beaut' y 'Souvenir'. Por último, la procianidina **21** es mayoritaria en la variedad 'Songold'. En la madera de ciruelo japonés no se detectó el pico **20** detectado en ciruelo europeo.

#### **4.4 Estudio de la parte leñosa de poda de lichi (*Litchi chinensis* Sonn.)**

##### **4.4.1 Material vegetal, obtención de extractos de madera de lichi y análisis**

Las muestras de madera de lichi de las dos variedades más cultivadas en España, 'Mauritius' y 'Bengal', se recogieron en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (El Algarrobo, Málaga) en noviembre de 2019, coincidiendo con la época de poda de este frutal de origen tropical. Ambas maderas se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito para cerezo (**Esquema 4.1**, apartado 4.1.1) y los rendimientos de extracción obtenidos se recogen en la **Tabla 4.10**.

**Tabla 4.10.** Rendimientos de extracción de las muestras de madera de lichi de las dos variedades estudiadas.

| <b>Referencia</b> | <b>Variedad</b> | <b>DCM (%)</b> | <b>AcOEt (%)</b> |
|-------------------|-----------------|----------------|------------------|
| Lc-Ma-1a(Be)      | Bengal          | 0.1            | 0.9              |
| Lc-Ma-2a(Ma)      | Mauritius       | 0.4            | 0.9              |

En este caso también se obtiene un mayor rendimiento de extracción cuando se emplea acetato de etilo, como lo ya observado para las muestras de madera de ambas especies de ciruelos.

Los dos extractos de AcOEt obtenidos se analizaron por HPLC–DAD (Método de elución C; véase apartado 11.2.2 en *Materials and Methods*) con el fin de conocer su perfil cromatográfico, recogándose en las **Figuras 4.24** y **4.25** los correspondientes cromatogramas de las dos variedades de lichi estudiadas.

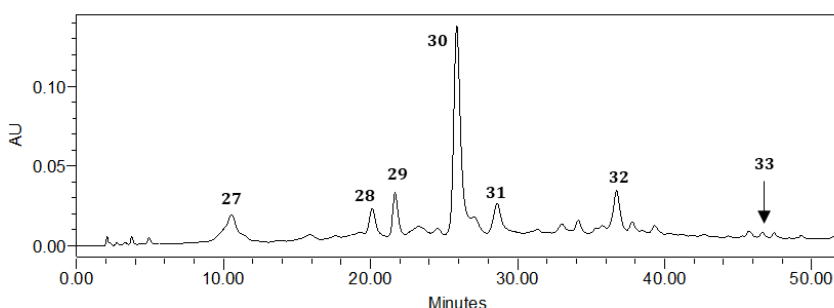


**Figura 4.24.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de lichi, variedad 'Bengal' [Lc-Ma-1a(Be)], a 280 nm.

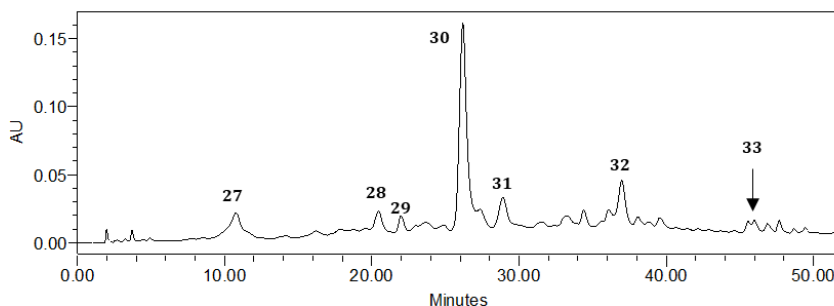


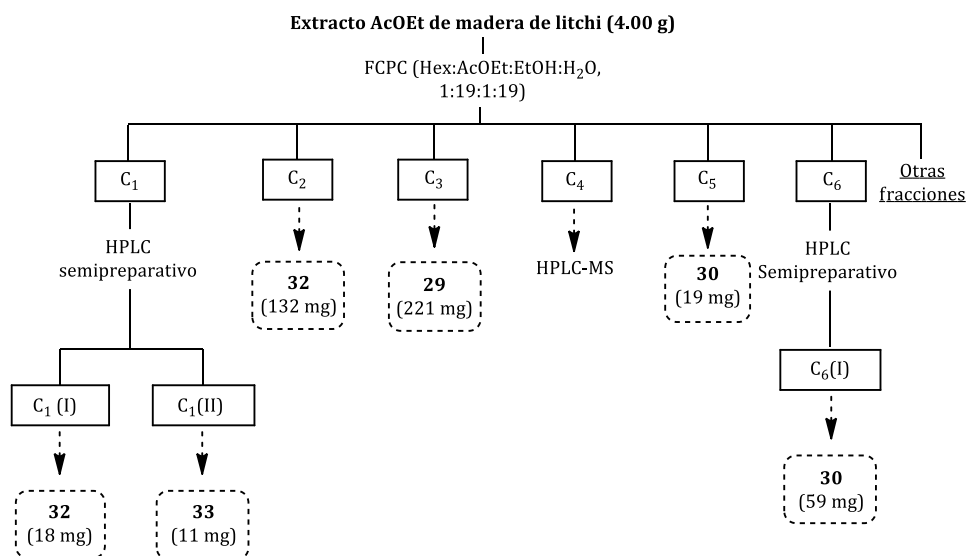
**Figura 4.25.** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de madera de lichi, variedad 'Mauritius' [Lc-Ma-2a(Ma)], a 280 nm.

Como puede deducirse de la comparación de ambos cromatogramas, no se observan diferencias significativas entre ambos extractos, como también sucedía entre las maderas de las diferentes variedades de ciruelo japonés.



#### **4.4.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de lichi y aislamiento de flavonoides y procianidinas**

Para proceder al aislamiento de componentes se seleccionó el extracto de AcOEt de la variedad 'Mauritius', por tener un mayor número de picos que 'Bengal', sobre todo en la parte final del cromatograma (**Figura 4.25**). Como en casos anteriores, el fraccionamiento del extracto (4.00 g) se inició haciendo uso de la cromatografía en contracorriente (FCPC). Las diferentes fracciones recogidas se chequearon por HPLC y CCF, se reunieron aquellas que presentaban igual composición y se desecharon las de menor interés. Esto permitió obtener 6 fracciones principales que, en algunos casos, se volvieron a cromatografiar por HPLC semipreparativo para rendir productos puros (**Esquema 4.6**).



**Esquema 4.6.** Fraccionamiento y aislamiento de componentes del extracto de AcOEt de madera de lichi de la variedad 'Mauritius'.

La agrupación C<sub>1</sub> representaba una parte importante del peso del extracto, y en su perfil cromatográfico HPLC-DAD se observaban, principalmente, dos picos. Con la intención de aislar y caracterizar estas dos moléculas, se cromatografió de nuevo por

HPLC semipreparativo empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo/agua. Esto condujo a la obtención de los compuestos puros **32** y **33**, el primero de los cuales fue identificado también en la agrupación C<sub>2</sub>.

Por otro lado, la agrupación C<sub>3</sub> presentaba en su cromatograma HPLC un único pico correspondiente al segundo componente mayoritario del extracto: el compuesto **29**.

Debido al elevado número de componentes presentes en la agrupación C<sub>4</sub> (**Figura 4.26**) se procedió a su análisis por HPLC–DAD/ESI–MS. Con ello fue posible proponer tentativamente la estructura de varias proantocianidinas minoritarias presentes en el extracto (**34–39**), como se indica en el siguiente apartado.

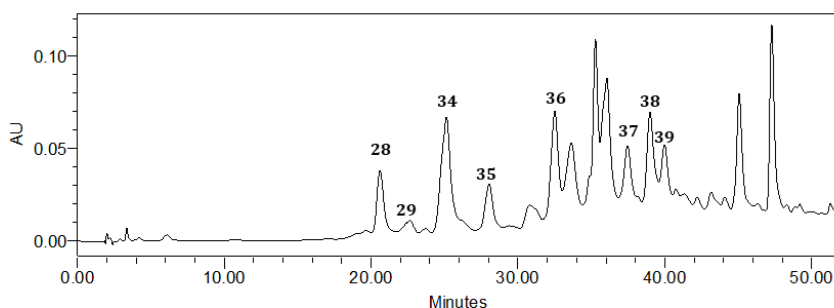


**Figura 4.26.** Cromatograma HPLC–DAD de la agrupación C<sub>4</sub>, a 280 nm, obtenida a partir del extracto de AcOEt de madera de lichi, variedad ‘Mauritius’, numerando los compuestos identificados que pertenecen a la familia de las proantocianidinas.

Las agrupaciones C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub> contenían el compuesto mayoritario del extracto. La agrupación C<sub>6</sub> se cromatografió de nuevo por HPLC semipreparativo, empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo/agua, lo que condujo a la obtención del compuesto puro **30**.

#### **4.4.3 Elucidación estructural de los compuestos aislados e identificados en madera de lichi**

El trabajo cromatográfico expuesto en el apartado anterior permitió el aislamiento de un flavan-3-ol (**29**), dos procianidinas diméricas tipo A (**32** y **33**) y una procianidina trimérica. También se ha propuesto la estructura de otra molécula de esta familia con unión tipo B (**28**), a partir de su modelo de fragmentación en EM y comparando su tiempo de retención con el de un patrón comercial. Además, ha sido posible identificar tentativamente por HPLC-DAD/ESI-MS otras dos proantocianidinas, del grupo de los compuestos mayoritarios del extracto: una proantocianidina dimérica con unión tipo A (**31**) y otra tetramérica con una unión tipo A y dos tipo B (**27**).

A continuación se describen, en orden creciente de tiempo de retención en HPLC-DAD, las características espectroscópicas que han permitido proponer la estructura de los compuestos aislados y de los identificados tentativamente.

El compuesto **27**, con un tiempo de retención en HPLC-DAD de 10.8 min, presenta un ion quasimolecular de  $m/z$  1151  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{60}H_{50}O_{24}$ , que podría corresponder a una procianidina tetramérica tipo A formada por cuatro monómeros de (epi)catequina, enlazados entre sí por un enlace tipo A y dos enlaces tipo B. En los experimentos de  $MS^2$  se observa el pico a  $m/z$  863 como ion base  $[(epi)catequina-(2 \rightarrow O \rightarrow 7,4 \rightarrow 8)-(epi)catequina-(4 \rightarrow 8)-(epi)catequina-H]^-$ , causado por la ruptura de un enlace tipo B, como consecuencia de un proceso de fragmentación QM (*quinone methide*). También se observa otro pico secundario a  $m/z$  1025  $[M-H-126 Da]^-$ , producido por una fragmentación HRF (*heterocyclic ring fission*), otro a  $m/z$  999  $[M-H-152 Da]^-$  y otro a  $m/z$  711  $[(epi)catequina-(2 \rightarrow O \rightarrow 7,4 \rightarrow 8)-(epi)catequina-(4 \rightarrow 8)-(epi)catequina-H-152 Da]^-$ , ambos originados por una fragmentación RDA (*retro-Diels-Alder*), y a  $m/z$  451 y 411, debido a una fragmentación tipo HRF (**Figura 4.27**). Este patrón de fragmentación es característico de procianidinas tetraméricas cuya unión entre la segunda y la tercera unidad es tipo A. Esto ha permitido proponer al compuesto **27** la estructura tentativa de (epi)catequina-(4 $\rightarrow$ 8)-(epi)catequina-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-(epi)catequina-(4 $\rightarrow$ 8)-(epi)catequina.

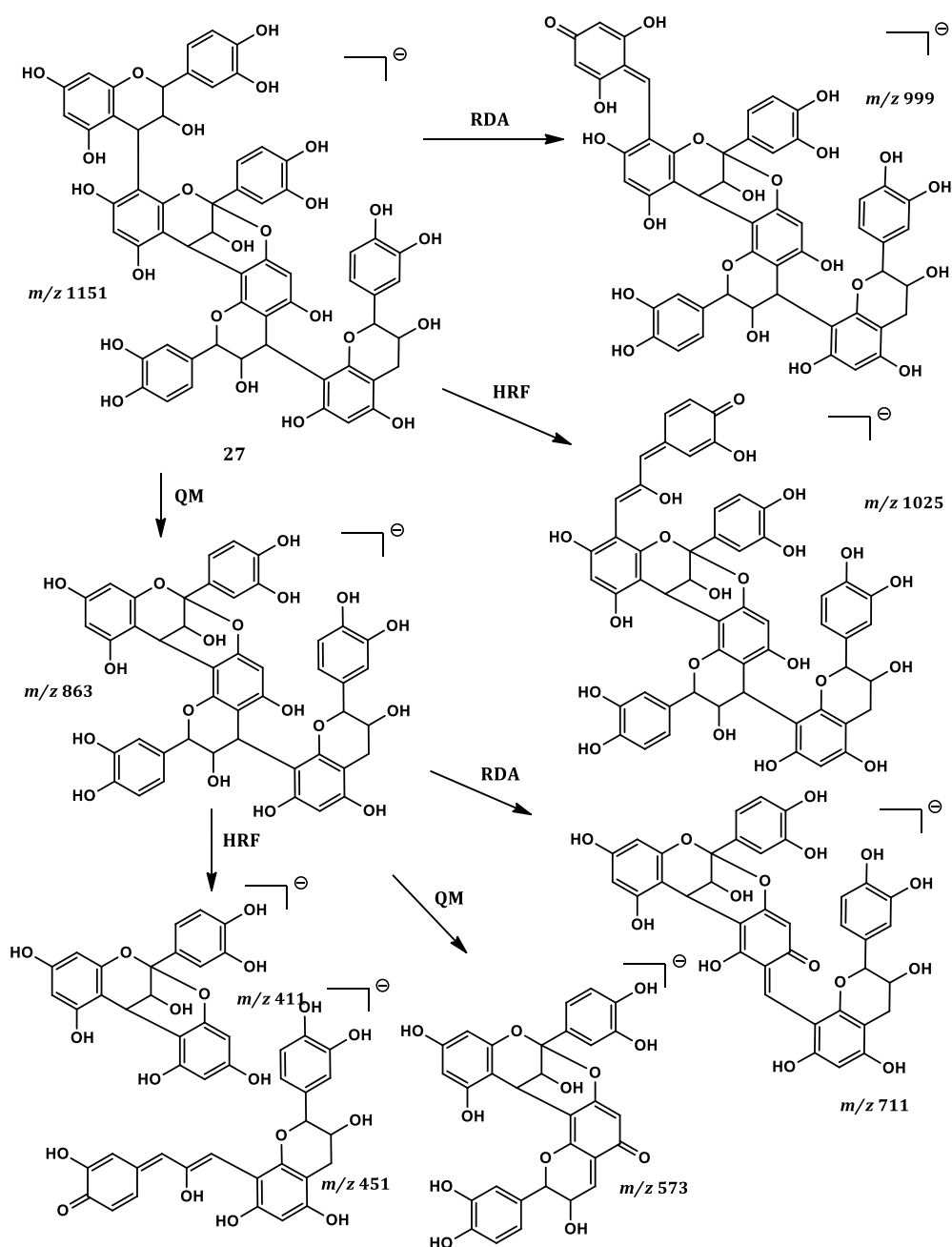


Figura 4.27. Fragmentaciones de MS y MS<sup>2</sup> observadas para el compuesto 27.

El compuesto **28**, con un tiempo de retención en HPLC-DAD de 20.4 min, presenta un espectro de masas ESI-MS (modo negativo) en el que se observa el ion quasimolecular a  $m/z$  577, compatible con una fórmula molecular de  $C_{30}H_{26}O_{12}$ , que se corresponde con una procianidina dimérica tipo B. En los espectros MS<sup>2</sup> se observa el fragmento a  $m/z$  425 [M-H-152 Da]<sup>-</sup> como pico base, producto de una fragmentación RDA. También se observan picos secundarios a  $m/z$  407 [M-H-152-18 Da]<sup>-</sup>, originado también por esa fragmentación RDA seguida de deshidratación, a  $m/z$  451 [M-H-126 Da]<sup>-</sup>, debido a una fragmentación HRF del anillo heterocíclico de la unidad superior, y a  $m/z$  289 [(epi)catequina-H]<sup>-</sup>, proveniente de la ruptura QM del enlace interflavonoide. (**Figura 4.28**). Este patrón de fragmentación es característico de procianidinas diméricas tipo B.

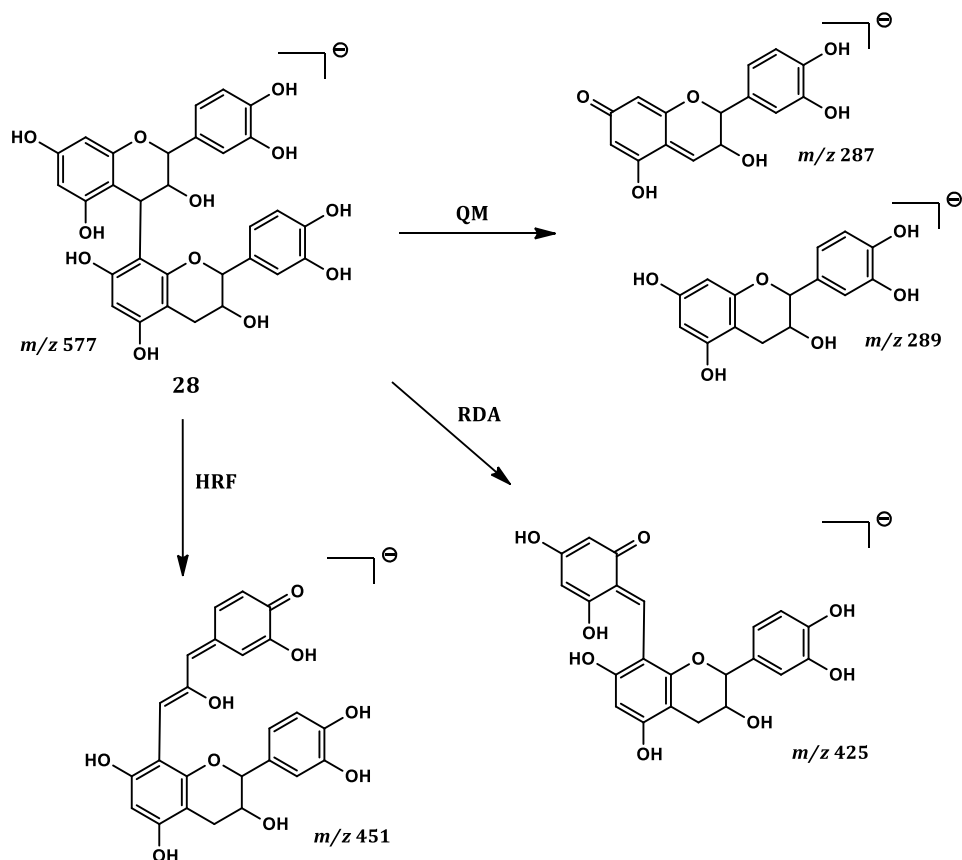
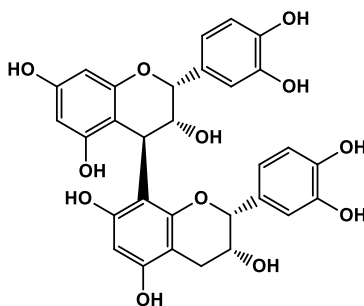


**Figura 4.28.** Fragmentaciones de MS y MS<sup>2</sup> observadas para el compuesto **28**.

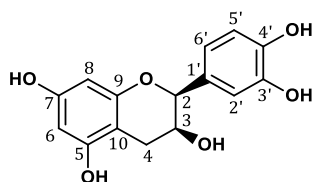
Teniendo en cuenta que el tiempo de retención en HPLC–DAD de este compuesto coincidió con el de un patrón comercial de procianidina B-2, y que este ya había sido aislado previamente el lichi,<sup>35</sup> se propuso para el compuesto **28** la estructura de epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina B-2).



Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (Procianidina B-2) (**28**)

El compuesto **29**, con un tiempo de retención en HPLC–DAD de 22.0 minutos, presenta en su espectro de masas ESI–MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  289  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{14}O_6$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar un sistema de espín de protones aromáticos del tipo ABX, con desplazamiento de 6.98 ppm (doblete, H-2',  $^4J=2.0$  Hz), 6.80 ppm (doble doblete, H-6',  $^4J=2.0$  Hz;  $^3J=8.2$  Hz) y 6.77 ppm (doblete, H-5',  $^3J=8.2$  Hz), indicativo de un anillo aromático 1,3,4-trisustituido. Por otro lado se observan otras dos señales aromáticas que aparecen como doblete a un desplazamiento de 5.95 ppm (H-6) y 5.93 ppm (H-8) y que presentan una constante de acoplamiento alílica pequeña ( $^4J=2.3$  Hz), asignables a un anillo aromático 1,2,3,5-tetrasustituido. También se observan cuatro señales alifáticas: un singlete de metino a 4.57 ppm (H-2), un multiplete a 4.17-4.19 ppm, que podría corresponder con el protón 3 unido a un carbono metínico y, por último, dos dobles dobletes a un desplazamiento de 2.86 ppm (H-4 $\alpha$ ,  $^3J=5.4$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz) y 2.74 ppm (H-4 $\beta$ ,  $^3J=8.1$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz). La multiplicidad del doblete asignado a H-2, así como sus constantes de acoplamiento, junto con las observadas para H-4 $\alpha$  y H-4 $\beta$  permiten concluir que la disposición relativa de los grupos unidos a C-2 y C-3 es 2,3-*cis*. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observan doce señales de carbonos aromáticos, cinco de

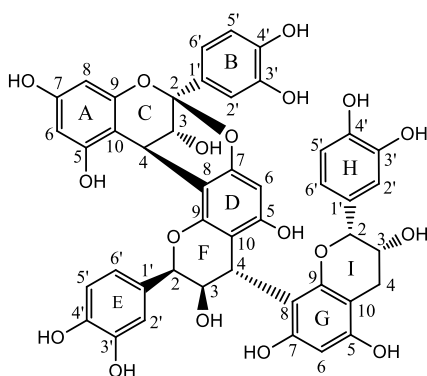
las cuales corresponden a metino y las otras siete a carbonos cuaternarios, siendo cinco de ellos oxigenados. Por otro lado, aparecen tres señales asignables a carbonos alifáticos: dos metinos y un metileno. Con estos datos espectroscópicos junto con el valor de su rotación óptica específica  $[\alpha]_D^{25} +9.7^\circ$ , es posible proponer la estructura de (+)-epicatequina para el compuesto **29**. Esto se confirma por comparación con los datos espectroscópicos recogidos en bibliografía.<sup>31</sup>



(+)-Epicatequina (**29**)

El compuesto **30**, con un tiempo de retención en HPLC–DAD de 26.2 minutos, presenta en su espectro de masas ESI–MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  863  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{45}H_{36}O_{18}$ . Su espectro de RMN- $^1H$  muestra la presencia de dos estados conformacionales diferentes en proporción 1:0.3. A continuación se discuten los datos espectrales para el rotámero mayoritario. El minoritario presenta el mismo número de señales, aunque los desplazamientos químicos son ligeramente diferentes. En el espectro de RMN- $^1H$  se observan tres sistemas de espín de protones aromáticos ABX. El primero está constituido por las señales a 7.04 ppm (doblete, H-2'(B),  $^4J=1.8$  Hz) y a 6.84-6.86 ppm (multiplete, H-5'(B),6'(B)). Al segundo corresponden las señales a 7.32 ppm (doblete, H-2'(E),  $^4J=1.9$  Hz), a 7.20 ppm (doble doblete, H-6'(E),  $^4J=1.9$  Hz;  $^3J=8.3$  Hz) y a 6.81-6.83 ppm (multiplete, H-5'(E)). El tercero está constituido por las señales a 6.81-6.83 ppm (multiplete, H-2'(H)) y a 6.74-6.77 ppm (multiplete, H-5'(E),6'(E)). Todas estas señales se han correlacionado con sus carbonos correspondientes atendiendo a las señales de cruce observadas en HSQC. Además, se observan otras cuatro señales de protones aromáticos, dos dobletes a 6.02 ppm (H-8'(A)) y a 5.57 ppm (H-6'(A)) con una constante de acoplamiento pequeña de 2.3 Hz, lo que es característico de anillo aromático 1,2,3,5-tetrasustituido, y dos señales singlete a

5.80 ppm (H-6'(D)) y a 6.10 ppm (H-6'(G)), indicativas de dos anillos aromáticos pentasustituídos. También se observan tres dobletes de metino a 3.29 ppm (H-3(C),  $^3J=3.5$  Hz), a 4.13 ppm (H-2(F),  $^3J=1.4$  Hz) y a 4.15 ppm (H-4(C),  $^4J=3.5$  Hz), tres señales singlete a 5.71 ppm (H-2(F)), a 4.56 ppm (H-4(F)) y a 4.39 ppm (H-2(I)), y dos multipletes a 3.86 ppm (H-3(I)) y a 2.83 ppm (H-4(I)). La multiplicidad de H-2(F) y H-3(F) indican una disposición 2,3-*cis* para los grupos unidos a C-2 y C-3 de la unidad central. Por otro lado, la multiplicidad de H-2(I) y H-3(I) indican también una disposición relativa 2,3-*cis* para los grupos unidos a C-2 y C-3 de la unidad terminal. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se observan 36 señales correspondientes a carbonos aromáticos, quince de ellas corresponden a carbonos cuaternarios oxigenados, ocho a carbonos cuaternarios y el resto a metinos. También se observan ocho señales correspondientes a metinos y una a metileno. Las señales fueron asignadas de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} +47.5^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **30** la estructura de (+)-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (cinamtanina B-1), lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>28,506</sup>



(+)-Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina  
(cinamtanina B-1) (**30**)



El compuesto **31**, con un tiempo de retención en HPLC–DAD de 28.8 minutos, presenta en su espectro de masas ESI–MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  575  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{30}H_{24}O_{12}$ , lo que se corresponde con una procianidina dimérica tipo A. En su espectro  $MS^2$  aparece como pico base el fragmento a  $m/z$  449  $[M-H-126\text{ Da}]^-$ , producido por una reacción HRF. También se observan otros picos secundarios, como  $m/z$  451  $[M-H-124\text{ Da}]^-$  y  $m/z$  423  $[M-H-152\text{ Da}]^-$ , producidos por fragmentaciones RDA, a  $m/z$  411  $[M-H-124\text{ Da}]^-$ , originado por una fragmentación HRF, y a  $m/z$  289, producido por la ruptura QM del enlace interflavonoide (**Figura 4.29**). A partir de la fragmentación observada ha sido posible proponer tentativamente para el compuesto **31** la estructura de (epi)catequina-(2→O→7,4→8)-(epi)catequina.

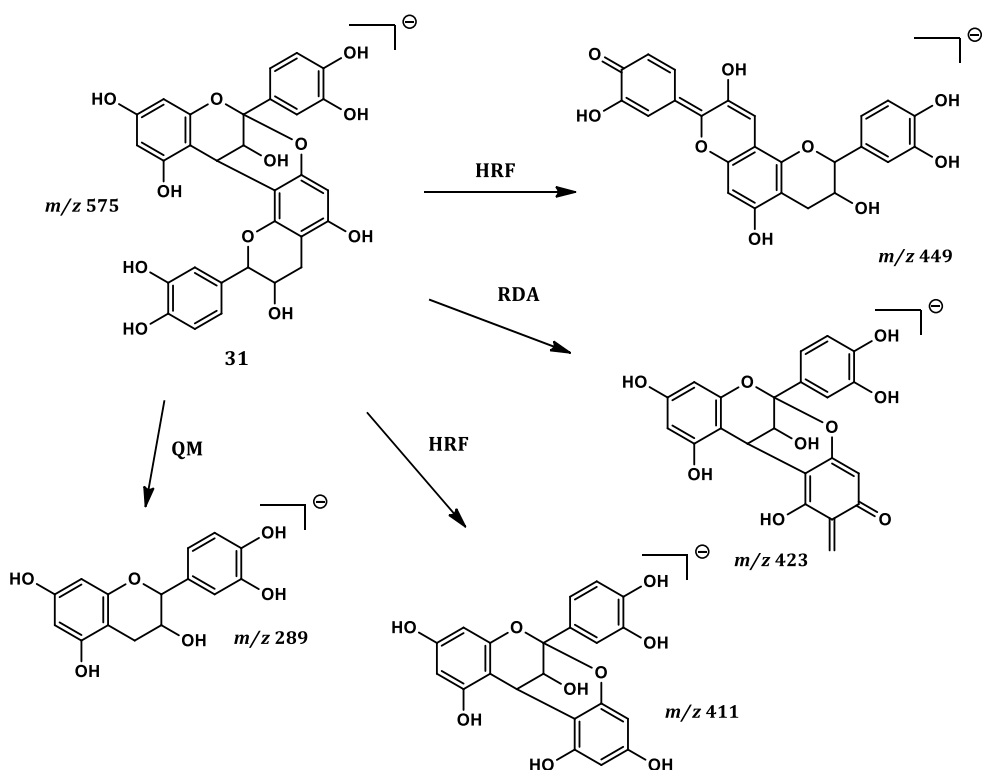
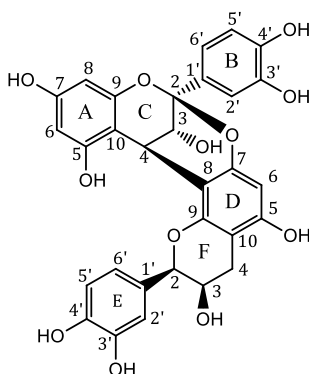


**Figura 4.29.** Fragmentaciones de MS y  $MS^2$  observadas para el compuesto **31**.

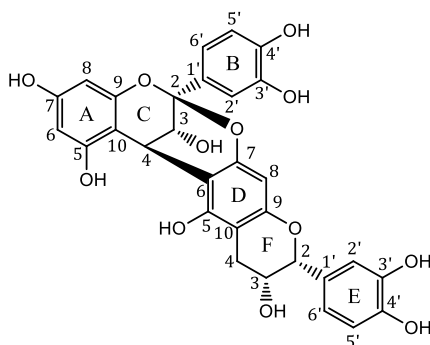
El compuesto **32**, con un tiempo de retención en HPLC–DAD de 36.9 minutos, presenta en su espectro de masas ESI–MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  575  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{30}H_{24}O_{12}$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar dos sistemas de espín de protones aromáticos del tipo ABX, lo que indica la presencia de dos anillos aromáticos 1,3,5-trisustituídos en la molécula. El primero de ellos está formado por las señales a 7.16 ppm (doblete, H-2'(E),  $^4J=2.2$  Hz), 6.98 ppm (doble doblete, H-6'(E),  $^4J=2.2$  Hz;  $^3J=8.2$  Hz) y 6.82 ppm (doblete, H-5(E),  $^3J=8.2$  Hz). El segundo está constituido por las señales que se observan a 7.15 ppm (doblete, H-2'(B),  $^4J=2.2$  Hz), 7.03 ppm (doble doblete, H-6'(B),  $^4J=2.2$  Hz;  $^3J=8.2$  Hz) y 6.80 ppm (doblete, H-5(B),  $^3J=8.2$  Hz). También se observa un singlete a 6.10 ppm (H-6(D)), y dos dobletes a 6.08 ppm (H-8(A)) y a 6.01 ppm (H-6(A)), que integran por un protón cada uno de ellos y presentan una constante de acoplamiento pequeña ( $^4J=2.4$  Hz). Además, se observa un sistema de espín AB aislado constituido por dos señales doblete a 4.42 ppm (H-3(C)) y a 4.03 ppm (H-4(C)) con una constante de acoplamiento de 3.5 Hz, y que es característico de los protones del anillo C de una procianidina tipo A.<sup>482</sup> Por último, se observa un singlete a 4.93 ppm (H-2(F)) que refleja una configuración relativa *cis* y, por lo tanto, una unidad inferior de epicatequina, además de un multiplete a 4.24 ppm (H-3(F)) y dos dobles dobletes a 2.77 ppm (H-4 $\alpha$ ,  $^3J=2.2$  Hz;  $^2J=17.3$  Hz) y a 2.95 ppm (H-4 $\beta$ (F),  $^3J=4.9$  Hz;  $^2J=17.3$  Hz). En el espectro de RMN- $^{13}C$  se observan 24 señales correspondientes a carbonos aromáticos, diez de ellas corresponden a carbonos cuaternarios oxigenados a 158.12 ppm (C-7(A)), 156.99 ppm (C-5(A)), 156.59 ppm (C-5(D)), 154.25 ppm (C-9(A)), 152.59 ppm (C-7(D)), 152.29 ppm (C-9(D)), 146.75 ppm (C-4'(B)), 146.30 ppm (C-4'(E)), 145.99 ppm (C-3'(E)) y 145.65 ppm (C-3'(B)), cinco a carbonos cuaternarios a 132.46 ppm (C-1'(B)), 131.19 ppm (C-1'(E)), 107.22 ppm (C-8(D)), 104.27 ppm (C-10(A)) y 102.44 ppm (C-10(D)), y nueve a metinos a 120.40 ppm (C-6'(E)), 119.86 ppm (C-6'(B)), 116.05 ppm (C-5'(B)), 115.96 ppm (C-2'(E)), 115.68 ppm (C-2'(B)), 115.65 ppm (C-5'(E)), 98.32 ppm (C-6(A)), 96.64 ppm (C-8(A)) y 96.52 ppm (C-6(D)). También se observa una señal típica de carbono cetálico a 100.19 ppm (C-2(C)) que confirma la estructura de procianidina tipo A. El resto de señales corresponden a carbonos alifáticos a 81.76 ppm (C-2(F)), 68.06 ppm (C-3(C)), 66.95 ppm (C-3(F)), 29.89 ppm (C-4(F)) y 29.25 ppm (C-3(F)). Las señales fueron asignadas de manera inequívoca mediante correlaciones en los espectros

bidimensionales de RMN. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica  $[\alpha]_D^{25} +30.3^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **32** la estructura de (+)-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>507,508</sup>



(+)-Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina  
(procianidina A-2) (**32**)

El compuesto **33**, con un tiempo de retención en HPLC–DAD de 46.0 minutos, presenta en su espectro de masas ESI–MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  575  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{30}H_{24}O_{12}$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  son idénticos a los del compuesto **32**, con la excepción de que en este caso se observan dos señales doblete a 6.08 ppm y a 6.04 ppm asignables a H-6 y H-8, respectivamente. Las señales fueron asignadas de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica  $[\alpha]_D^{25} +17.9^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **33** la estructura de (+)-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →6)-epicatequina, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>507</sup>



(+)-Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →6)-epicatequina  
(procianidina A-6) (**33**)

**Tabla 4.11.** Compuestos mayoritarios aislados e identificados en el extracto de acetato de etilo de madera de lichi, variedad 'Mauritius'.

| Compuesto | T <sub>R</sub><br>(min) | Identificación                                                                                       |
|-----------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>27</b> | 10.8                    | (Epi)catequina-(4→8)-(epi)catequina-(2→O→7,4→8)-<br>(epi)catequina-(4→8)-(epi)catequina <sup>a</sup> |
| <b>28</b> | 20.4                    | Procianidina B-2 <sup>a</sup>                                                                        |
| <b>29</b> | 22.0                    | (+)-Epicatequina <sup>b</sup>                                                                        |
| <b>30</b> | 26.2                    | (+)-Cinamtanina B-1 <sup>b</sup>                                                                     |
| <b>31</b> | 28.6                    | (Epi)catequina-(2→O→7,4→8)-(epi)catequina <sup>a</sup>                                               |
| <b>32</b> | 36.9                    | (+)-Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina <sup>b</sup>                             |
| <b>33</b> | 46.0                    | (+)-Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →6)-epicatequina <sup>b</sup>                             |

<sup>a</sup> Identificado tentativamente por HPLC-DAD/ESI-MS; <sup>b</sup> Aislado y caracterizado por RMN.

Los compuestos aislados (**29**, **30**, **32** y **33**) e identificados tentativamente (**27**, **28** y **31**) (**Tabla 4.11**), a partir del extracto de madera de lichi ya habían sido descritos en otras partes de este árbol frutal (Véase apartado 1.3.2 en Antecedentes Bibliográficos), pero no se habían obtenido a partir de madera con anterioridad. Todos ellos, excepto el compuesto **33**, se han identificado en numerosas plantas. Así, por ejemplo, el compuesto **28** se ha detectado en arándano rojo americano,<sup>249</sup> semilla de uva,<sup>509</sup> piel de cacahuate y cacao,<sup>510</sup> y semilla de soja,<sup>153</sup> entre otras. El compuesto **29** se ha descrito ampliamente en numerosas plantas. El compuesto **30** se aisló a partir de

madera de laurel en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis,<sup>28,31</sup> el cual tiene firmado un contrato de comercialización de este metabolito secundario con dos empresas suizas. Además, este compuesto ha sido identificado en varias especies del género *Cinnamomum*<sup>511,512</sup> y en arándano rojo,<sup>513</sup> entre otros. El compuesto **32** se ha aislado a partir de piel de cacahuete,<sup>508,514</sup> de corteza de *Pavetta owariensis* P. Beauv<sup>495</sup> o de arándano rojo,<sup>244</sup> entre otros. Por último, el compuesto **33** se ha aislado a partir de corteza de *Parameria laevigata* Juss.<sup>507</sup> y de raíz de *Vaccinium dunalianum* W.<sup>515</sup>

El extracto de acetato de etilo de lichi presenta el compuesto **30** como mayoritario. Este compuesto posee una alta actividad antioxidante responsable de la reducción de la hiperagregabilidad plaquetaria en pacientes con diabetes mellitus tipo 2,<sup>28</sup> además de efectos antiapoptóticos en plaquetas humanas,<sup>29</sup> lo que le confiere propiedades para prevenir trastornos trombóticos.<sup>27</sup> En un estudio más reciente se han testado sus efectos antibacterianos contra una selección de bacterias de los alimentos.<sup>30</sup> Otros compuestos aislados, que se encuentran en menor concentración en el extracto de la madera de esta planta, son la procianidina A-2 (**32**), que presenta efectos antioxidantes y antiinflamatorios,<sup>516</sup> y la procianidina A-6 (**33**), menos estudiada que el compuesto anterior, y para la que se ha descrito una actividad antioxidante superior al ácido ascórbico.<sup>187</sup>

#### **4.4.4 Identificación tentativa por HPLC-DAD/ESI-MS de proantocianidinas minoritarias en la madera de lichi**

El análisis de la agrupación C<sub>4</sub> (**Esquema 4.6**, Apartado 4.4.2) por HPLC-DAD/ESI-MS permitió proponer tentativamente las estructuras de seis proantocianidinas minoritarias, cinco de ellas, triméricas con diferente unión interflavonoide, y otra, dimérica tipo A. A continuación se describen los espectros de masas que han permitido proponer cada una de esas estructuras.

El compuesto **39**, que aparece a un tiempo de retención en HPLC-DAD de 40.0 minutos, presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion

quasimolecular  $m/z$  575  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{12}$ , lo que se corresponde con la masa molecular de una procianidina dimérica tipo A constituida por dos unidades de (epi)catequina. Su espectro  $MS^2$  presenta como pico base el fragmento a  $m/z$  411  $[M-H-164 Da]^-$  causado por la pérdida de un fragmento de tipo HRF. También se observan otros picos a  $m/z$  449  $[M-H-126 Da]^-$ , producido por una fragmentación HRF, a  $m/z$  423  $[M-H-152 Da]^-$ , originado por una fragmentación RDA, y a  $m/z$  289  $[(epi)catequina-H]^-$  y  $m/z$  287  $[M-H-(epi)catequina]^-$ , causado por la ruptura del enlace interflavonoide tras un proceso de fragmentación QM (**Figura 4.30**). A partir del patrón de fragmentación observado ha sido posible proponer la estructura tentativa de (epi)catequina-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-(epi)catequina para el compuesto **39**.

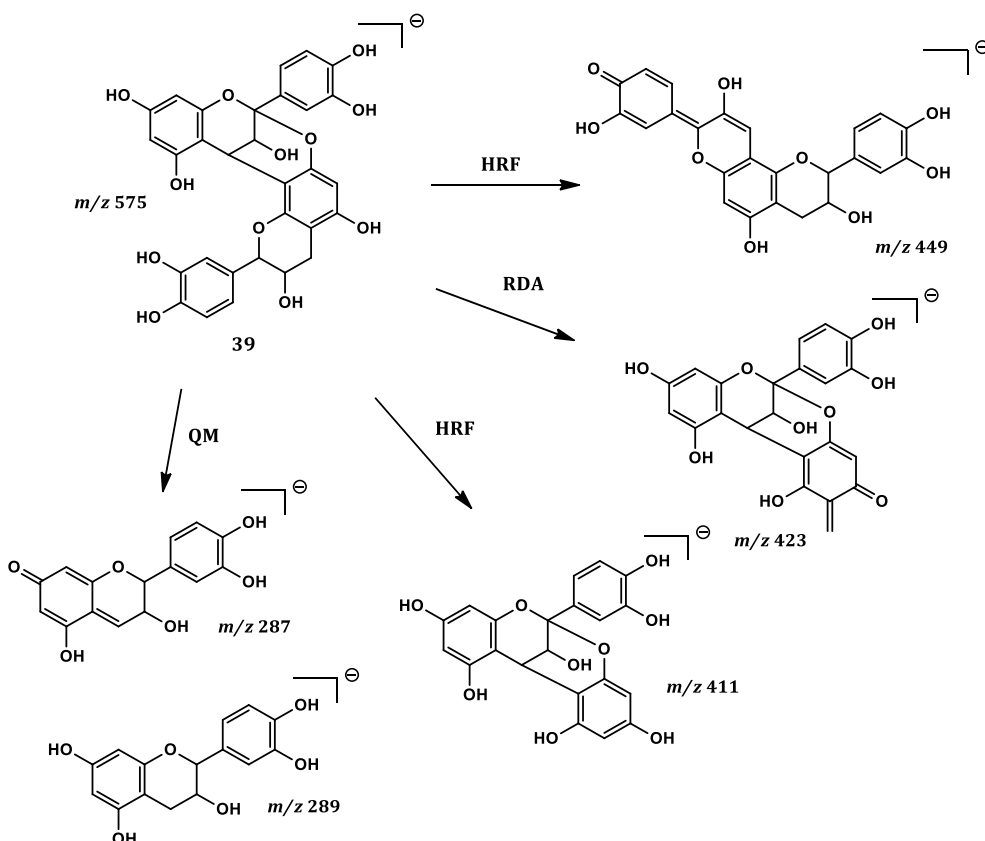


**Figura 4.30.** Fragmentaciones de MS y  $MS^2$  observadas para el compuesto **39**.

Los compuestos **34**, **36** y **37**, que aparecen a un tiempo de retención en HPLC-DAD de 25.1 min, 32.6 min y 37.5 min, respectivamente, presentan en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  863  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{35}H_{18}O_{18}$ , lo que se corresponde con la masa molecular de procianidinas trimérica constituidas por dos tres unidades de (epi)catequina presentando un enlace interflavonoide tipo A y otro tipo B. En los experimentos de  $MS^2$  se observa para los tres compuestos como pico base el fragmento a  $m/z$  711  $[M-H-152\text{ Da}]^-$  causado por una fragmentación de tipo RDA. En los tres casos también se observan otros picos secundarios a  $m/z$  693  $[M-H-170\text{ Da}]^-$ , producido por la pérdida de un fragmento RDA (152 Da) y una molécula de agua (18 Da), y a  $m/z$  559  $[M-H-304\text{ Da}]^-$  debido a una fragmentación del tipo QM. Sin embargo, el compuesto **34** presenta dos fragmentaciones a  $m/z$  573 y 289, ambas originadas por una fragmentación QM, y que indican que el enlace tipo A se encuentra en la posición superior. Por el contrario, los compuestos **36** y **37** presenta otras dos fragmentaciones a  $m/z$  575 y 287, originadas por el mismo tipo de fragmentación que en el caso anterior y que indica que el enlace tipo A se localiza en la posición inferior.<sup>517,518</sup> El patrón de fragmentación de las tres moléculas (**Figura 4.31** y **4.32**) han permitido proponer tentativamente para el compuesto **34** la estructura de (epi)catequina-(2→O→7,4→8)-(epi)catequina-(4→8)-(epi)catequina y para los compuestos **36** y **37** la estructura de (epi)catequina-(4→8)-(epi)catequina-(2→O→7, 4→8)-(epi)catequina, siendo ambos estereoisómeros.

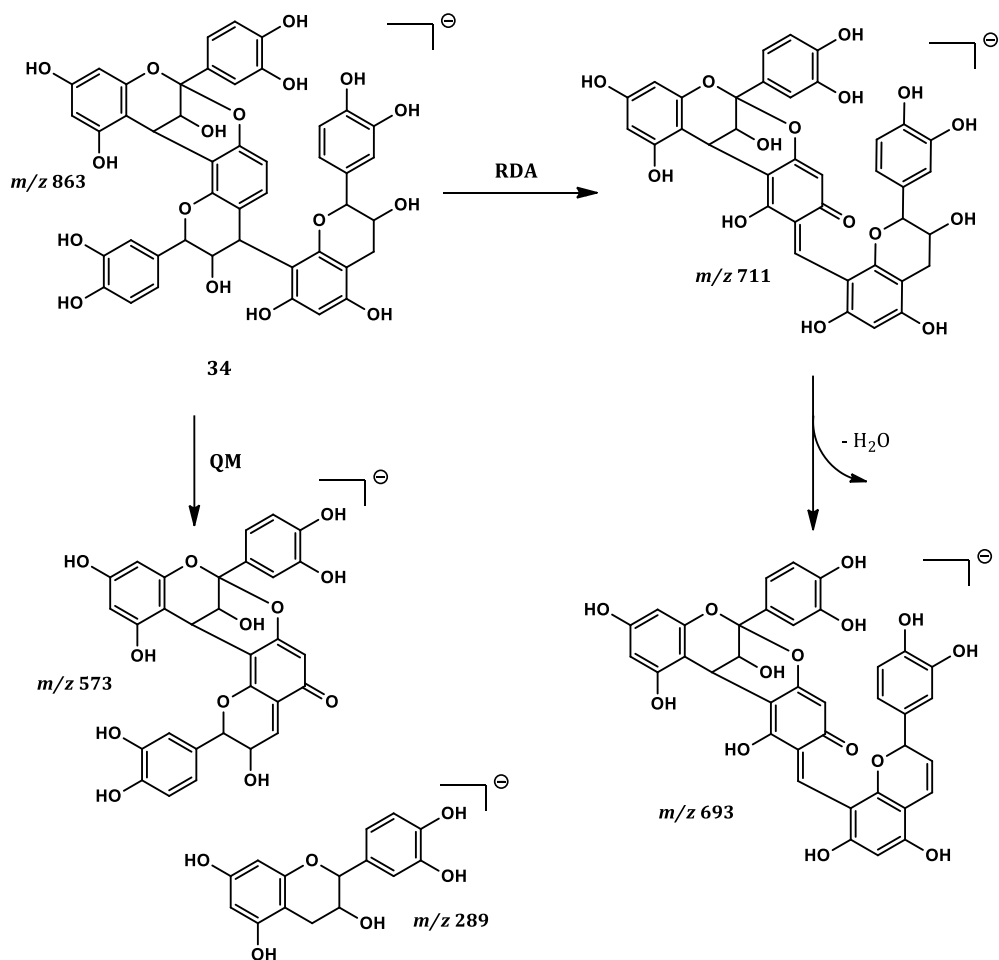


**Figura 4.31.** Fragmentaciones de MS y MS<sup>2</sup> observadas para el compuesto **34**.



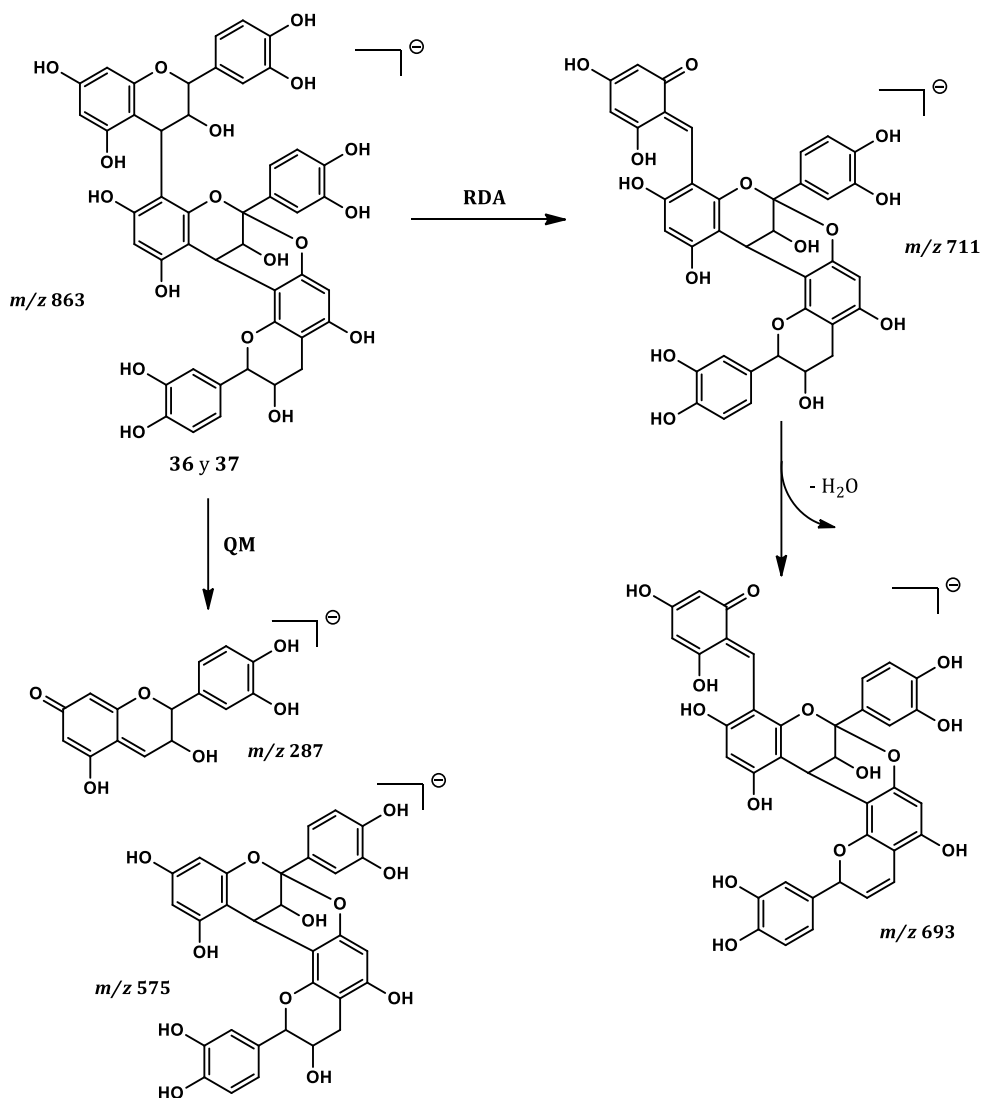


**Figura 4.32.** Fragmentaciones de MS y MS<sup>2</sup> observadas para el compuesto 36 y 37.

El compuesto **35**, que aparece a un tiempo de retención en HPLC-DAD de 28.0 minutos, presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  847  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{45}H_{36}O_{17}$ , lo que se corresponde con una proantocianidina trimérica constituida por dos unidades de (epi)catequina y una de (epi)afzelequina, presentando enlaces interflavonoides tipo A y tipo B. El espectro MS<sup>2</sup> presenta como pico base el fragmento a  $m/z$  411  $[M-H-152 Da]^-$ , causado por una reacción HRF sobre la unidad intermedia. Como fragmentos secundarios están los picos a  $m/z$  711  $[M-H-126 Da]^-$ , producido por fragmentación RDA, a partir del cual se origina el fragmento  $m/z$  693  $[M-H-126 Da-18 Da]^-$  tras perder una molécula de agua; a  $m/z$  557  $[(epi)catequina-(2\rightarrow O\rightarrow 7,4\rightarrow 8)-(epi)afzelequina-H]^-$ ; y a  $m/z$  289  $[M-H-558 Da]^-$ , causado por la ruptura QM del enlace tipo B, y a  $m/z$  435  $[M-H-412 Da]^-$ , ocasionado por la pérdida de un fragmento HRF (**Figura 4.33**). Estas dos últimas fragmentaciones del tipo QM y HRF ponen de manifiesto la presencia de un enlace interflavonoide tipo A entre la unidad superior e intermedia.<sup>518</sup> Por ello, se propone tentativamente para el compuesto **35** la estructura de (epi)catequina-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-(epi)afzelequina-(4 $\rightarrow$ 8)-(epi)catequina.

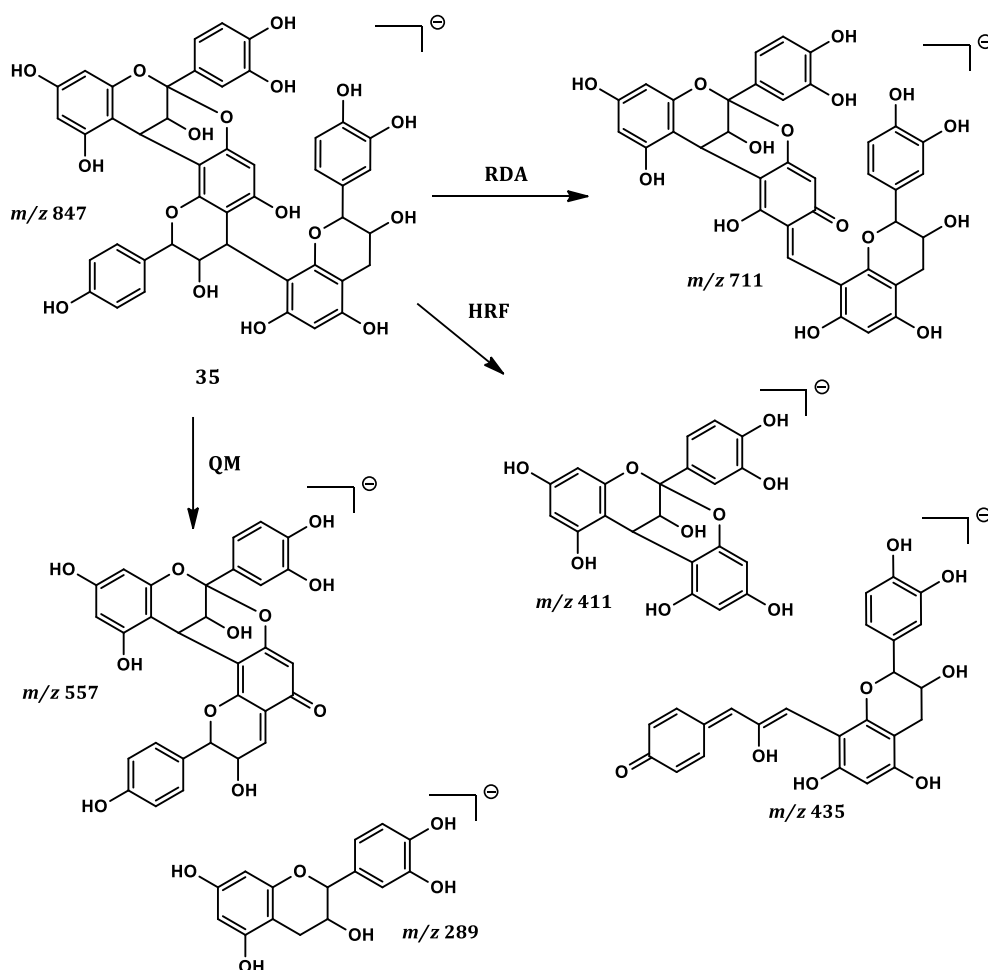


**Figura 4.33.** Fragmentaciones de MS y MS<sup>2</sup> observadas para el compuesto **35**.

El compuesto **38**, que eluye a un tiempo de retención en HPLC-DAD de 39.0 minutos, presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  865 [M-H]<sup>-</sup>, compatible con una fórmula molecular de C<sub>45</sub>H<sub>38</sub>O<sub>18</sub>, lo que se corresponde con una procianidina trimérica con enlaces interflavonoide tipo B. El espectro MS<sup>2</sup> presenta como pico base el fragmento a  $m/z$  713 [M-H-152 Da]<sup>-</sup>, causado por una reacción RDA, a partir del cual se origina el fragmento a  $m/z$  695 [M-H-152-18 Da]<sup>-</sup> por la pérdida de una molécula de agua. También se observan otros picos secundarios a  $m/z$  739 [M-H-126 Da]<sup>-</sup>, producido por pérdida HRF sobre la

unidad superior, y a  $m/z$  575  $[M-H-290 \text{ Da}]^-$  y a  $m/z$  289  $[M-H-576 \text{ Da}]^-$ , ambos originados por fragmentación QM (**Figura 4.34**). Este patrón de fragmentación ha permitido proponer tentativamente para el compuesto **38** la estructura de (epi)catequina-(4→8)-(epi)catequina-(4→8)-(epi)catequina.

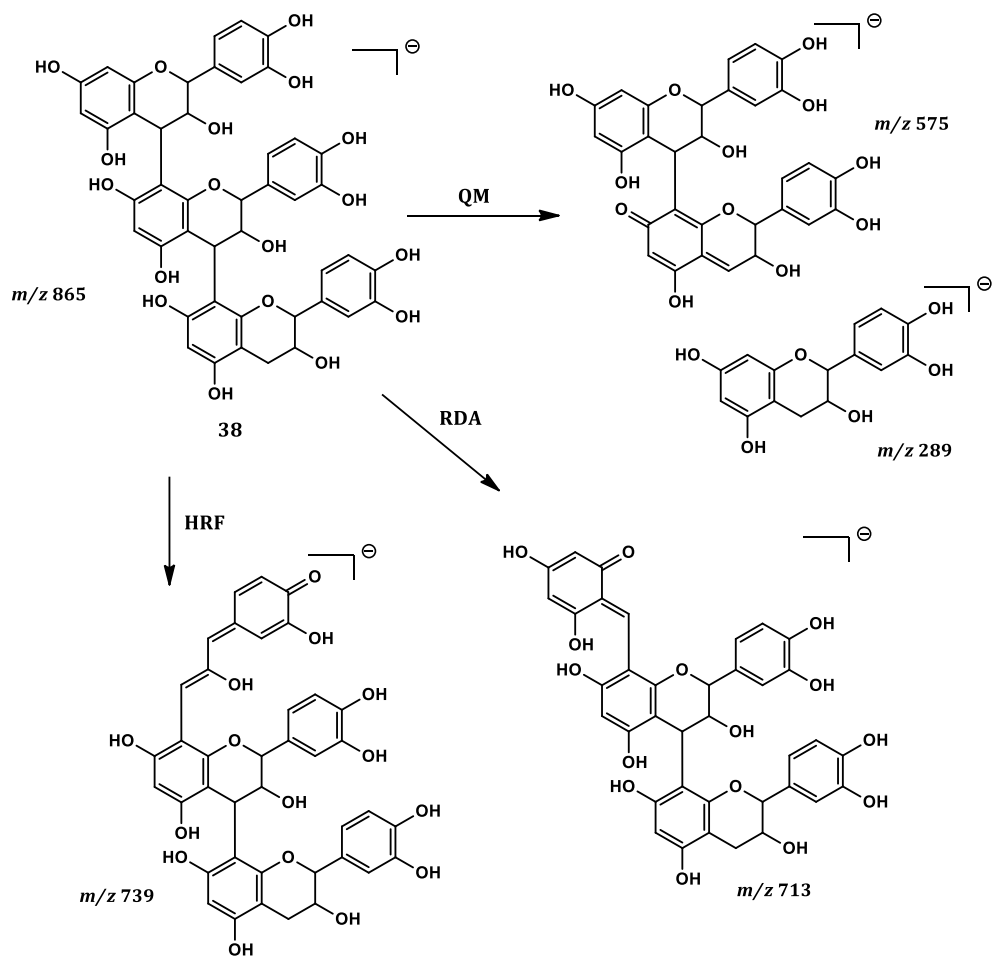


**Figura 4.34.** Fragmentaciones de MS y MS<sup>2</sup> observadas para el compuesto **38**.

#### **4.4.5 Cuantificación de flavonoides y proantocianidinas en los extractos de AcOEt de madera de lichi de las variedades estudiadas**

La cuantificación de los compuestos mayoritarios encontrados en el extracto de acetato de etilo de madera de lichi de las dos variedades estudiadas se llevó a cabo mediante HPLC-DAD por calibración externa. Se emplearon las rectas de calibrado elaboradas con patrones de (–)-catequina y procianidina A-2 descritas en los apartados 4.1.4 y 4.2.4, respectivamente, y que se han empleado para cuantificar los compuestos **29** y **31**. Además fue necesario construir otras dos nuevas con disoluciones patrón de procianidina B-2 y cinamtanina B-1 de concentraciones comprendidas en el rango de 0.05 mg/mL a 1.00 mg/mL, empleadas para determinar la concentración de los compuestos **28** y **30**, respectivamente (**Tabla 4.12**).

**Tabla 4.12.** Rectas de calibrado (280 nm) empleadas para la cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de las muestras de madera de lichi de las dos variedades estudiadas.

| Compuesto        | Recta de calibrado                         |
|------------------|--------------------------------------------|
| (–)-catequina    | $y = 9000000x - 129376$ ( $r^2 = 0.9934$ ) |
| Procianidina B-2 | $y = 6000000x + 65796$ ( $r^2 = 0.9877$ )  |
| Procianidina A-2 | $y = 9000000x - 194161$ ( $r^2 = 0.9984$ ) |
| Cinamtanina B-1  | $y = 7000000x - 88497$ ( $r^2 = 0.9981$ )  |

Interpolando el valor del área del pico a 280 nm de cada uno de los compuestos en la curva de calibrado pertinente, se determinó la concentración de cada uno de ellos (**Tabla 4.13**).

**Tabla 4.13.** Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de AcOEt de madera de lichi de las diferentes variedades estudiadas.

| Referencia   | Compuesto <sup>a</sup> |      |      |      |      | Total <sup>b</sup> |
|--------------|------------------------|------|------|------|------|--------------------|
|              | 28                     | 29   | 30   | 31   | 32   |                    |
| Lc-Ma-1a(Be) | 0.15                   | 0.18 | 1.45 | 0.21 | 0.22 | 2.03               |
| Lc-Ma-2a(Ma) | 0.07                   | 0.05 | 0.95 | 0.12 | 0.13 | 1.27               |

<sup>a</sup> Valores (mg compuesto/g madera seca) expresados como el valor medio de las dos réplicas. En todos los casos la desviación estándar fue inferior a 0.001;

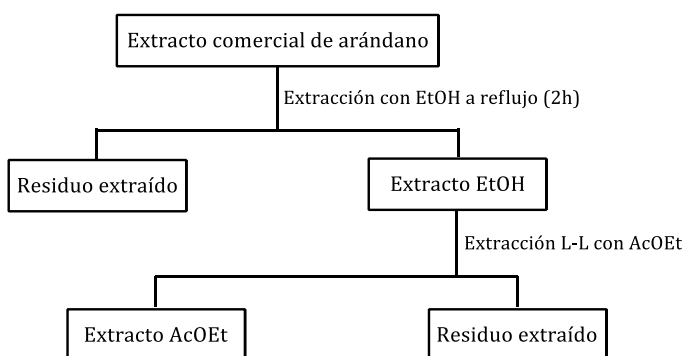
<sup>b</sup> Concentración total de procianidinas: Suma de **28, 30, 31 y 32**.

Como se ha indicado en el apartado 4.4.3, el compuesto **30** ya había sido aislado por el grupo de investigación en el que se desarrolla esta Tesis Doctoral a partir de madera de laurel.<sup>33</sup> El valor de concentración más elevado encontrado en madera de laurel fue de 1.3 mg/g madera seca, ligeramente inferior al valor más elevado cuantificado en madera de lichi, concretamente en la muestra de la variedad “Bengal” (1.45 mg/g madera seca).

## 4.5 Estudio de un extracto comercial de arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon* Ait.)

### 4.5.1 Material vegetal, obtención de extracto de arándano rojo americano y análisis

Un extracto hidroalcohólico de arándano rojo americano, comercializado por NutraGreen™, fue re-extraído con etanol durante 2 horas a reflujo. A continuación, el residuo seco se re-disolvió en agua y se sometió a una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (*Esquema 4.7*).



**Esquema 4.7.** Procedimiento empleado para la extracción de una muestra de extracto hidroalcohólico comercial de arándano rojo americano.

El rendimiento de extracción con etanol fue del 83%, muy superior al obtenido con acetato de etilo (28%).

#### **4.5.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de arándano rojo americano**

El extracto de acetato de etilo (2.0 g) obtenido se fraccionó por FCPC, analizando por HPLC-DAD (Método de elución D; véase apartado 11.5.2 en *Materials and Methods*) y CCF las fracciones eluidas y agrupando todo en cuatro fracciones mayores: D<sub>1</sub> (327 mg), D<sub>2</sub> (105 mg), D<sub>3</sub> (123 mg) y D<sub>4</sub> (1327 mg). La fracción D<sub>2</sub> se analizó por HPLC-DAD/ESI-MS y se comprobó que estaba constituida por dos flavan-3-oles (**18** y **19**) y cuatro proantocianidinas diméricas tipo A (**21**, **22**, **32** y **40**) (Véase apartado siguiente). Con el fin de obtener una fracción constituida únicamente por dímeros de proantocianidina tipo A, se volvió a cromatografiar la agrupación D<sub>2</sub>, pero en este caso, en columna de gel de sílice, empleando mezclas de diclorometano y etanol como fase móvil. Como resultado de esta nueva cromatografía se obtuvieron once fracciones (D<sub>2</sub>(I) a D<sub>2</sub>(XI)), siendo la de mayor peso (D<sub>2</sub>(IV), 45.3 mg) la que contenía la mezcla de proantocianidinas diméricas tipo A. Se analizó por HPLC-DAD/ESI-MS, identificando otras dos moléculas de este tipo (**41** y **42**) (**Figura 4.35**) (Véase apartado siguiente).

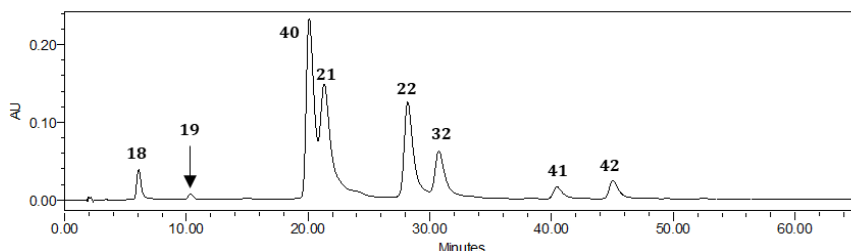


**Figura 4.35.** Cromatograma HPLC–DAD de la fracción D<sub>2</sub>(IV), a 280 nm, obtenida a partir de extracto de AcOEt de arándano rojo americano.

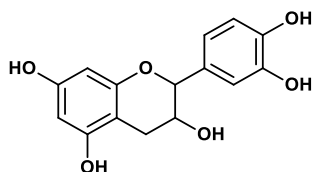
#### 4.5.3 Identificación tentativa por HPLC–DAD/ESI–MS de flavonoides y procianidinas en el extracto de AcOEt de arándano rojo americano

El fraccionamiento cromatográfico expuesto en el apartado anterior ha permitido la identificación por HPLC–DAD/ESI–MS de dos flavan-3-oles (**18** y **19**) y seis procianidinas diméricas tipo A (**21**, **22**, **32**, **40–42**), algunas de las cuales (**21**, **22** y **32**) ya habían sido aisladas a partir de maderas de ciruelo y lichi (Apartados 4.2 y 4.3). A continuación, se describen los espectros de masas que han permitido proponer cada una de esas estructuras.

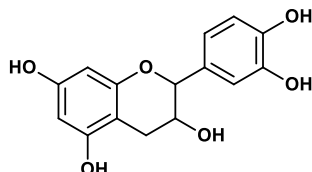
##### a) Flavan-3-oles

Los compuestos **18** y **19**, con tiempos de retención en HPLC–DAD de 6.1 minutos y 10.3 minutos, respectivamente, presentan en sus espectros de masas ESI–MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  289  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{14}O_6$ , lo que parece indicar que se trata de dos flavan-3-oles. Por otro lado, sus espectros MS<sup>2</sup> confirman la propuesta y, además, sus tiempos de retención en HPLC–DAD coinciden con el de los patrones comerciales de catequina y epicatequina. Teniendo en cuenta que en *Vaccinium macrocarpon* se han aislado previamente catequina dextrógira y epicatequina levógira,<sup>36,236,240</sup> proponemos para los compuestos **18** y **19** las estructuras de catequina y epicatequina, respectivamente.





Catequina (**18**)



Epicatequina (**19**)

b) Procianidinas diméricas tipo A

Los compuestos **21**, **22**, **32** y **40–42** presentan en sus espectros de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  575  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{30}H_{24}O_{12}$ , propia de procianidinas diméricas tipo A. En los espectros  $MS^2$  se observa como pico base el fragmento a  $m/z$  449  $[M-H-164\text{ Da}]^-$ , causado por una ruptura tipo HRF, para los compuestos **21**, **22**, **32**, **40** y **41**, y el fragmento a  $m/z$  423  $[M-H-152\text{ Da}]^-$ , originado por una fragmentación RDA, para el compuesto **42**. En el patrón de fragmentación se observa un pico secundario a  $m/z$  449  $[M-H-126\text{ Da}]^-$ , producido por una fragmentación HRF, para el compuesto **42**, y a  $m/z$  423  $[M-H-152\text{ Da}]^-$ , originado por una fragmentación RDA, para los compuestos **21**, **22**, **32**, **40** y **41**. Además se observan otros picos secundarios para todos ellos a  $m/z$  289  $[(\text{epi})\text{catequina}-H]^-$  y  $m/z$  285  $[M-H-(\text{epi})\text{catequina}]^-$ , causados por la ruptura QM del enlace interflavonoide (Ver fragmentaciones en **Figura 4.30**, apartado 4.4.4). A partir de estos datos se propone tentativamente para los compuestos **21**, **22**, **32** y **40–42** la estructura de (epi)catequina-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-(epi)catequina.

Los tiempos de retención en HPLC-DAD de los compuestos **40** y **32** coincidieron con el de dos patrones comerciales de procianidina A-1 y A-2, respectivamente. El primero de ellos (**40**) se ha aislado a partir de material vegetal de *Vaccinium vitis-idaea* L.<sup>513</sup> y de raíz de *Vaccinium dunalianum* W.<sup>515</sup>, aunque nunca de la especie *macrocarpon*. El compuesto **32** se ha obtenido a partir de fruto de *Vaccinium macrocarpon* Ait.<sup>519</sup> Por otro lado, los compuestos que aparecen a tiempos de retención de 20.8 min y 28.1 min coincidieron con los de los compuestos **21** y **22** aislados de madera de ciruelo (Apartado 4.2). Teniendo en cuenta este aspecto, proponemos para los compuestos **40**, **21**, **22** y **32** las estructuras de (+)-epicatequina-(2 $\beta$  $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-

epicatequina, (-)-*ent*-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-catequina, (-)-*ent*-epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatequina y (+)-Epicatequina-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-catequina, respectivamente (**Figura 4.36**).

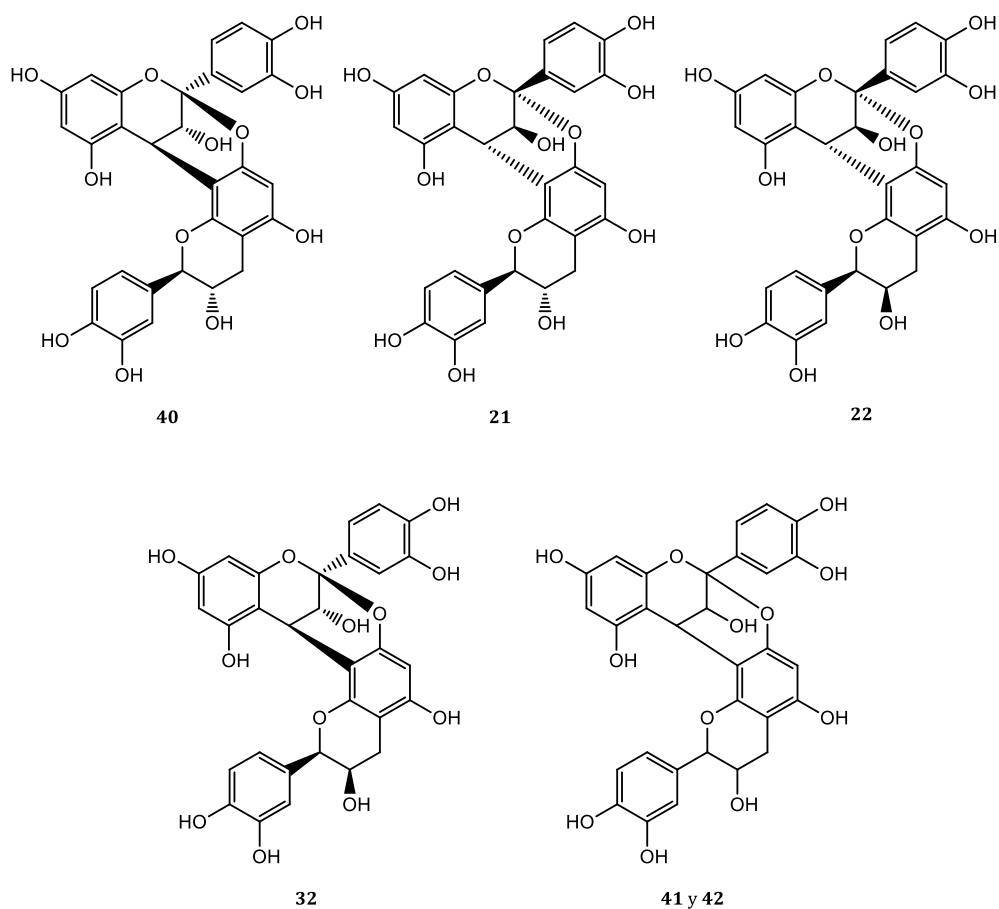


**Figura 4.36.** Compuestos identificados en la fracción D<sub>2</sub>(IV) procedente del extracto de arándano rojo americano.

#### 4.5.4 Cuantificación de procianidinas en la fracción D<sub>2</sub>(IV)

La concentración de cada una de las procianidinas diméricas tipo A identificadas en la fracción D<sub>2</sub>(IV) de arándano fue determinada por calibración externa, como en los casos anteriores. En esta ocasión se emplearon las rectas de calibrado elaboradas a 280 nm para (-)-catequina [ $y = 9000000x - 129376$ ,  $r^2 = 0.9934$ ] y procianidina A-2 [ $y = 9000000x - 194161$ ,  $r^2 = 0.9984$ ] en los apartados 4.1.4 y 4.2.4.

Interpolando el valor del área de cada pico a 280 nm en la curva de calibrado, se determinó la concentración de cada uno de ellos (**Tabla 4.14**).

**Tabla 4.14.** Cuantificación de los compuestos identificados en la fracción D<sub>2</sub>(IV) de arándano.

| Referencia                   | Compuesto <sup>a</sup> |     |                    |                   |       |      |      |      |                    |
|------------------------------|------------------------|-----|--------------------|-------------------|-------|------|------|------|--------------------|
|                              | Flavan-3-ols           |     |                    | Proantocianidinas |       |      |      |      |                    |
|                              | 18                     | 19  | Total <sup>b</sup> | 40+21             | 22    | 32   | 41   | 42   | Total <sup>c</sup> |
| Fracción D <sub>2</sub> (IV) | 26.5                   | 7.5 | 34.0               | 453.6             | 138.4 | 66.0 | 22.7 | 32.0 | 712.7              |

<sup>a</sup> Valores (mg compuesto/g de fracción D<sub>2</sub>(IV)) expresados como el valor medio de las dos réplicas. En todos los casos la desviación estándar fue inferior a 0.001; <sup>b</sup> Suma de **18** y **19**;

<sup>c</sup> Suma de **21**, **22**, **32**, **40-42**.

Como puede observarse, las procianidinas diméricas tipo A, **21** y **40**, son las más abundantes en la fracción D<sub>2</sub>(IV), que es la que más compuestos de este tipo acumula de entre todas las fracciones obtenidas. Esta fracción rica en procianidinas representa el 0.53% del peso total del extracto comercial de arándano rojo estudiado, y constituye un buen punto de partida para seguir explorando las potenciales aplicaciones de estas moléculas tan interesantes desde un punto de vista biológico.



## 5. EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TRITERPENOIDES PENTACÍCLICOS EN *Olea europaea* L.

Previo al inicio de esta Tesis Doctoral, la Universidad de Jaén concedió el proyecto de investigación “Análisis del patrón de expresión de triterpenos pentacíclicos presentes en el olivo y caracterización de su actividad biológica” (UJA2014/07/13), de cuyo equipo de investigación formaban parte los doctores Altarejos y Salido, directores de esta Tesis, siendo investigador principal del mismo el profesor del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la UJA, Dr. D. Juan Peragón. Uno de los objetivos iniciales de este proyecto era analizar el patrón de expresión de varios triterpenoides (ácidos maslínico y oleanólico; eritrodíol y uvaol; **Figura 5.1**) en la raíz y tallo de olivos de diferentes variedades, para poder continuar con el estudio de caracterización molecular del efecto anticancerígeno de estos compuestos, ya iniciado por el Dr. Peragón en el pasado.<sup>520,521</sup>

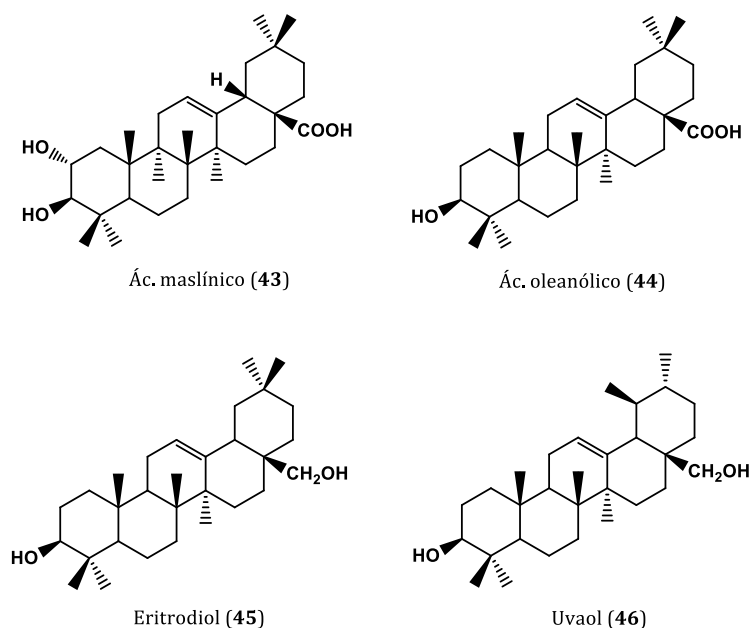
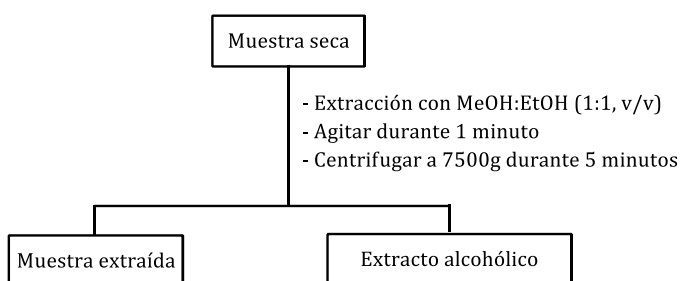


**Figura 5.1.** Estructura química de los triterpenos pentacíclicos objeto de estudio en muestras de olivo.

## 5.1 Material vegetal, obtención de extractos de fruto, hoja, tallo y raíz de olivo de las variedades 'Picual', 'Frantoio' y 'Koroneiki', y análisis

La recogida de muestras de fruto, hoja, tallo y raíz de olivo de las variedades 'Picual', 'Frantoio' y 'Koroneiki' se realizó en los meses de octubre y noviembre de 2016 en el jardín de variedades de olivo situado en el centro IFAPA "Alameda del Obispo" (Córdoba). Aunque el objetivo inicial era trabajar con tallos y raíces, se decidió ampliar el estudio a aceituna y hoja para tener una visión más completa de la presencia en el conjunto del olivo de los triterpenoides objeto de estudio. En cuanto a las variedades de olivo seleccionadas, se decidió comenzar por las más representativas de los tres principales países productores de aceite de oliva a nivel mundial.

La extracción de las muestras se hizo siguiendo el procedimiento descrito previamente por el Dr. Peragón,<sup>520</sup> el cual se detalla en el **Esquema 5.1**.



**Esquema 5.1.** Procedimiento de extracción de muestras de hoja, tallo, fruto y raíz de olivo para la cuantificación de triterpenoides.

Antes de efectuar la extracción de las muestras de hoja, tallo y raíz se procedió a su pulverizado a baja temperatura con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. En cuanto al fruto, la pulpa, objeto de estudio de este trabajo, se separó manualmente del hueso y se determinó la masa media del fruto, pulpa y hueso (**Tabla 5.1**). Con respecto a esto último, se observa que las muestras de fruto de las variedades 'Picual' y 'Frantoio'

aumentan de peso de octubre a noviembre, mientras que sucede lo contrario en la variedad 'Koroneiki'. Por otro lado, el fruto con mayor masa correspondió a la variedad 'Picual', seguida de 'Frantoio' y 'Koroneiki'. En cuando a la masa del hueso, se observa una disminución de peso de octubre a noviembre para las variedades 'Picual' y 'Frantoio', y permanece prácticamente constante en la variedad 'Koroneiki'.

**Tabla 5.1.** Masa promedio de las muestras de fruto (pulpa y hueso) de olivo estudiadas.

| Variedad  | Masa fruto (g) <sup>a</sup> |           | Masa pulpa (g) |           | Masa hueso (g) <sup>a</sup> |           |
|-----------|-----------------------------|-----------|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|           | Octubre                     | Noviembre | Octubre        | Noviembre | Octubre                     | Noviembre |
| Picual    | 4.64                        | 5.36      | 3.76           | 4.58      | 0.89                        | 0.78      |
| Frantoio  | 2.17                        | 2.83      | 1.61           | 2.30      | 0.56                        | 0.53      |
| Koroneiki | 0.81                        | 0.60      | 0.66           | 0.45      | 0.15                        | 0.15      |

<sup>a</sup>El valor se expresa como la media del peso de diez aceitunas.

Los extractos alcohólicos de fruto, hoja y tallo obtenidos se analizaron por HPLC-DAD (Método de elución E; véase apartado 12.2 en *Materials and Methods*). Para el extracto de raíz, por su parte, debido a la baja concentración que presentaba en triterpenoides, fue necesario recurrir a otra técnica de sensibilidad mayor, como es la técnica combinada HPLC-DAD/ESI-MS.

## 5.2 Cuantificación de triterpenoides pentacíclicos en extractos alcohólicos de fruto, hoja, tallo y raíz de olivo de diferentes variedades

La determinación de la concentración de los triterpenoides objeto de estudio (ácidos maslínico (**43**), oleanólico (**44**) y betulínico (**48**); eritrodiol (**45**) y uvaol (**46**)) se llevó a cabo empleando el método de calibración externa, para lo cual fue necesario preparar curvas de calibrado de cada uno de esos componentes. Para cada patrón se prepararon seis disoluciones metanólicas de diferente concentración y se correlacionó su concentración frente a la señal observada en HPLC-DAD (para fruto, hoja y tallo) y

HPLC–DAD/ESI–MS (para raíz). Las ecuaciones matemáticas obtenidas para cada recta patrón en HPLC–DAD son: Ácido maslínico:  $y = 12112280.65x + 5463.35$ ; Ácido oleanólico:  $y = 10699825.87x - 121293.19$ ; Eritrodiol:  $y = 9795655.56x + 92910.13$ ; Uvaol:  $y = 7497918x + 14093.16$ . Las rectas patrón en HPLC–DAD/ESI–MS: Ácido maslínico:  $y = 317987991.71146x$ ; Ácido oleanólico:  $y = 2293640505.391x$ ; ácido betulínico:  $y = 9795655.56x + 92910.13$ . En todos los casos, el valor de  $R^2$  fue superior a 0.99.

A continuación, se exponen los resultados de concentración obtenidos para cada componente, ordenados por tipo de muestra vegetal estudiada (**Figuras 5.2–5.6, 5.8**).

En la pulpa del fruto se han detectado, de entre los cuatro triterpenoides objeto de estudio, únicamente los ácidos maslínico y oleanólico, hallándose el primero de ellos en mayor concentración que el segundo en las tres variedades de olivo y en las dos fechas de recogida. También se aprecia que la concentración de ambos compuestos aumenta a medida que avanza el tiempo (de octubre a noviembre). Por otro lado, la pulpa del fruto de la variedad ‘Koroneiki’ muestra la mayor concentración de ambos compuestos, tanto en octubre como en noviembre, seguido de ‘Picual’ y ‘Frantoio’ (**Figura 5.2**).

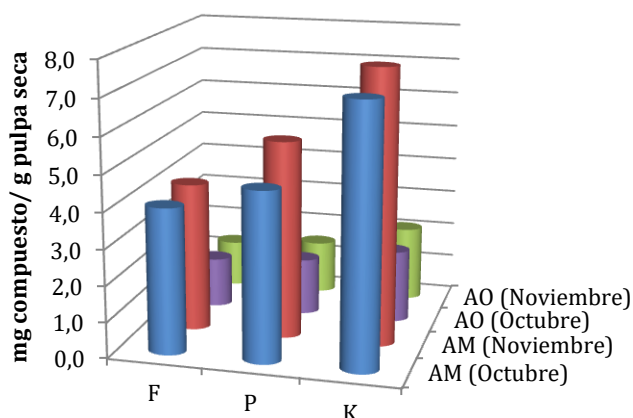


**Figura 5.2.** Contenido en ácido maslínico (AM) y ácido oleanólico (AO) de las muestras de pulpa de fruto estudiadas (F: Frantoio; P: Picual; K: Koroneiki).



En la hoja de las tres variedades de olivo sí se han podido detectar los cuatro triterpenoides objeto de estudio (ácidos maslínico y oleanólico; eritrodiol y uvaol). La mayor concentración de ácidos maslínico y oleanólico se encuentra en la variedad 'Picual', y en ambas fechas de recogida, seguido de 'Frantoio' y 'Koroneiki'. Tal y como ocurría en la pulpa del fruto, la concentración de estos dos componentes aumenta con el paso del tiempo para las variedades 'Picual' y 'Frantoio', mientras que para 'Koroneiki' se observa la tendencia contraria. De entre los cuatro órganos estudiados, la hoja fue la que presentó mayor concentración en ambos ácidos triterpénicos (**Figura 5.3**).

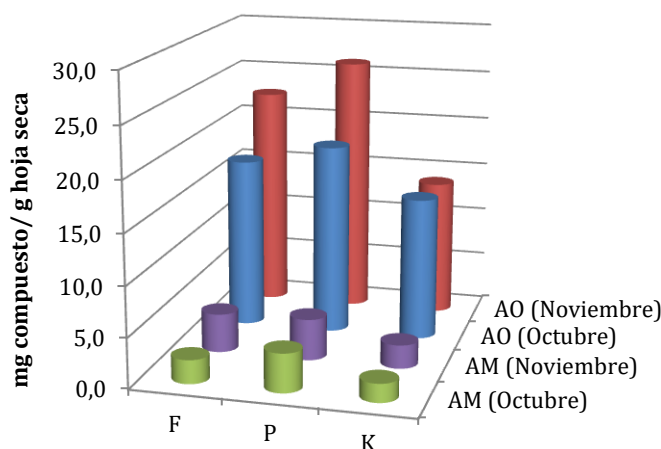


**Figura 5.3.** Contenido en ácido maslínico (AM) y ácido oleanólico (AO) en las muestras de hoja estudiadas (F: Frantoio; P: Picual; K: Koroneiki).

En cuanto a los alcoholes triterpénicos eritrodiol y uvaol presentes en hoja, la mayor concentración de ambos se encuentra en 'Koroneiki', en las dos fechas de recogida, seguido de 'Frantoio' y 'Picual'. Por otro lado, en 'Koroneiki' se observa que la concentración de estos dos componentes disminuye al pasar de octubre a noviembre, lo cual no ocurre con la variedad 'Frantoio', en cuyo caso la concentración de ambos triterpenoides experimenta un incremento con el paso del tiempo. Por último, la hoja

de la variedad 'Picual' se mantiene, prácticamente, sin cambios durante los dos meses estudiados (**Figura 5.4**).

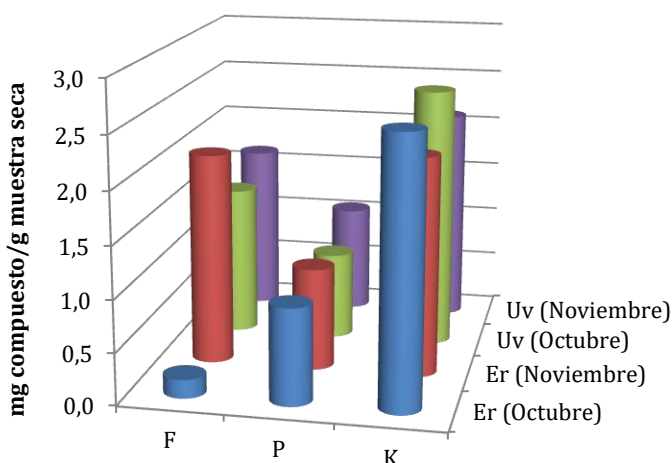


**Figura 5.4.** Contenido en eritrodiol (Er) y uvaol (Uv) en las muestras de hoja estudiadas (F: Frantoio; P: Picual; K: Koroneiki).

Tal y como sucedía en las muestras de hoja, en el tallo de las tres variedades también se han detectado los cuatro triterpenoides. El ácido oleanólico es el compuesto más abundante en esta parte del árbol, encontrándose en mayor concentración en la variedad 'Frantoio', seguido de 'Picual' y 'Koroneiki'. En este caso, al contrario de lo que ocurría en hoja y pulpa, la concentración de ambos componentes disminuye al pasar de octubre a noviembre (**Figura 5.5**). En cuanto al contenido en eritrodiol y uvaol, la mayor concentración de estos compuestos se encuentra en el tallo de 'Frantoio', seguido de 'Picual' y 'Koroneiki'. Igual que ocurría con los ácidos maslínico y oleanólico, para eritrodiol y uvaol también se observa una disminución de la concentración en las muestras de tallo al pasar de octubre a noviembre. De hecho, no se llegó a detectar uvaol en la muestra de 'Koroneiki' de noviembre (**Figura 5.6**).

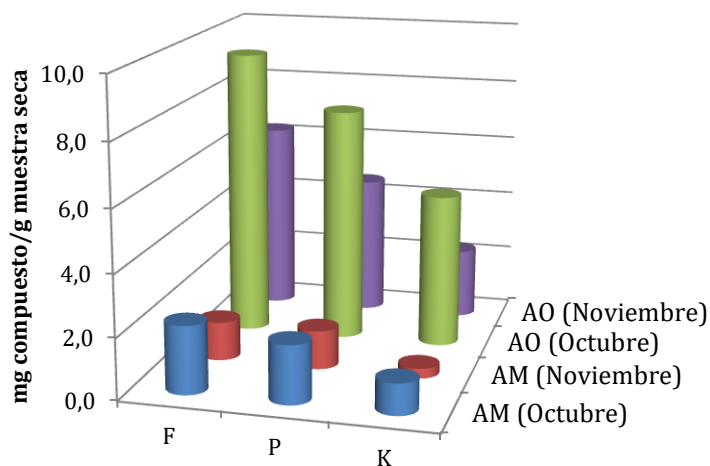


**Figura 5.5.** Contenido en ácido maslínico (AM) y ácido oleanólico (AO) en las muestras de tallo estudiadas (F: Frantoio; P: Picual; K: Koroneiki).

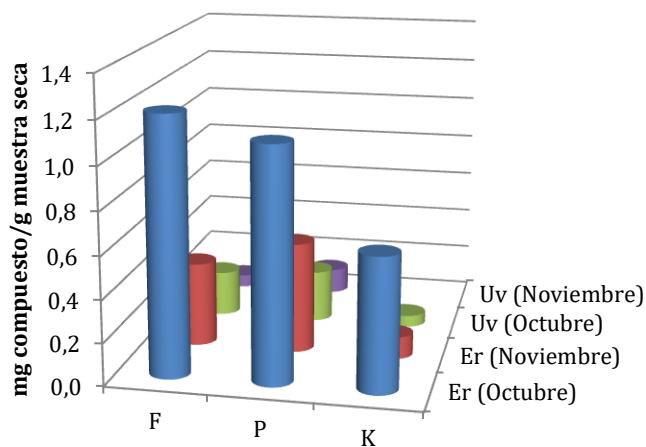
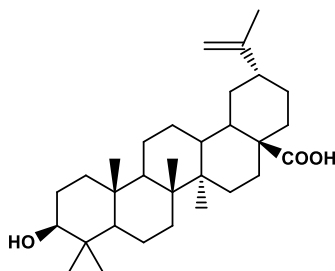


**Figura 5.6.** Contenido en eritrodiol (Er) y uvaol (Uv) en las muestras de tallo estudiadas (F: Frantoio; P: Picual; K: Koroneiki).

Los extractos de las muestras de raíz de las tres variedades se analizaron por la técnica de HPLC-DAD/ESI-MS, y al hacerlo se comprobó que no estaban presentes eritrodiol y uvaol, pero sí que había un pico HPLC nuevo, cuyo espectro de masas permitió su identificación como ácido betulínico (**Figura 5.7**). Este ácido se ha detectado previamente en diferentes partes del olivo (Véase apartado 3.3 en Antecedentes Bibliográficos). Junto a este ácido, también se identificaron los ácidos maslínico y oleanólico. De los tres ácidos triterpénicos, el maslínico es el más abundante en las tres variedades, encontrándose en mayor concentración en la raíz de la variedad 'Koroneiki', seguida de 'Picual' y 'Frantoio'. En todos los casos, la concentración de estos tres componentes disminuye al pasar de octubre a noviembre, con la excepción del ácido betulínico de la variedad 'Picual', cuyo contenido crece a la inversa. También cabe destacar que, en su conjunto, los contenidos en raíz de estos tres ácidos triterpénicos están bastante por debajo de los contenidos en fruto, hoja y tallo (**Figura 5.8**).



Ác. betulínico (**47**)

**Figura 5.7.** Estructura química del triterpeno pentacíclico ácido betulínico.

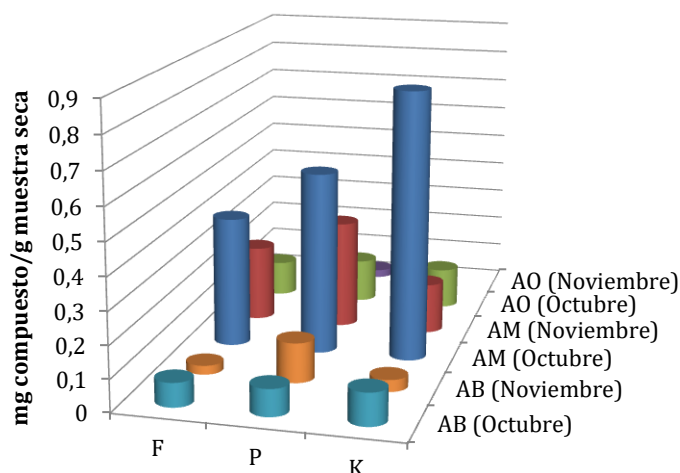


**Figura 5.8.** Contenido en ácidos betulínico (AB), maslínico (AM) y oleanólico (AO) en las muestras de raíz estudiadas (F: Frantoio; P: Picual; K: Koroneiki).

En este tejido vegetal, el ácido maslínico es el más abundante, encontrándose en mayor concentración en la raíz de la variedad 'Koroneiki', seguida de 'Picual' y 'Frantoio'. En todos los casos, la concentración de estos tres ácidos triterpénicos disminuye durante el periodo estudiado, con la excepción del ácido betulínico en la variedad 'Picual', cuyo contenido muestra una tendencia creciente. El ácido oleanólico no se detectó en las muestras de noviembre de 'Frantoio' y 'Koroneiki'.

Los resultados derivados de este estudio ponen de manifiesto la potencial utilidad de las hojas y tallos de olivo como posible fuente de obtención de los ácidos oleanólico (AO) y maslínico (AM), así como de los alcoholes triterpénicos eritrodiol (Er) y uvaol (Uv). Por otro lado, en la pulpa del fruto sólo se han detectado AO y AM, y se observa cómo su concentración aumenta de octubre a noviembre. Teniendo en cuenta las propiedades beneficiosas de estos ácidos triterpénicos, podrían utilizarse los datos de concentración de tales compuestos para encontrar el momento óptimo de recolección del fruto con el que obtener aceites saludables. En este sentido, el mes de noviembre podría ser un momento óptimo de recolección de aceituna, ya que, como describe el Dr. Peragón para la variedad 'Picual',<sup>437</sup> en meses posteriores se observa una

gran disminución de la concentración de estos compuestos en fruto, también observado por otros autores.<sup>439</sup> Por último, sólo en las muestras de raíz estudiadas se ha detectado el ácido betulínico, coincidiendo con lo observado por Jiménez-Herrera *et al.*<sup>522</sup> en muestras de raíz de olivo 'Picual' recogidas en la provincia de Jaén, aunque otros autores han identificado este compuesto en la cera que cubre la hoja de olivo de las variedades 'Coratina' y 'Cipressino'.<sup>523</sup>

## **6. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECOIRIDOIDES EN *Olea europaea* L.**

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad concedió el proyecto de investigación “Secoiridoides del olivo como nuevos nutraceuticos moduladores epigeneticos de la respuesta inmuno-inflamatoria” (AGL2017-89342-P), de cuyo equipo de investigación formaba parte el Dr. Altarejos, director de esta Tesis, siendo investigadora principal del mismo la profesora del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, Dra. Dña. Catalina Alarcón de la Lastra. El objetivo general de este proyecto era investigar la funcionalidad de una selección de secoiridoides del olivo y sus derivados metilados en la modulación de la respuesta inmunoinflamatoria a través de mecanismos epigenéticos. Para ello, se diseñó un proyecto consistente en el aislamiento y caracterización química de los principales secoiridoides del olivo y posterior *O*-metilación, con la finalidad de obtener derivados con mayor estabilidad química y mejor perfil farmacocinético. Posteriormente se llevarían a cabo estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* sobre estos compuestos, que confirmasen la implicación del epigenoma en sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. El fin último del proyecto sería la generación de nuevos nutraceuticos que mejorasen parámetros de salud en patologías inmunoinflamatorias como, por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico (LES).

Para ello se hizo necesaria la búsqueda de fuentes naturales de las que obtener estos compuestos y sus precursores, para llevar a cabo su aislamiento directo o su obtención por vía sintética, respectivamente.

## 6.1 Aislamiento y purificación de oleaceína, oleocantal y aglicones de oleuropeína y ligustrósido a partir de aceite de oliva

Como se recoge en el capítulo de Antecedentes Bibliográficos de esta Memoria (Apartado 2.3.2), el aceite de oliva presenta en su composición lo que se denomina fracción o porción fenólica, constituida por una serie de compuestos de naturaleza fenólica entre los que se encuentran los cuatro siguientes: oleaceína (OLCN), oleocantal (OLCT) y los aglicones de oleuropeína (Agl-OL) y ligustrósido (Agl-LIG) (**Figura 6.1**). En un primer intento de obtención de estos compuestos en pequeña cantidad se procedió a su aislamiento directo a partir de su fuente natural (el aceite de oliva), como se describe en los siguientes apartados.

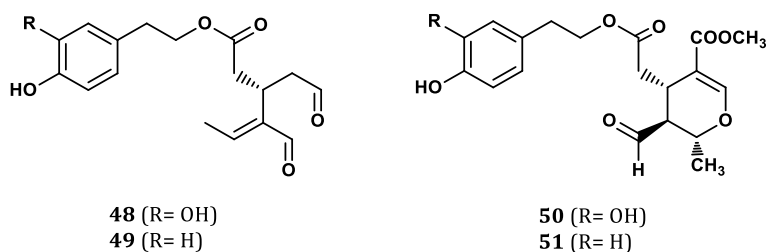


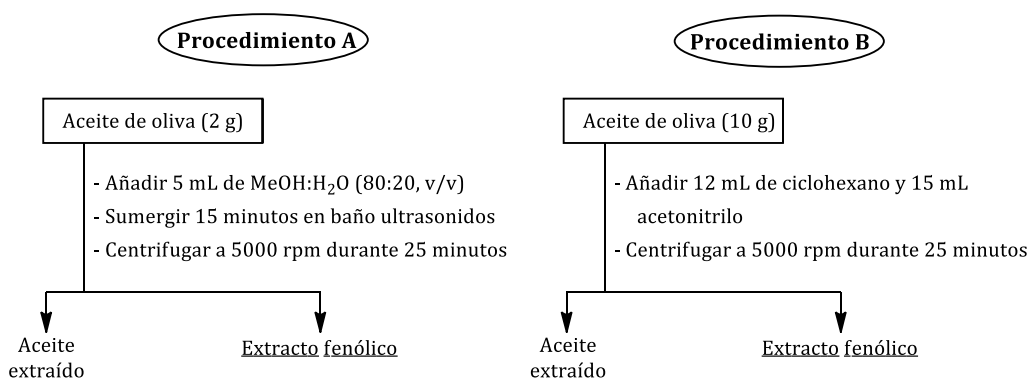
**Figura 6.1.** Estructura química de los compuestos OLCN (**48**), OLCT (**49**), Agl-OL (**50**) y Agl-LIG (**51**), aislados a partir de aceite de oliva.

### 6.1.1 Extracción del aceite de oliva y análisis del extracto por HPLC-DAD

La muestra de aceite de oliva utilizada por primera vez para obtener los fenoles objeto de estudio fue proporcionada por los Drs. Francisco Espínola y Manuel Moya, profesores del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, dentro de un acuerdo de colaboración firmado en representación de su grupo de investigación (TEP-233) y el del autor y directores de esta Tesis (FQM-182) para aislar OLCT y OLCN, de calidad “patrón”, a partir de aceite de oliva.



En primer lugar, se seleccionaron dos métodos de obtención de extractos de aceite de oliva, de entre los recogidos en bibliografía, para poder elegir el más adecuado a partir del cual proceder con el aislamiento de los fenoles objetivo. El primero de ellos corresponde al recogido en el procedimiento del Consejo Oleícola Internacional (COI) sobre “Determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC” (Procedimiento A),<sup>524</sup> y el segundo al descrito por Karkoula *et al.* (Procedimiento B)<sup>525</sup> (**Esquema 6.1**).



**Esquema 6.1.** Métodos ensayados para la extracción de aceite de oliva: Procedimiento A (COI)<sup>524</sup> y procedimiento B (Karkoula *et al.*)<sup>525</sup>.

La extracción de la misma muestra de aceite de oliva por un procedimiento y otro permitió concluir que el procedimiento A tiene ventajas sobre el B por dos motivos: (a) el procedimiento A ofreció un mayor rendimiento de extracción (0.4%) que el B (0.2%); (b) el cromatograma HPLC del extracto obtenido por el procedimiento A resultaba ser algo “más limpio” en los fenoles objetivo y, por lo tanto, más adecuado para llevar a cabo la tarea posterior de aislamiento de estos compuestos.

Empleando el procedimiento A se obtuvieron 4.48 g de porción fenólica a partir de 1.18 Kg de aceite de oliva, la cual se analizó por HPLC–DAD (Método de elución F; véase apartado 13.1.2 en *Materials and Methods*) (**Figura 6.2**) y también por HPLC–DAD/ESI–MS para localizar los picos correspondientes a los fenoles objetivo.

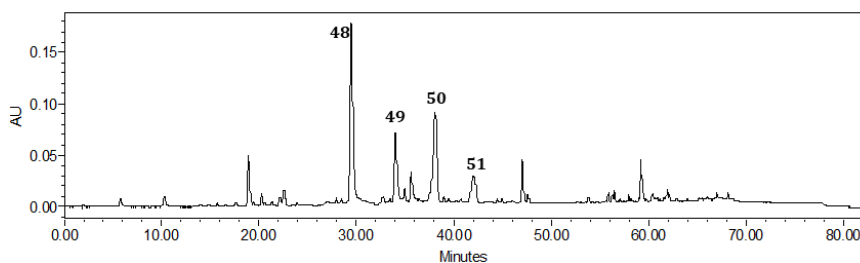


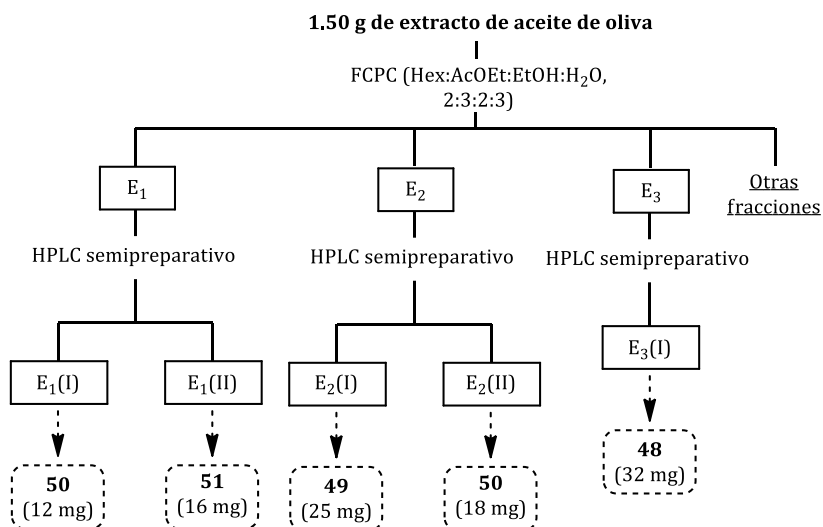
**Figura 6.2.** Cromatograma de HPLC–DAD del extracto de aceite de oliva, a 280 nm, obtenido por el procedimiento A.

En el cromatograma de la **Figura 6.2** se observa a simple vista (aun sin datos de cuantificación) que el compuesto mayoritario del extracto de este aceite de oliva es oleaceína (OLCN, **48**), seguido del aglicón de oleuropeína (Agl-OL, **50**). El tercer componente en presencia sería oleocantal (OLCT, **49**) y el cuarto, el aglicón de ligustrósido (Agl-LIG, **51**). Estos cuatro picos cromatográficos destacan respecto de los demás, por lo que, en principio, este aceite de oliva podría ser adecuado para llevar a cabo el aislamiento de los fenoles objeto de estudio.

### **6.1.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de aceite de oliva y aislamiento de secoiridoides**

Trabajos previos han descrito que los cuatro compuestos que se pretenden aislar (OLCN, OLCT, Agl-OL, Agl-LIG) poseen cierta labilidad en contacto con las fases estacionarias sólidas habitualmente utilizadas en las cromatografías en columna (gel de sílice),<sup>526</sup> motivo por el que posiblemente no hayan podido comercializarse hasta hace poco tiempo. Por tal razón, y teniendo en cuenta la experiencia positiva que estábamos adquiriendo en las fechas en las que se inició este trabajo, con relación al empleo de la cromatografía en contracorriente, tipo FCPC (cromatografía rápida de partición centrífuga), para fraccionar extractos fenólicos de maderas de cerezo y ciruelo, decidimos utilizar también esta técnica con la porción fenólica del aceite de oliva. De esta manera, una alícuota de porción fenólica (1.5 g) se cromatografió por FCPC, empleando una mezcla de disolventes, previamente optimizada, compuesta por

Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:3:2:3, v/v/v/v). Se recogieron un total de diecisiete fracciones, se analizaron por HPLC y se agruparon en 3 fracciones principales, atendiendo a su composición, y desechando aquellas que no contenían los compuestos de interés (**Esquema 6.2**).



**Esquema 6.2.** Fraccionamiento y aislamiento de componentes del extracto hidroalcohólico de aceite de oliva.

Se comprobó por HPLC–DAD que la agrupación E<sub>1</sub> estaba constituida principalmente por dos compuestos (**50** y **51**). La purificación de ambos se llevó a cabo por HPLC semipreparativo, empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo y agua, lo que condujo al aislamiento de los compuestos puros **50** y **51**.

La agrupación E<sub>2</sub> estaba constituida por una mezcla de los compuestos **49** y **50**, que se aislaron en estado puro por HPLC semipreparativo, empleando también mezclas de acetonitrilo y agua como fase móvil.

Por último, la agrupación E<sub>3</sub> estaba formada principalmente por el compuesto **48**, que se pudo obtener en estado puro nuevamente tras HPLC semipreparativo.

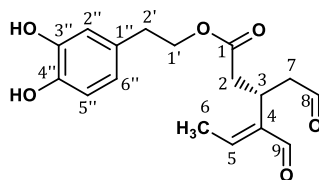
Teniendo en cuenta la eficacia de este protocolo de purificación de OLCT y OLCN (así como de Agl-OL y Agl-LIG) y su novedad respecto de los métodos descritos hasta el momento, los miembros de los grupos de investigación FQM-182 y TEP-233, incluidos en el acuerdo de colaboración arriba indicado, decidieron iniciar los trámites de solicitud de una patente de invención a la Oficina Española de Patentes y Marcas, la cual hubo de ser retirada como consecuencia de la publicación en esas fechas del trabajo del profesor Skaltsounis,<sup>419</sup> en el que se describía un proceso integrado de recuperación de fenoles del aceite de oliva por extracción líquido-líquido y cromatografía en contracorriente idéntica a la empleada en este trabajo.

### **6.1.3 Elucidación estructural de los compuestos aislados a partir de aceite de oliva**

La determinación estructural de los compuestos aislados de la porción fenólica del aceite de oliva se llevó a cabo por RMN, EM y por medición de su rotación óptica, dado que todos ellos son compuestos quirales. La exposición de los datos físicos de cada fenol aislado se ha hecho ordenadamente de acuerdo a su tiempo de retención en HPLC.

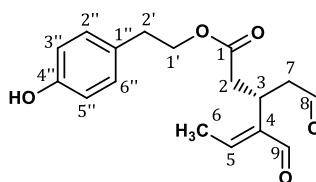
El compuesto **48** (OLCN) presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  319  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{17}H_{20}O_6$ . Su espectro de RMN- $^1H$  se caracteriza por presentar un sistema de espín de protones aromáticos ABX, constituido por las señales que aparecen a 6.77 ppm (doblete, H-5'',  $^3J=8.1$  Hz), a 6.69 ppm (doblete, H-2'',  $^4J=1.9$  Hz) y a 6.58 ppm (doble doblete, H-6'',  $^4J=1.9$  Hz;  $^3J=8.1$  Hz), característico de un anillo aromático 1',3',4'-trisustituido. También presenta dos señales de protones aldehídicos a 9.62 ppm (singlete ancho, H-8) y 9.19 ppm (doblete, H-9,  $^4J=1.9$  Hz), que correlacionan en HSQC con los carbonos carbonílicos C-8 (200.96 ppm) y C-9 (195.77 ppm), respectivamente. Asimismo, se observan dos señales asignables a protones metínicos a 6.63 ppm (cuadruplete, H-5,  $^3J=7.0$  Hz), correspondiente a un protón olefínico, y a 3.57-3.65 ppm (multiplete, H-3). Por otro lado, aparecen señales de protones metilénicos a 4.11-4.24 ppm (multiplete, H-1'), una señal a 2.92 ppm (doble doble doblete, H-7b,  $^3J=1.8$  Hz;  $^3J=8.3$  Hz;  $^3J=18.4$  Hz) y otra a 2.72-2.78 ppm (multiplete, H-7a), asignables a dos

protones alifáticos situados en posición  $\alpha$  respecto a un grupo carbonilo, y dos señales doblete a 2.67 ppm (H-2b,  $^3J=7.1$  Hz;  $^2J=15.7$  Hz) y a 2.60 ppm (H-2a,  $^3J=6.6$  Hz;  $^2J=15.7$  Hz) correspondientes a dos protones en posición  $\alpha$  respecto de un éster. Por último, aparece una señal doblete a 2.04 ppm (H-6,  $^3J=8.1$  Hz) asignable a un grupo metilo sobre carbono olefínico. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se observan 6 señales asignables a carbonos aromáticos, dos de ellas corresponden a carbonos oxigenados (143.51 ppm, C-3''; y 142.73 ppm, C-4''), tres a metinos (121.17 ppm, C-6''; 116.26 ppm, C-2''; y 115.26 ppm, C-5'') y una a carbono cuaternario (130.43 ppm, C-1''), confirmando la estructura de anillo aromático trisustituido indicada arriba. También se observa otra señal de carbonilo asignable a éster (172.00 ppm, C-1), aparte de las ya comentadas más arriba pertenecientes a dos grupos aldehído. Por otro lado, aparecen dos señales correspondientes a carbonos olefínicos, uno de ellos cuaternario (143.13 ppm, C-4) y el otro metínico (155.20 ppm, C-5). Por último, se observan seis señales de carbonos alifáticos, cuatro de ellas corresponden a metilenos (65.22 ppm, C-1'; 46.21 ppm, C-7; 36.94 ppm, C-2; y 34.21 ppm, C-2'), una a un metino (27.16 ppm, C-3) y la restante a un metilo (15.29 ppm, C-6). Las señales se asignaron de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de rotación específica  $[\alpha]_D^{25} -4.5^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **48** la estructura de (-)-oleaceína, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>527</sup>



(-)-Oleaceína (**48**)

El compuesto **49** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  303  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{17}H_{20}O_5$ . Su espectro de RMN- $^1H$  es similar al del compuesto **48** a excepción de la parte aromática que, en este caso, se caracteriza por presentar un sistema de espín  $A_2B_2$ , constituido por las señales que aparecen a 7.03 ppm (doblete, H-2'',6'',  $^3J=8.6$  Hz) y a 6.74 ppm (doblete, H-3'',5'',  $^3J=8.6$  Hz), característico de un anillo aromático *para*-disustituido. Esto se confirma con su espectro de RMN- $^{13}C$ , en el cuál aparecen 4 señales asignables a carbonos aromáticos, 2 de ellas correspondientes a metinos (115.36 ppm, C-3'',5''; 129.99, C-2'',6''), una a carbono oxigenado (154.46 ppm, C-4'') y otra a carbono cuaternario (129.56 ppm, C-1''). Las señales se asignaron de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica  $[\alpha]_D^{25} -1.7^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **49** la estructura de (-)-oleocantal, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>406</sup>



(-)-Oleocantal (**49**)

El cromatograma HPLC de la fracción  $E_1(I)$  mostró un sólo pico, lo que apuntaba a la presencia, *a priori*, de un solo compuesto. Igual sucedía con la fracción  $E_1(II)$ . Sin embargo, los espectros de RMN de ambas fracciones indicaban la presencia de tres y cuatro diastereoisómeros, respectivamente, en diferentes proporciones (**Figuras 6.3 y 6.4**). El análisis por RMN de la fracción  $E_1(I)$  indicó que se trataba de la forma monoaldehídica de la aglicona de oleuropeína (Véase a continuación) y la integración de las señales correspondientes al protón aldehídico de cada estereoisómero (**Figura 6.3**) permitió determinar la proporción de cada uno de ellos en

la fracción (**Figura 6.4**). La proporción encontrada fue de 1:0.18:0.07, siendo el estereoisómero mayoritario el de configuración (3*S*,4*S*,5*R*), seguido del de configuración (3*S*,4*S*,5*S*) y, por último, el (3*S*,4*R*,5*R*). Esta deducción está soportada por lo observado y descrito previamente por otros autores.<sup>393,395</sup>

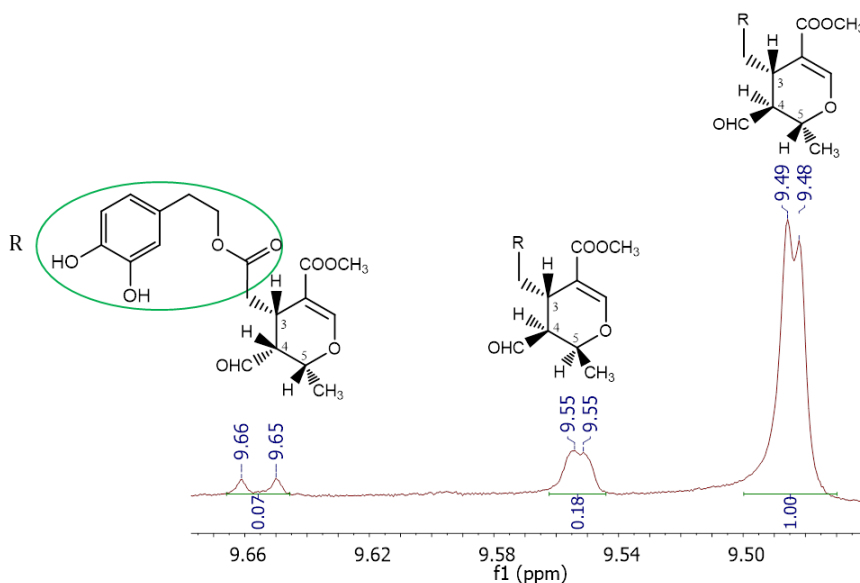


**Figura 6.3.** Ampliación del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (δ 9.45-9.70 ppm) del compuesto **50** (Aglicona de oleuropeína).

Por otro lado, la fracción E<sub>1</sub>(II) se encontró que estaba constituida por cuatro diastereoisómeros de la forma monoaldehídica del aglicón de ligustrósido, ya que en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se mostraban cuatro señales asignables al protón aldehídico de cada una de ellos. Tres de estos componentes coincidían con las formas diastereoisoméricas comentados anteriormente para la forma monoaldehídica del aglicón de oleuropeína. La cuarta señal aparece como un doblete a un desplazamiento de 9.50 ppm (**Figura 6.4**). De acuerdo al estudio teórico llevado a cabo por Pérez-Trujillo y colaboradores,<sup>393</sup> esta señal podría pertenecer al diastereoisómero (3*S*,4*R*,5*S*). Asumiendo esta asignación como correcta y atendiendo a los valores de las

integrales para las cuatro señales de aldehído, la proporción relativa de cada isómero en la mezcla sería de 1:0.14:0.13:0.10 [(3S,4S,5R):(3S,4R,5S):(3S,4S,5S):(3S,4R,5R)], lo cual también han observado otros autores.<sup>319,393,395</sup>

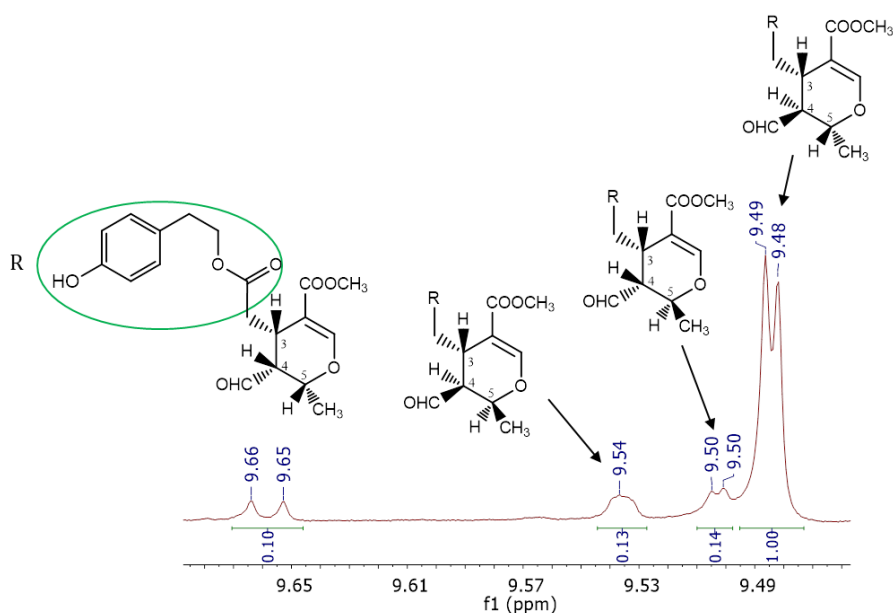


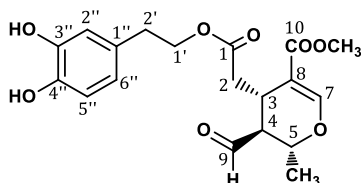
**Figura 6.4.** Ampliación del espectro de RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  9.47-9.66 ppm) del compuesto **51** (Aglicona de ligustrósido).

A continuación, se exponen los datos espectroscópicos de los diastereoisómeros mayoritarios de los compuestos contenidos en las fracciones E<sub>1</sub>(I) y E<sub>1</sub>(II).

El compuesto **50** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  377 [M-H]<sup>-</sup>, compatible con una fórmula molecular de C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>. Su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presenta dos conjuntos de señales de protones aromáticos a 6.74-6.78 ppm (multiplete, H-2'',5'') y a 6.58-6.60 ppm (multiplete, H-6''), que integran por dos protones y un protón, respectivamente, lo cual podría indicar la presencia de un anillo aromático 1',4',5'-trisustituido. También presenta una señal a

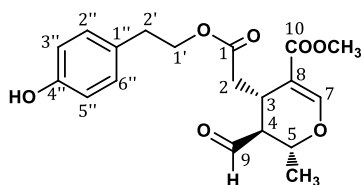


9.48 ppm (doblete, H-9,  $^4J=1.5$  Hz) asignable a un protón aldehídico. Asimismo, se observa un singlete a 7.56 ppm (H-7) asignable al protón de un grupo enol éter, un quintuplete a 4.43 ppm (H-5,  $^3J=6.5$  Hz), dos multipletes a 4.14-4.35 ppm (H-1') y a 3.36-3.38 ppm (H-3) y un triplete a 2.78 ppm (H-2',  $^3J=6.3$  Hz). También se observan dos señales que integran por tres protones cada una de ellas a 3.71 ppm (singlete, O-CH<sub>3</sub>) asignable a un grupo metoxilo, y a 1.37 ppm (doblete,  $^3J=6.7$  Hz) correspondiente al grupo metilo unido a C-5. Por último, aparecen dos dobles dobles a 2.86 ppm (H-2b,  $^3J=3.5$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz) y a 2.54 ppm (H-2a,  $^3J=9.6$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz) asignables a dos protones situados en posición  $\alpha$  de un grupo éster, y un doble triplete a 2.58 ppm (H-4,  $^3J=1.5$  Hz;  $^2J=16.1$  Hz). En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observan 6 señales asignables a carbonos aromáticos, dos de ellas corresponden a carbonos oxigenados (143.45 ppm, C-4''; y 142.92 ppm, C-3''), tres a metinos (121.17 ppm, C-6''; 116.20 ppm, C-2''; y 115.23 ppm, C-5'') y una a carbono cuaternario (130.31 ppm, C-1''). También aparecen tres señales asignables a grupos carbonilo, dos de ellas a grupo éster (171.84 ppm, C-1; y 167.68 ppm, C-10) y otra a aldehído (200.15 ppm, C-9). Por otro lado, aparecen dos señales correspondientes a carbonos olefínicos, uno de ellos cuaternario (106.33 ppm, C-8) y el otro metínico (155.89 ppm, C-5). Por último, se observan ocho señales de carbonos alifáticos, tres de ellas corresponden a metilenos (65.23 ppm, C-1'; 37.09 ppm, C-2; y 34.13 ppm, C-2'), tres a metinos (70.76 ppm, C-5; 54.35 ppm, C-4; y 26.91 ppm, C-3) y las dos restantes, a metilos (51.61 ppm, O-CH<sub>3</sub>; y 19.28 ppm, CH<sub>3</sub>-5). Las señales se asignaron de manera inequívoca mediante las correlaciones observadas en los espectros de RMN bidimensionales. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica  $[\alpha]_D^{25} +14.5^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **50** la estructura del diastereoisómero (3*S*,4*S*,5*R*) de la forma monoaldehídica del aglicón de oleuropeína, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía para este compuesto.<sup>393</sup>



Forma monoaldehídica de la aglicona de oleuropeína (**50**)  
(Diastereoisómero mayoritario)

El compuesto **51** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  361  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{19}H_{22}O_7$ . Su espectro de RMN- $^1H$  es similar al del compuesto **50** a excepción de la parte aromática, que en este caso se caracteriza por presentar un sistema de espín  $A_2B_2$ , constituido por las señales que aparecen a 7.05 ppm (doblete, H-2'',6'',  $^3J=8.5$  Hz) y a 6.75 ppm (doblete, H-3'',5'',  $^3J=8.5$  Hz), característico de un anillo aromático *para*-disustituido. Igual ocurre con su espectro de RMN- $^{13}C$ , en el cuál aparecen cuatro señales asignables a carbonos aromáticos, dos de ellas corresponden a metinos (115.36 ppm, C-3'',5''; 129.99, C-2'',6''), una a carbono oxigenado (154.46 ppm, C-4'') y otra a carbono cuaternario (129.56 ppm, C-1''). El resto de señales son similares a las del compuesto **50**. Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica  $[\alpha]_D^{25} +14.5^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **51** la estructura del diastereoisómero (3*S*,4*S*,5*R*) de la forma monoaldehídica de la aglicona de ligustrósido, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía para este compuesto.<sup>395</sup>



Forma monoaldehídica de la aglicona de ligustrósido (**51**)  
(Diastereoisómero mayoritario)

## 6.2 Búsqueda de aceites ricos en fenoles

Una vez aislados y caracterizados los compuestos **48–51**, se estudiaron en la Universidad de Sevilla, en el marco del proyecto AGL2017-89342-P arriba indicado, sobre un modelo de inflamación *ex vivo* de macrófagos peritoneales de ratón estimulados con la endotoxina bacteriana LPS (lipopolisacárido bacteriano), lo que permitió seleccionar a los compuestos **48** (OLCN) y **49** (OLCT) como más interesantes para ser evaluados posteriormente en un modelo de inflamación *in vivo* de LES. Para abordar tal objetivo sería necesario obtener estos compuestos a escala de gramos, por lo que se inició una búsqueda de aceites de oliva ricos en estos compuestos, a partir de los cuales proceder a su aislamiento.

### 6.2.1 Extracción de los aceites de oliva y análisis de los extractos por HPLC–DAD.

Los aceites de oliva a analizar se obtuvieron en diferentes productoras de aceite situadas en las provincias de Jaén y Córdoba, y otros se adquirieron en el mercado. Las respectivas porciones fenólicas se extrajeron siguiendo el procedimiento del COI (**Esquema 6.1**, apartado 6.1.1),<sup>524</sup> y en la **Tabla 6.1** se recogen los rendimientos de extracción de las muestras estudiadas.

**Tabla 6.1.** Rendimientos de extracción de los aceites estudiados.

| Referencia <sup>a</sup> | Rendimiento de extracción (%) |
|-------------------------|-------------------------------|
| AOVE-Koroneiki          | 0.09                          |
| AOVE-Arbequina          | 0.08                          |
| AOVE-Frantoio           | 0.14                          |
| AOVE-Cornicabra         | 0.16                          |
| AOVE-Picudo             | 0.12                          |
| AOVE-Picual_1           | 0.10                          |
| AOV-Picual_2            | 0.12                          |
| AOV-Picual_3            | 0.11                          |
| AOV-Picual_4            | 0.08                          |

|               |      |
|---------------|------|
| AOV-Picual_5  | 0.17 |
| AOV-Picual_6  | 0.10 |
| AOVE-Picual_7 | 0.15 |
| AOR_1         | 0.19 |
| AOR_2         | 0.08 |
| AOR_3         | 0.10 |

<sup>a</sup>AOV: Aceite de oliva virgen o virgen extra; AOR: Aceite de oliva de repaso.

El mayor rendimiento de extracción correspondió a una muestra de aceite de oliva de repaso (AOR\_1), seguida de una de aceite de oliva virgen 'Picual' (AOV-Picual\_5). Por el contrario, los valores más bajos se obtuvieron para la muestra de aceite de oliva virgen 'Arbequina', una muestra de 'Picual' (AOV\_4) y otra de aceite de oliva de repaso (AOR\_2).

### 6.2.2 Cuantificación de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal en los extractos hidroalcohólicos de aceite de oliva

A continuación, se analizaron por HPLC-DAD los diferentes extractos hidroalcohólicos obtenidos con el fin de determinar la concentración de **48** y **49** en cada uno de ellos, haciendo uso del método de calibración externa. Para ello se elaboraron las respectivas curvas de calibrado de **48** y **49**, empleando disoluciones de ambos patrones en acetonitrilo, aislados según se ha descrito en el apartado 7.1. Las concentraciones utilizadas estaban comprendidas entre 0.01 y 0.30 mg/mL y las expresiones matemáticas para cada una de las rectas patrón se recogen en la **Tabla 6.2**.

**Tabla 6.2.** Rectas de calibrado empleadas para la cuantificación de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal en las porciones fenólicas de los aceites de oliva estudiados.

| Compuesto      | Recta de calibrado                        |
|----------------|-------------------------------------------|
| (-)-Oleaceína  | $y = 5117.1x - 25442$ ( $r^2 = 0.9993$ )  |
| (-)-Oleocantal | $y = 3121.8x - 6706.6$ ( $r^2 = 0.9974$ ) |

Interpolando el valor del área del pico a 280 nm de ambos compuestos en la curva de calibrado pertinente, se determinó la concentración de cada uno de ellos en el aceite (**Tabla 6.3**).

**Tabla 6.3.** Cuantificación de los compuestos (–)-oleaceína (**48**) y (–)-oleocantal (**49**) en los aceites de oliva estudiados.

| Referencia <sup>a</sup> | mg de <b>48</b> /Kg aceite | mg de <b>49</b> /Kg aceite |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AOVE-Koroneiki          | 28.8                       | 41.9                       |
| AOVE-Arbequina          | 16.2                       | 38.5                       |
| AOVE-Frantoio           | 26.7                       | 37.8                       |
| AOVE-Cornicabra         | 30.7                       | 96.6                       |
| AOVE-Picudo             | 5.0                        | 92.5                       |
| AOVE-Picual_1           | 38.1                       | 79.7                       |
| AOV-Picual_2            | 6.2                        | 90.5                       |
| AOV-Picual_3            | 61.8                       | 99.5                       |
| AOV-Picual_4            | 47.5                       | 114.8                      |
| AOV-Picual_5            | 73.4                       | 82.5                       |
| AOV-Picual_6            | 21.3                       | 38.9                       |
| AOVE-Picual_7           | 72.0                       | 110.8                      |
| AOR_1                   | 156.5                      | 96.7                       |
| AOR_2                   | 8.7                        | 19.0                       |
| AOR_3                   | 20.7                       | 54.3                       |

<sup>a</sup> AOV: Aceite de oliva virgen o virgen extra; AOR: Aceite de oliva de repaso.

Como se observa en la **Tabla 6.3**, las cantidades de OLCN encontradas oscilan entre 5.0 y 156.5 mg/Kg aceite, con un valor promedio de 43.4 mg/Kg aceite, y las de OLCT entre 19.0 y 114.8 mg/Kg aceite, con un valor promedio de 71.7 mg/Kg aceite. La mayor cantidad de OLCN se localizó en una muestra de aceite de repaso (AOR\_1), seguida de dos aceites ‘Picual’ (AOV-Picual\_5; AOV-Picual\_3). En cuanto a la concentración de OLCT, el mayor valor se encontró en otro aceite ‘Picual’ (AOV-Picual\_4), seguido muy de cerca por la muestra AOV-Picual\_7. Si se comparan los aceites procedentes de diferente variedad de olivo se observa que la mayor

concentración en estos fenoles se encuentra en aceites de la variedad 'Picual', aunque hay que tener en cuenta que el número de muestras analizadas del resto de variedades ha sido mínimo, como para extraer conclusiones.

Teniendo en cuenta que, para obtener 2 g de OLCN en estado puro habría que procesar del orden de 18 Kg del aceite AOR\_1 (según se recoge en el apartado 6.1.2, se aislaron 32 mg de OLCN a partir de un aceite que contenía 149 mg/Kg de aceite), y para obtener 2 g de OLCT habría que partir de 28 Kg del aceite AOV-Picual\_4 (según se recoge en el apartado 6.1.2, se aislaron 25 mg de OLCT a partir de un aceite que contenía 98 mg/Kg de aceite), se concluyó que ningún aceite de los estudiados presentaba una concentración lo suficientemente alta en estos compuestos como para afrontar de manera razonable la obtención de la cantidad total necesaria de OLCN y OLCT para llevar a cabo los ensayos *in vivo*.

### **6.3 Aislamiento y purificación de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido a partir de madera de olivo**

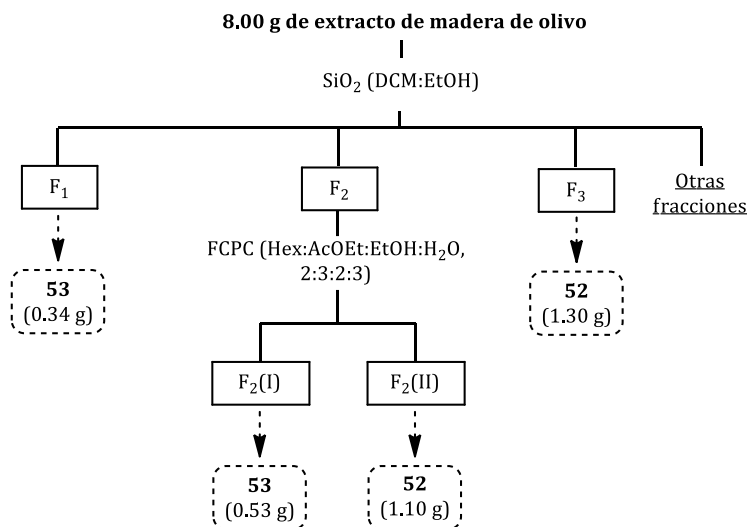
Tras descartar la obtención directa de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal a partir de aceite de oliva, debido a la baja concentración en la que se encuentran ambos fenoles en los aceites analizados y, consecuentemente, el considerable volumen de aceite que habría que procesar, se planteó la síntesis química de ambas moléculas a partir de los secoiridoides (-)-oleuropeína (OL, **52**) y (-)-ligustrósido (LIG, **53**), respectivamente. Para esta nueva tarea fue necesario elegir una fuente natural a partir de la que obtener ambos compuestos en cantidad suficiente. Se sabe que los compuestos OL y LIG están ampliamente distribuidos en especies de la familia de las oleáceas<sup>251</sup> y que nuestro grupo de investigación los ha aislado en el pasado de la parte leñosa de la poda del olivo.<sup>18</sup> Por tanto, se decidió en primera instancia acometer el aislamiento de OL y LIG a partir de madera de olivo, dado que se trata de una fuente natural completamente renovable y muy abundante en nuestro territorio, y que es un residuo agrícola de escaso valor económico, no un producto destinado al consumo humano, como sí lo es el aceite de oliva.

### **6.3.1 Material vegetal, obtención del extracto de madera de olivo y análisis**

La madera de olivo utilizada en esta ocasión pertenece a la variedad 'Picual' y fue recogida en abril de 2003 en una parcela situada en Fuensanta de Martos (Jaén). Esta muestra, convertida en virutas, se extrajo directamente con acetato de etilo a reflujo durante dos horas, obteniéndose un rendimiento de extracción del 4.7%.

### **6.3.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de madera de olivo 'Picual' y aislamiento de secoiridoides**

El extracto obtenido se fraccionó mediante columna cromatográfica de gel de sílice, empleando mezclas de diclorometano y etanol como fase móvil. Las diferentes fracciones recogidas se chequearon por CCF y se agruparon aquéllas que contenían los compuestos de interés en tres fracciones mayores (**Esquema 6.3**).



**Esquema 6.3.** Fraccionamiento y aislamiento de (–)-oleuropeína (52) y (–)-ligustrósido (53) a partir del extracto de AcOEt de madera de olivo.

Las fracciones  $F_1$  y  $F_3$  estaban constituidas por (-)-ligustrósido (74% de pureza, por HPLC) y (-)-oleuropeína (87%, por HPLC), respectivamente. La fracción  $F_2$  contenía una mezcla de LIG y OL y se re-cromatografió por FCPC, empleando una mezcla de disolventes compuesta por Hex:AcOEt:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:2:1:2, v/v/v/v), lo que permitió obtener OL y LIG con purezas del 94% y 84%, respectivamente.

Con el fin de obtener patrones de estos compuestos con la máxima pureza ( $\geq 98\%$ ), dos alícuotas (100 mg) de  $F_2(I)$  y  $F_2(II)$  se re-purificaron por HPLC semipreparativo, empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo y agua, lo que condujo al aislamiento de los compuestos puros **52** y **53**. Estos patrones se emplearon en la caracterización estructural de estos compuestos y en la elaboración de rectas de calibrado para la cuantificación de otras muestras.

Hay que indicar que, hasta la fecha, el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis ha obtenido las cantidades de OL y LIG, que en cada momento ha necesitado, empleando sucesivas cromatografías en columna de gel de sílice hasta llegar a su completa purificación, y que en esta ocasión se ha introducido por primera vez la técnica FCPC en el protocolo de aislamiento. Como en ocasiones previas se ha indicado, esta técnica de cromatografía en contracorriente ha demostrado en esta ocasión, una vez más, su eficacia y ventajas en la purificación de compuestos de naturaleza fenólica.

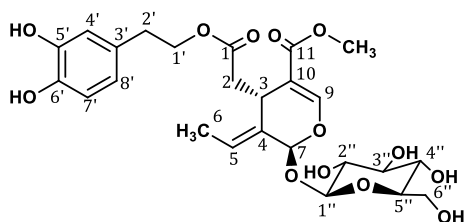
### **6.3.3 Elucidación estructural de los compuestos aislados a partir de madera de olivo**

La caracterización estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo por RMN y EM, así como por medida de su rotación específica ( $[\alpha]_D^{25}$ ), al tratarse de moléculas quirales.

El compuesto **52** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  539  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{25}H_{32}O_{13}$ . En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presenta, como los compuestos OLCN y Agl-OL, un sistema de espín ABX, constituido por las señales que aparecen a 6.69 ppm (doblete,

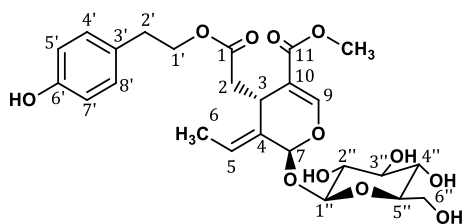


H-7',  $^3J=8.0$  Hz), a 6.66 ppm (doblete, H-4',  $^4J=1.7$  Hz) y a 6.55 ppm (doble doblete, H-8',  $^4J=1.5$  Hz;  $^3J=8.0$  Hz), característico de un anillo aromático 1',3',4'-trisustituido. Además, aparece un singlete a 7.51 ppm (H-9) característico de un protón de un grupo enol éter, un cuadruplete ancho a 6.08 ppm (H-5,  $^3J=6.9$  Hz), asignable a un protón olefínico, un singlete ancho a 5.91 ppm (H-7), correspondiente a un protón alílico acetálico, dos dobles tripletes a 4.21 ppm (H-1'b,  $^3J=7.1$  Hz;  $^2J=10.7$  Hz) y a 4.10 ppm (H-1'a,  $^3J=7.0$  Hz;  $^2J=10.7$  Hz), un doble doblete a 3.97 ppm (H-3,  $^3J=4.4$  Hz;  $^3J=9.0$  Hz), un triplete a 2.76 ppm (H-2',  $^3J=7.0$  Hz) y otros dos dobles dobles a 2.70 ppm (H-2a,  $^3J=4.4$  Hz;  $^2J=14.1$  Hz) y 2.43 ppm (H-2b,  $^3J=9.2$  Hz;  $^2J=14.1$  Hz). Asimismo, se observan dos señales asignables a metilos a 3.71 ppm (singlete, O-CH<sub>3</sub>) y a 1.66 ppm (doblete, H-6,  $^3J=7.1$  Hz). Por último, aparecen señales asignables a una unidad de glucosa. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observan 6 señales asignables a carbonos aromáticos, dos de ellas corresponden a carbonos oxigenados (146.21 ppm, C-5'; 144.89 ppm, C-6'), tres a metinos (121.30 ppm, C-8'; 117.03 ppm, C-4'; 116.41 ppm, C-7') y una a carbono cuaternario (130.70 ppm, C-3'), lo cual confirma la presencia de un anillo aromático trisustituido. También se observan dos señales correspondientes a dos carbonos de grupo éster a 173.20 ppm (C-1) y a 168.66 ppm (C-11), y cuatro asignables a carbonos olefínicos, dos de ellos cuaternarios, a 130.43 ppm (C-4) y a 109.34 ppm (C-10), y los otros dos metínicos a 155.14 ppm (C-9) y a 124.86 ppm (C-5). Se aprecia una señal asignable a un grupo metoxicarboxilo a 51.92 ppm (O-CH<sub>3</sub>) y otra a un metilo alílico a 13.56 ppm (C-6). Por último, además de las seis señales correspondientes a la unidad de glucosa, se observan tres señales de metileno a 66.89 ppm (C-1'), a 41.24 ppm (C-2) y a 35.37 ppm (C-2'), y otras dos de metinos a 95.15 ppm (C-7) y a 31.79 ppm (C-3). Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica  $[\alpha]_D^{25} -145.0^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **52** la estructura de (-)-oleuropeína, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>528</sup>



(-)-Oleuropeína (52)

El compuesto **53** presenta en su espectro de masas ESI-MS (modo negativo) el ion quasimolecular  $m/z$  523  $[M-H]^-$ , compatible con una fórmula molecular de  $C_{25}H_{32}O_{12}$ . Sus espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  son similares a los del compuesto **52** exceptuando la parte aromática. En este caso, en el espectro RMN- $^1H$  se observa un sistema de espín  $A_2B_2$  constituido por las señales que aparecen a 7.05 ppm (doblete, H-4',8',  $^3J=8.2$  Hz) y a 6.72 ppm (doblete, H-5',7',  $^3J=8.4$  Hz), característico de un anillo aromático *para*-disustituido. Esto se confirma con las cuatro señales que aparecen en su espectro de RMN- $^{13}C$  asignables a carbonos aromáticos, dos de ellas corresponden a metinos (116.27 ppm, C-5',7'; 131.00 ppm, C-4',8'), una a carbono oxigenado (157.05 ppm, C-6') y otra a carbono cuaternario (130.00 ppm, C-3'). Estos datos espectroscópicos, junto con el valor de su rotación específica  $[\alpha]_D^{25} -145.1^\circ$ , han permitido proponer para el compuesto **53** la estructura de (-)-ligustrósido, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>529</sup>



(-)-Ligustrósido (53)

## **6.4 Búsqueda de oleuropeína y ligustrósido en otras variedades de olivo y en fresno y aligustre**

Aun habiendo quedado constancia de que la madera de olivo de la variedad ‘Picual’ es una buena fuente de obtención de OL y LIG, se decidió ampliar la búsqueda de estos compuestos a los restos de poda de otras variedades de olivo, así como a otras especies de la familia de las oleáceas, en las cuales se ha descrito también la presencia de ambos compuestos.<sup>251</sup>

### **6.4.1 Material vegetal, obtención de extractos de madera y hoja de otras variedades de olivo, de fresno y aligustre**

Los restos de poda (madera y hoja) de variedades de olivo distintas a la variedad ‘Picual’ se recogieron principalmente en el centro IFAPA “Alameda del Obispo” (Córdoba) en el mes de febrero, coincidiendo con la época de poda del olivo. La selección de estas variedades, de entre las muchas que dispone este centro de investigación agraria, se hizo atendiendo a un trabajo publicado sobre composición fenólica de un gran número de aceites monovarietales obtenidos a escala de laboratorio con aceituna recolectada en el mismo jardín de variedades del Instituto.<sup>530</sup> Se recogieron muestras de once variedades, cuyos aceites habían salido en ese trabajo de investigación especialmente ricos en los fenoles OLCN y OLCT. Además, se recogieron en fincas no experimentales otras muestras de poda de olivo de las variedades ‘Alfafara’ (Enguera, provincia de Valencia), ‘Cerezuela’ (Mogón, provincia de Jaén), ‘Arbequina’ (Jaén) y ‘Cornezuelo’, ‘Cornicabra’ y ‘Picual’ (Albanchez de Mágina, provincia de Jaén), durante la época de poda del árbol (**Tabla 6.4**).

Por otro lado, se decidió estudiar la madera y hoja de otras oleáceas, como fresno (*Fraxinus angustifolia* L.) y aligustre (*Ligustrum vulgare* L.), habiéndose recogido las muestras de aligustre en el jardín botánico “Torre del Vinagre”, situado dentro del Parque Natural “Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas” (provincia de Jaén), y de fresno, en Albanchez de Mágina y Mogón (provincia de Jaén) (**Tabla 6.5**).

Todas las muestras recogidas consistieron en pequeñas ramas con tallos de 1 cm de grosor, aproximadamente. La extracción se realizó empleando secuencialmente diclorometano y acetato de etilo a reflujo durante 2 horas, siguiendo el mismo procedimiento empleado en casos anteriores (**Esquema 4.1**; apartado 4.1.1). En las **Tablas 6.4 y 6.5** se indican los valores de los rendimientos de extracción de todas las muestras estudiadas.

**Tabla 6.4.** Rendimientos de extracción de las muestras de olivo de diferentes variedades.

| Referencia    | Variedad                            | HOJA |        | MADERA |        |
|---------------|-------------------------------------|------|--------|--------|--------|
|               |                                     | %DCM | %AcOEt | %DCM   | %AcOEt |
| Oe-CO-1a(Ca)  | Caballo <sup>a</sup>                | 5.4  | 11.1   | 0.4    | 1.4    |
| Oe-CO-2a(Ka)  | Kalamon <sup>a</sup>                | 5.2  | 8.2    | 0.3    | 1.1    |
| Oe-CO-3a(PB)  | Plementa Bjelica <sup>a</sup>       | 4.2  | 7.1    | 0.4    | 1.2    |
| Oe-CO-4a(P)   | Picual <sup>a</sup>                 | 3.1  | 9.0    | 0.4    | 1.1    |
| Oe-CO-5a(Pe)  | Pendolino <sup>a</sup>              | 3.1  | 8.6    | 0.4    | 1.0    |
| Oe-CO-6a(EA)  | Enagua de Arenas <sup>a</sup>       | 4.8  | 7.6    | 0.4    | 1.6    |
| Oe-CO-7a(Ce)  | Cerezuela <sup>a</sup>              | 4.5  | 7.9    | 0.8    | 1.7    |
| Oe-CO-8a(Bl)  | Blanqueta <sup>a</sup>              | 4.2  | 8.6    | 0.4    | 1.2    |
| Oe-CO-9a(Pic) | Picudo <sup>a</sup>                 | 5.3  | 8.7    | 0.6    | 1.8    |
| Oe-CO-10a(Al) | Alfajara <sup>a</sup>               | 5.9  | 10.3   | 0.5    | 1.6    |
| Oe-CO-11a(NC) | Negrillo de la Carlota <sup>a</sup> | 6.3  | 12.5   | 0.6    | 1.5    |
| Oe-VA-1a(Al)  | Alfajara <sup>b</sup>               | 6.1  | 9.7    | 0.5    | 2.4    |
| Oe-LL-4a(Ce)  | Cerezuela <sup>c</sup>              | 5.1  | 9.1    | 0.6    | 1.6    |
| Oe-CS-1a (A)  | Arbequina <sup>d</sup>              | 5.4  | 9.5    | 0.6    | 1.6    |
| Oe-M-2a (Cc)  | Cornicabra <sup>e</sup>             | 7.1  | 7.9    | 0.5    | 1.0    |
| Oe-M-3b (Cz)  | Cornezuelo <sup>e</sup>             | 7.4  | 9.0    | 0.4    | 1.1    |
| Oe-M-4a (P)   | Picual <sup>e</sup>                 | 7.4  | 9.6    | 0.5    | 1.2    |

Muestras recogidas en: Córdoba<sup>a</sup>, Valencia<sup>b</sup>, Mogón<sup>c</sup> (Jaén), Jaén<sup>d</sup>, Albánchez de Mágina<sup>e</sup> (Jaén).

Como se aprecia en la **Tabla 6.4**, los rendimientos de extracción, tanto con DCM como con AcOEt, son mayores en hoja que en madera. También se observa un

mayor rendimiento con DCM que con AcOEt en ambos tipos de muestras. Si se analizan los datos de hoja, el mayor rendimiento de extracción se obtiene para la variedad 'Negrillo de la Carlota' (Oe-CO-11a(NC)) cuando se emplea AcOEt como disolvente. En el caso de la madera, el mayor rendimiento de extracción corresponde a la muestra de la variedad 'Alfajara' (Oe-VA-1a(Al)), que se recolectó en una finca situada en Valencia. Comparando muestras de la misma variedad, pero recogidas en lugares diferentes, se observa que las mayores diferencias corresponden a los rendimientos de extracción con DCM. Sin embargo, cuando se emplea AcOEt como disolvente, los rendimientos de extracción son más parecidos.

En cuanto a las muestras de fresno y aligustre (**Tabla 6.5**) el mayor rendimiento de extracción se observa para la muestra de hoja y madera de aligustre (Lv-C-1a), y éste es muy superior al obtenido para ambas muestras de fresno. Si se comparan las dos muestras de fresno se observa que la recogida en Albánchez de Mágina (Fx-M-1a(An)) presenta un rendimiento de extracción ligeramente superior a la muestra procedente de Mogón (Fx-LL-1a(An)).

**Tabla 6.5.** Rendimientos de extracción de las muestras de fresno y aligustre.

| Referencia   | HOJA |        | MADERA |        |
|--------------|------|--------|--------|--------|
|              | %DCM | %AcOEt | %DCM   | %AcOEt |
| Lv-C-1a      | 4.0  | 6.7    | 2.1    | 4.1    |
| Fx-LL-1a(An) | 0.2  | 1.0    | 0.2    | 0.5    |
| Fx-M-1a(An)  | 1.0  | 1.2    | 0.7    | 0.7    |

<sup>a</sup>Muestras recogidas en: Cazorla<sup>a</sup> (Jaén), Mogón<sup>b</sup> (Jaén) y Albánchez de Mágina<sup>c</sup> (Jaén).

#### **6.4.2 Cuantificación de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en los extractos de AcOEt de otras variedades de olivo y en fresno y aligustre**

A continuación, se analizaron todos los extractos de AcOEt obtenidos por HPLC-DAD con el fin de determinar la concentración de OL y LIG en cada muestra estudiada. La concentración de cada uno de estos compuestos se determinó por HPLC-DAD empleando el método de calibración externa, para lo cual se elaboró una curva de calibrado para cada compuesto. Se prepararon seis disoluciones metanólicas de concentraciones comprendidas entre 0.1–1.0 mg/mL de cada patrón aislado a partir de la madera de olivo (Apartado 6.3). Correlacionando el valor de área de cada señal HPLC a 280 nm frente a la concentración de cada uno de los patrones se obtuvieron las expresiones matemáticas para cada una de ellas (**Tabla 6.6**).

**Tabla 6.6.** Rectas de calibrado empleadas para la cuantificación de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en los extractos de AcOEt de las muestras de madera y hoja de olivo y de otras oleáceas.

| Compuesto        | Recta de calibrado                        |
|------------------|-------------------------------------------|
| (-)-Oleuropeína  | $y = 2825.9x - 19483$ ( $r^2 = 0.9986$ )  |
| (-)-Ligustrósido | $y = 1734.5x - 1655.9$ ( $r^2 = 0.9981$ ) |

En las **Figuras 6.5 y 6.6** se indican los valores de concentración de cada compuesto expresados en mg de compuesto por gramo de material vegetal.

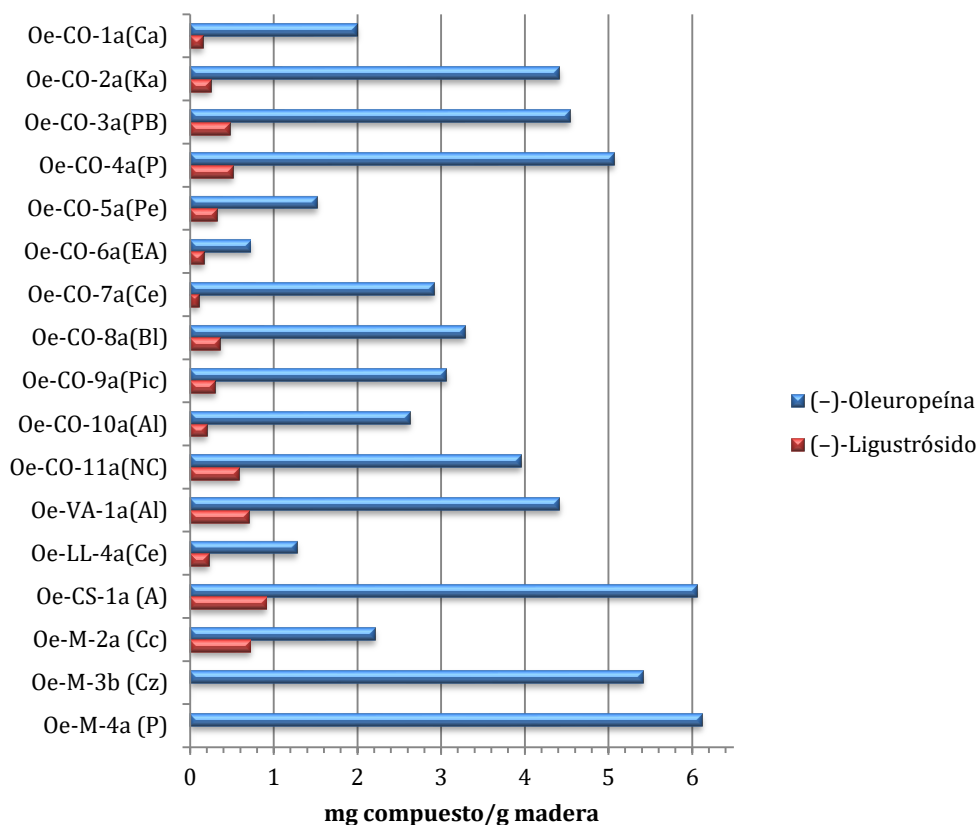


**Figura 6.5.** Concentración de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en las muestras de madera de olivo estudiadas.

La concentración de OL encontrada en las muestras de madera de olivo se situó entre 0.72 y 6.11 mg por gramo de muestra vegetal, y fue muy superior a la de LIG (0.10-0.91 mg/g muestra). La madera que presentó una mayor concentración de OL fue la de la variedad 'Picual' (Oe-M-4a(P)) recogida en Albánchez de Mágina, seguida de 'Arbequina' (Oe-CS-1a(A)), de Jaén, y 'Picual' (Oe-CO-4a(P)), del IFAPA de Córdoba. En cuanto a la concentración de LIG, el mayor valor se detectó en la muestra de madera de 'Arbequina' (Oe-CS-1a(A)), seguida de la de 'Cornicabra' (Oe-M-2a(CC)). Por el contrario, no se detectó el compuesto LIG en las muestras de madera de olivo 'Cornezuelo' (Oe-M-3b(Cz)) y 'Picual' (Oe-M-4a(P)) recogidas en Albánchez de Mágina, aunque la concentración de OL de estas muestras se encuentra entre las más elevadas.

No se observa relación entre el contenido en OL y LIG en madera de estas muestras y los contenidos de OLCN y OLCT en los aceites de oliva obtenidos a partir de las mismas variedades.<sup>530</sup>

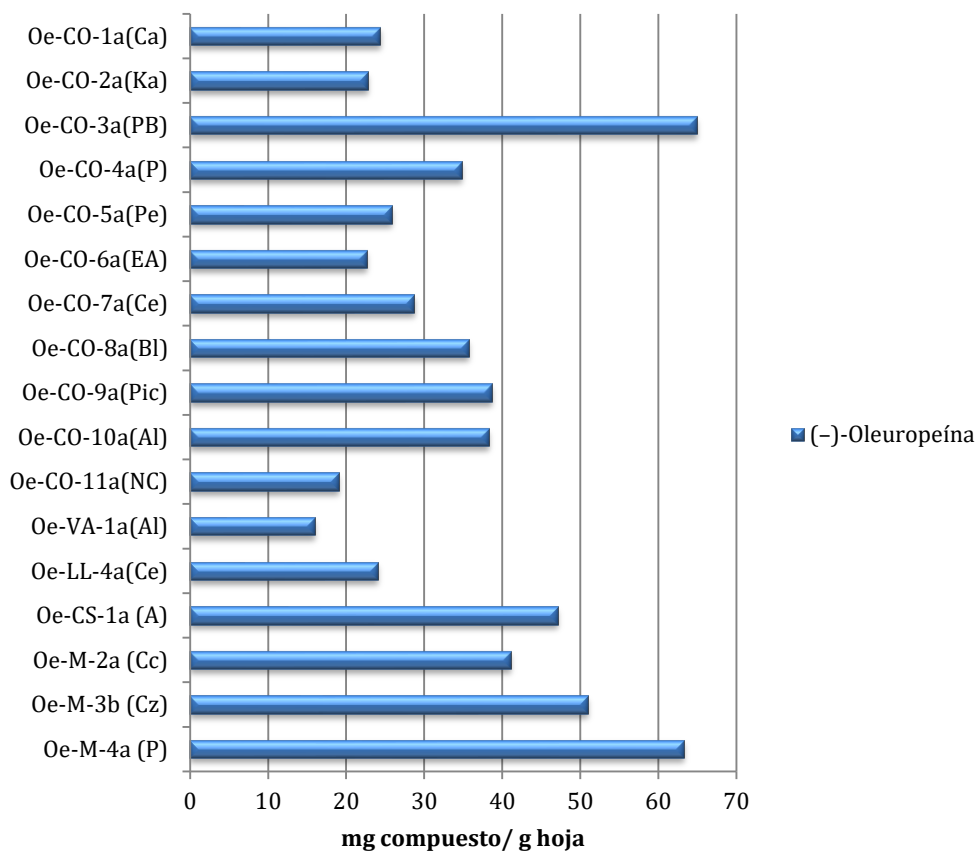


**Figura 6.6.** Concentración de (-)-oleuropeína en las muestras de hoja de olivo estudiadas.

La concentración de OL en hoja (16.02–64.91 mg/g muestra) fue muy superior a la encontrada en madera (0.72–6.11 mg/g muestra). La mayor concentración detectada de OL fue en hoja de la variedad ‘Plementa Bjelica’ (Oe-CO-3a(PB)), seguida de ‘Picual’ (Oe-M-4a(P)), recogida en Albánchez de Mágina. Por otro lado, no se detectó la presencia de LIG en ninguna de las hojas estudiadas. Comparando los valores obtenidos en las muestras de la misma variedad, pero recogidas en diferente lugar, se



observan diferencias en todas ellas, lo que indica que los aspectos medioambientales y agronómicos, parecen estar influyendo sobre la concentración de estos polifenoles en hoja.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, se deduce que la hoja es la fuente natural más interesante para la obtención de (–)-oleuropeína, frente a la madera, mientras que la madera de olivo, que presenta comparativamente una menor concentración de OL, es la fuente más apropiada para la obtención de (–)-ligustrósido.

También se determinó la concentración de OL y LIG en hoja y madera de fresno (*Fraxinus angustifolia* L.) y aligustre (*Ligustrum vulgare* L.) (**Tabla 6.7**), observándose que la mayor concentración de OL en madera correspondió a la muestra de aligustre (Lv-C-1a). En cuanto a la concentración de LIG en madera, el mayor valor se observó en la muestra de fresno (Fx-M-1a(An)) recogida en Albánchez de Mágina. Respecto a las muestras de hoja estudiadas, solo se encontró OL, detectándose el mayor valor en la muestra de fresno (Fx-M-1a(An)) recogida en Albánchez de Mágina. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en las muestras de restos de poda de olivo se observa que, en cuanto a la madera, las muestras de fresno presentan valores de concentración de OL del orden de los encontrados en madera de olivo. Sin embargo, en la muestra de madera de aligustre se detectó una concentración muy superior en este compuesto a la encontrada en el resto de maderas. Por otra parte, la concentración de OL presente en hoja en estas tres muestras de oleáceas (19.01–64.91 mg/ g muestra), fue del orden de la encontrada en las diferentes variedades de olivo (16.02–64.91 mg/g muestra).

**Tabla 6.7.** Concentración de (–)-oleuropeína (**52**) y (–)-ligustrósido (**53**) en hoja y madera de fresno y aligustre.

| Referencia   | Madera                       |                              | Hoja                       |                            |
|--------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
|              | mg de <b>52</b> /g<br>madera | mg de <b>53</b> /g<br>madera | mg de <b>52</b> /g<br>hoja | mg de <b>52</b> /g<br>hoja |
| Lv-C-1a      | 12.23                        | 0.01                         | 19.01                      | -                          |
| Fx-LL-1a(An) | 4.41                         | 0.25                         | 22.75                      | -                          |
| Fx-M-1a(An)  | 4.53                         | 0.47                         | 64.91                      | -                          |

## **6.5 Variación estacional de la concentración de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en madera y hoja de olivo ‘Picual’**

En esta búsqueda de la mejor fuente natural de OL y LIG, que nos permita disponer de cantidad adecuada de estos compuestos para llevar a cabo la síntesis de cantidades mayores de OLCN y OLCT, respectivamente, resultó de interés hacer un estudio de la variación de la concentración de OL y LIG en madera y hoja de olivo a lo largo de un año. Este estudio permitiría conocer el momento más idóneo para la recogida de material vegetal. Para ello, se recolectaron muestras de hoja y madera de olivo cada dos meses, a lo largo de un año, de un olivo elegido al azar en tres parcelas diferentes situadas en las localidades de Mogón, Fuensanta de Martos y Albánchez de Mágina (provincia de Jaén). La variedad seleccionada fue la ‘Picual’, ya que es la más cultivada en esta provincia y, en consecuencia, la que más volumen de poda proporciona a nivel mundial. Se comenzó la recogida de muestras en el mes de enero de 2019 y se finalizó en noviembre de 2019.

### **6.5.1 Material vegetal, obtención de extractos de madera y hoja de olivo y análisis**

El material vegetal utilizado para este estudio consistió en lo que localmente se conoce como “chupones” (o “varetas”), que son ramas de aproximadamente 1 cm de grosor que brotan en el interior de los troncos principales y que son eliminadas durante la poda del árbol, a finales del invierno (tras la recogida de la aceituna), y durante el “deschuponado”, a finales de verano. Tanto las muestras de hoja como de madera se extrajeron siguiendo el método de extracción empleado en cerezo (Apartado 4.1.1). En las **Figuras 6.7 y 6.8** se indican los porcentajes de extracción con AcOEt para cada muestra. En esta ocasión sólo se representan los valores obtenidos con este disolvente, ya que la presencia de OL y LIG en los extractos de DCM es mínima.

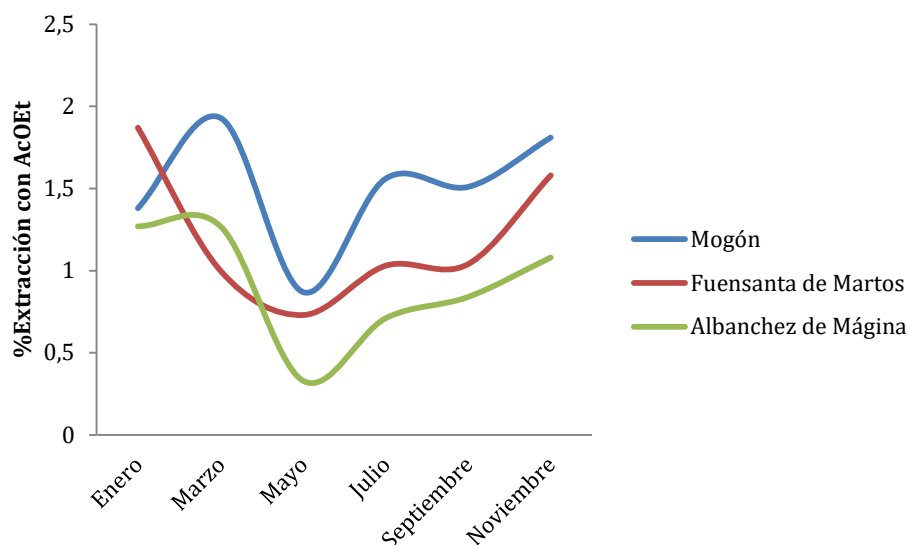


**Figura 6.7.** Rendimientos (%) de extracción con AcOEt de las muestras de madera de olivo del estudio estacional.

Para las muestras de madera recogidas en Mogón y Albánchez de Mágina, el máximo rendimiento coincide con el mes de marzo (aunque hay otro máximo relativo a finales de año). Sin embargo, la madera de Fuensanta de Martos presenta su rendimiento de extracción máximo un poco antes, en torno al mes de enero. El menor rendimiento de extracción se da en el mes de mayo en las tres parcelas muestreadas.

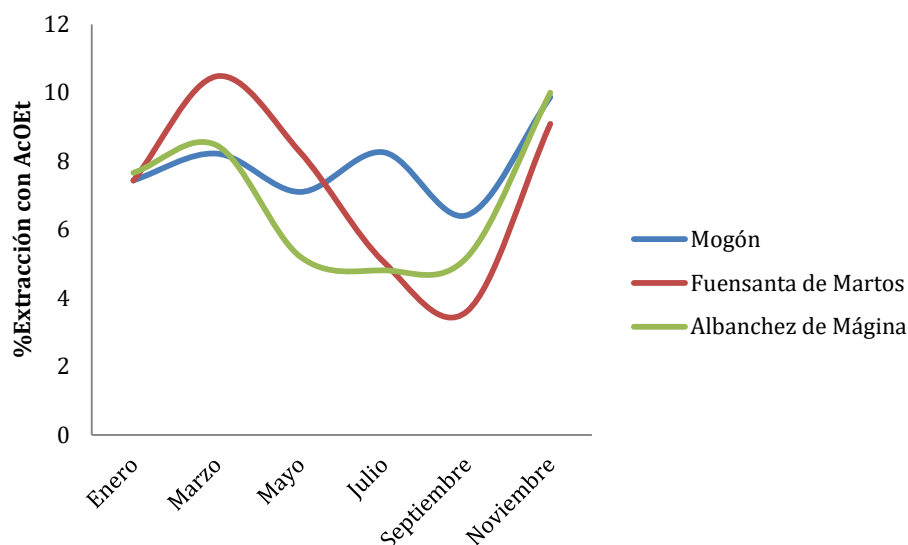


**Figura 6.8.** Rendimientos (%) de extracción con AcOEt de las muestras de hoja de olivo del estudio estacional.

En cuanto a las muestras de hoja, se observan máximos rendimientos de extracción al inicio de la primavera y a finales de año. En la hoja del olivo de Mogón permanece ese porcentaje prácticamente constante a lo largo del periodo estudiado (con un máximo relativo en el mes de julio). Esto no ocurre con las demás muestras, en las cuales se observa un mínimo a finales de verano.

Por otro lado, se quiso saber si el diámetro de la pieza de madera a extraer podría estar influyendo en la presencia de OL y LIG en la muestra, y para ello se recogió una misma rama principal de la poda del olivo situado en la parcela de Mogón (en febrero de 2020) y se cortó en tres fragmentos de diferente diámetro (1–1.5 cm; 4 cm; 10–13 cm). Las tres piezas de la misma rama se extrajeron con el mismo procedimiento empleado para el resto de muestras y se observó (**Tabla 6.8**) que el mayor valor en el rendimiento de extracción con AcOEt correspondía a la muestra de mayor diámetro.

**Tabla 6.8.** Rendimientos de extracción de una muestra de madera de olivo según el diámetro de la pieza extraída.

| Referencia          | Madera |        |
|---------------------|--------|--------|
|                     | %DCM   | %AcOEt |
| Oe-LL-5g (1.5-1 cm) | 1.36   | 3.56   |
| Oe-LL-5g (4 cm)     | 0.52   | 2.02   |
| Oe-LL-5g (10-13 cm) | 0.95   | 3.87   |

### 6.5.2 Cuantificación de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido en los extractos de AcOEt de madera y hoja de las muestras de olivo del estudio estacional

La concentración de OL y LIG en los extractos descritos en el apartado anterior se determinó por HPLC–DAD empleando el método de calibración externa. Para ello se hizo uso de las rectas de calibrado descritas en el apartado 6.4.2, y a partir del valor de área de pico a 280 nm se determinó la concentración de cada compuesto (**Figuras 6.9–6.11**).

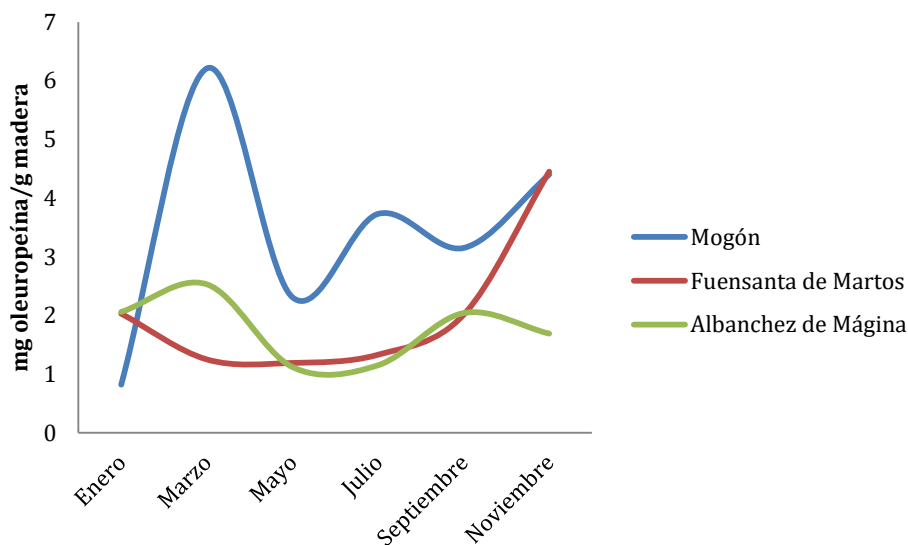


**Figura 6.9.** Contenido de (-)-oleuropeína en las muestras de madera de olivo del estudio estacional.

En las muestras de madera recogidas en Mogón y Albánchez de Mágina se observa que el mayor periodo de producción de OL coincide con el mes de marzo. Sin embargo, esta tendencia no se observa en la muestra de Fuensanta de Martos, que presenta un mínimo en este periodo. Por el contrario, el menor valor se encontró en mayo para las tres muestras. De nuevo, en los meses de mayo a julio se observa un nuevo incremento en la concentración de este compuesto en la madera de Mogón, y de julio a septiembre en la de Albánchez de Mágina. En la madera de Fuensanta de Martos, este incremento en OL se observó a partir de septiembre (*Figura 6.9*).

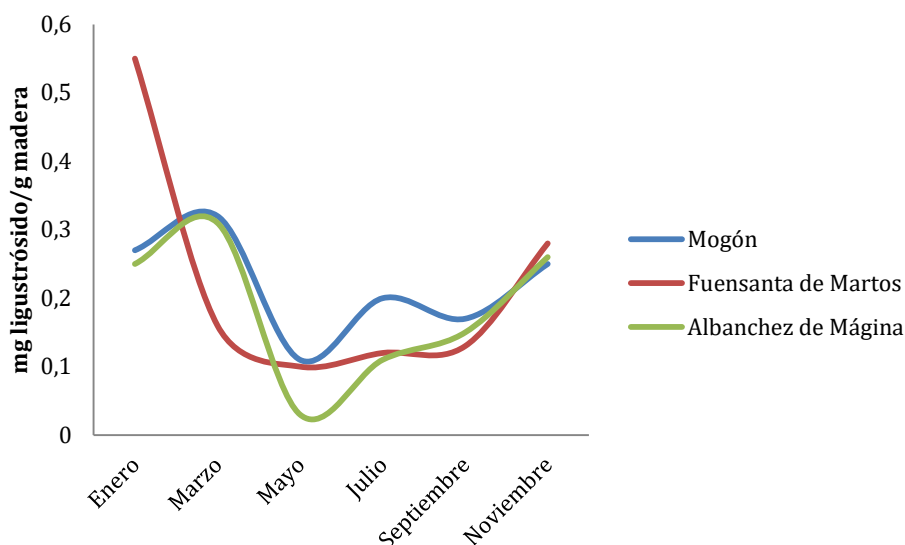


**Figura 6.10.** Contenido de (-)-ligustrósido en las muestras de madera de olivo del estudio estacional.

Con respecto al contenido en LIG, las maderas de Mogón y Albánchez de Mágina presentan una tendencia a lo largo del periodo estudiado muy parecida entre sí, y diferente a la observada para la madera de Fuensanta de Martos. Para las dos primeras, el mes de mayor producción de LIG es marzo y el de menor, mayo. En cambio, la mayor concentración de este compuesto en el olivo de Fuensanta de Martos ocurrió en enero. En las tres muestras se observa un nuevo máximo durante el mes de julio y otro en el mes de noviembre (*Figura 6.10*).

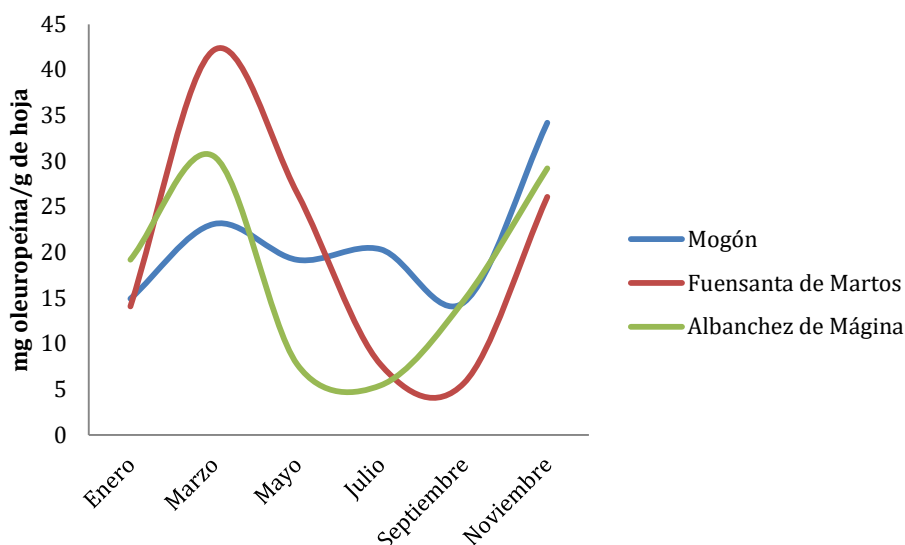


**Figura 6.11.** Contenido de (-)-oleuropeína en las muestras de hoja de olivo del estudio estacional.

En cuanto a la concentración de OL en las hojas de los tres olivos seleccionados se observa que el mayor valor lo ofrece el olivo de Fuensanta de Martos, coincidiendo con el inicio de la primavera. Esto también se observa en los otros dos olivos, aunque la concentración en OL es inferior. Por el contrario, la concentración más baja de OL en los tres olivos coincide con los meses de verano y vuelve a aumentar al inicio del otoño. En hoja de olivo no se detectó el compuesto (-)-ligustrósido (**Figura 6.11**).

Atendiendo a estos resultados, se puede considerar que la madera procedente de la poda, normalmente realizada durante los meses de febrero-abril, de los olivos de Mogón y Albánchez de Mágina, son una buena fuente natural de (-)-ligustrósido (y también de (-)-oleuropeína, aunque la hoja tiene ventajas). Sin embargo, esto no ocurre con el olivo de Fuensanta de Martos, el cual presenta la concentración más baja de LIG coincidiendo con los meses de poda.

En cambio, la hoja de los tres olivos es una excelente fuente natural de (-)-oleuropeína durante el periodo de poda, por delante de la madera. Además, se observa un aumento en la concentración de este componente a partir de septiembre, que se prolonga hasta las últimas muestras del estudio recogidas en noviembre. Esto

también es de gran interés, ya que, coincide con la época de recolección del fruto y en esta tarea agrícola también se obtiene hoja de olivo como residuo, lo que supondría un fácil acceso a este material vegetal.

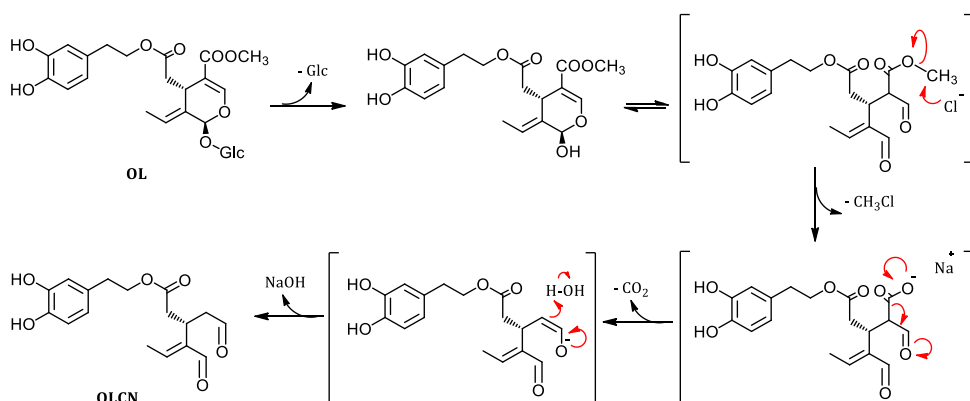
Respecto al contenido en OL y LIG en las piezas de madera de diferente grosor estudiadas, se observa que las de menor (1.5–1.0 cm) y mayor (10–13 cm) grosor presentan la concentración en OL (52) más elevada (3.56 y 3.87 mg/g de madera, respectivamente), frente a la pequeña cantidad encontrada en la pieza de tamaño intermedio (4 cm, 0.02 mg/g de madera). En cuanto a la cantidad de LIG (53), es la madera de mayor grosor la que tiene mayor cantidad (1.81 mg/g de madera), detectándose valores muy bajos en el resto (0.01 y 0.02 mg/g de madera). Atendiendo a estos resultados, se podría pensar que los contenidos en OL y LIG crecen con el diámetro de la pieza de madera, si bien no se debería concluir nada en este sentido hasta no realizar un mayor número de análisis.



## **7. SÍNTESIS DE (-)-OLEACEÍNA Y (-)-OLEOCANTAL Y SUS DERIVADOS METILADOS**

Como ya se ha indicado anteriormente, los fenoles del aceite de oliva, (-)-oleaceína (OLCN) y (-)-oleocantal (OLCT), han despertado gran interés en el ámbito científico, lo que hace necesario disponer de un protocolo que permita su obtención en cantidad suficiente para continuar evaluando sus propiedades biológicas y encontrar posibles aplicaciones. Sin embargo, la obtención de éstos a partir de aceite de oliva es poco viable, ya que las concentraciones en las que se encuentran son bajas y obligaría a procesar una gran cantidad de este alimento para obtener las cantidades necesarias (Apartado 6.2.2), al menos a partir de aceites de oliva destinados al consumo directo. Por este motivo, en los últimos años se ha trabajado en el desarrollo de procedimientos sintéticos que permitan obtener estos compuestos en el laboratorio, bien mediante semisíntesis a partir de sus precursores naturales, como la oleuropeína, que puede ser recuperada de desechos agrícolas, como las hojas o madera de olivo, o por síntesis total, empleando sustratos de partida comerciales.

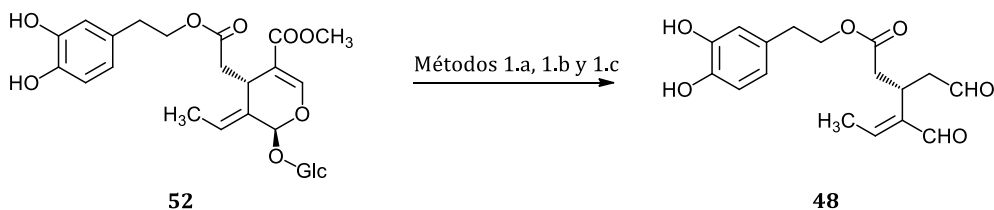
Antes de iniciarse el trabajo de investigación que se recoge en esta Tesis sobre síntesis de OLCN y OLCT, sólo se habían descrito dos procedimientos sintéticos de OLCN, empleando como producto de partida oleuropeína aislada a partir de extractos de hoja de olivo<sup>527</sup> o desmetiloleuropeína procedente del fruto.<sup>531</sup> En el primer caso, la reacción se llevaba a cabo a reflujo y empleando dimetilsulfóxido como disolvente. En esas condiciones se rompe el enlace *O*-glucosídico y se produce la descarboxilación, liberando el grupo carbometoxi del  $\beta$ -cetoéster. A continuación, se produce la apertura del anillo y se forma OLCN, aunque con rendimiento bajo (21.8%) (**Esquema 7.1**).<sup>527</sup> En el segundo caso, la desmetiloleuropeína se disuelve en agua y la reacción se lleva a cabo a 80 °C. La ruptura del enlace *O*-glucosídico está catalizada por un complejo de erbio (Er). Posteriormente, como en el caso anterior, se produce la descarboxilación, obteniéndose OLCN. Estos autores no indican el rendimiento de la reacción.<sup>531</sup>



**Esquema 7.1.** Mecanismo de reacción propuesto en bibliografía<sup>527</sup> para la obtención de oleaceína a partir de oleuropeína por reacción de Krapcho.

## 7.1 Síntesis de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal a partir de (-)-oleuropeína y (-)-ligustrósido

Los primeros intentos de síntesis de OLCN (**48**) y OLCT (**49**) a partir de OL (**52**) y LIG (**53**), respectivamente, se hicieron a pequeña escala, y los secoiridoides precursores se obtuvieron a partir de madera de olivo (Apartado 6). Los procedimientos sintéticos se optimizaron sobre OL, debido a la comparativamente mayor facilidad de obtención a partir de su fuente natural, y luego se ensayaron con LIG. Para la síntesis de OLCN a partir de OL se ensayaron tres métodos sintéticos, que se recogen a continuación (**Esquema 7.2**).



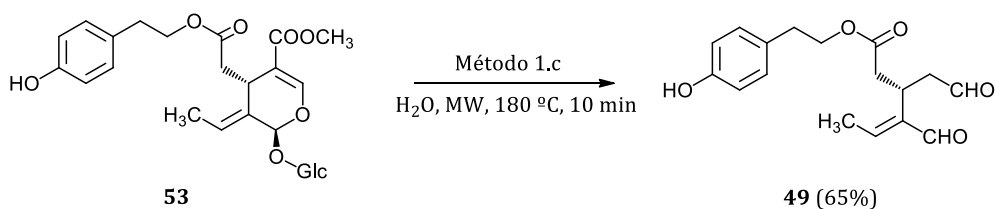
**Esquema 7.2.** Síntesis de (-)-oleaceína a partir de (-)-oleuropeína por reacción de Krapcho en diferentes condiciones (Véase apartado 10.4 en *Materials and methods*).

En los dos primeros métodos ensayados (métodos 1.a y 1.a) se hace uso de las condiciones experimentales clásicas de la descarboxilación de Krapcho, usando dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente, una pequeña cantidad de agua (10 eq.) y NaCl (2.0 eq.). En el método 1a se llevó a cabo la reacción a reflujo (180 °C), según las consideraciones descritas en bibliografía,<sup>527</sup> obteniéndose OLCN con un rendimiento de reacción en OLCN, tras su purificación (21%), similar al descrito por estos autores. Sin embargo, para el método 1.b se quiso hacer el intento de reacción en las mismas condiciones del método 1a, pero en un reactor de microondas a 180 °C. En este caso sólo se consiguió aumentar el rendimiento de reacción en tres puntos, aunque sí se redujo considerablemente el tiempo de reacción.

En tercer lugar, se llevó a cabo la reacción de Krapcho sobre OL con irradiación de microondas a 180 °C, pero sustituyendo DMSO por agua (método 1.c). Este intento estaba basado en el trabajo previo de Mason y Murphree,<sup>532</sup> de adaptación de las condiciones clásicas de descarboxilación de Krapcho a un reactor de microondas en medio acuoso y en ausencia de sal. Esto último (la ausencia de sal) también fue sugerido por el grupo de Fernández-Bolaños con posterioridad.<sup>533</sup> Si bien el agua es uno de los disolventes que ataca a los grupos aldehído del producto final (OLCN) y, por tanto, en principio poco justificado su uso, quisimos hacer la prueba para conocer si la mayor eficacia observada por Marson y Murphree sobre sustratos y productos finales no sensibles al agua, podría extrapolarse también a nuestros productos de partida (OL) y final (OLCN). Afortunadamente, la prueba fue un éxito, en parte inesperado, pues se consiguió obtener el producto final (OLCN), ya purificado (por FCPC), tras 10 minutos y con un rendimiento de reacción del 61%. Este fue el mejor resultado y se obtuvo en ausencia de NaCl u otras sales inorgánicas, que también se ensayaron, siguiendo las recomendaciones metodológicas del trabajo de Mason y Murphree. En el tiempo en el que estábamos inmersos en este desarrollo experimental se publicó el trabajo de Costanzo *et al.*,<sup>534</sup> en el que se describía la síntesis de OLCN a partir de OL en un reactor de microondas, en agua (en ausencia de DMSO) a 180 °C y en presencia de 2 equivalentes de NaCl. El rendimiento de reacción obtenido, tras 20 minutos de reacción, fue del 48%, calculado directamente sobre el crudo de reacción, es decir, sin proceder a la purificación del producto final (OLCN). Ello significa que, de momento, nuestro resultado es el mejor de los conocidos hasta la fecha.

Recientemente se ha publicado otro trabajo en el que se describe la síntesis de oleaceína y oleocantal a partir de oleuropeína y ligustrósido, con rendimientos del 30% y 33%, respectivamente.<sup>535</sup> En este caso, la ruptura del enlace *O*-glucosídico está catalizada por la enzima  $\beta$ -glucosidasa. Cabe destacar éste que es el único artículo encontrado en el que se describe la semisíntesis de oleocantal empleando el secoiridoide ligustrósido como precursor, aunque el rendimiento de reacción sigue siendo inferior al obtenido por nosotros.

Una vez conseguido este resultado positivo de semisíntesis de OLCN a partir de OL, se ensayaron las mismas condiciones experimentales (método 1.c) sobre LIG, obteniéndose OLCT, ya purificado (por FCPC), tras 10 minutos y con un rendimiento de reacción del 65% (**Esquema 7.3**).



**Esquema 7.3.** Síntesis de (-)-oleocantal (**49**) a partir de (-)-ligustrósido (**53**) por reacción de Krapcho (método 1.c).

Teniendo en cuenta que el mejor resultado de Costanzo *et al.* se produjo tras 20 minutos de reacción a 180 °C bajo irradiación de microondas, y en nuestro caso fue en las mismas condiciones, pero tras un tiempo de reacción de 10 minutos, decidimos hacer un seguimiento de la progresión de la reacción por HPLC, en función del tiempo. Para ello, se hicieron reaccionar 100 mg de cada uno de los secoiridoides de partida en las condiciones del método 1.c. La temperatura se mantuvo a 180 °C (este parámetro ya fue optimizado por Costanzo *et al.* y preferimos prestar atención sólo al tiempo de reacción) y se fueron extrayendo alícuotas del crudo de reacción cada dos minutos, haciéndoles un procesado rápido y analizándolas por HPLC–DAD. Se determinó en cada muestra la concentración del secoiridoide de partida sin reaccionar, así como del

producto final formado en cada momento (**Figuras 7.1 y 7.2**). En ambas reacciones se detectó la presencia del aglicón de oleuropeína (Agl-OL) y del aglicón de ligustrósido (Agl-LIG), en cada caso, lo cual ya había sido descrito por otros autores.<sup>527,534</sup> La cuantificación de OL, LIG, OLCN y OLCT se hizo empleando rectas de calibrado construidas previamente (Apartados 6.2.2 y 6.4.2). En el caso de los aglicones de ambos secoiridoides, la cuantificación se realizó con la recta patrón de su secoiridoide precursor.

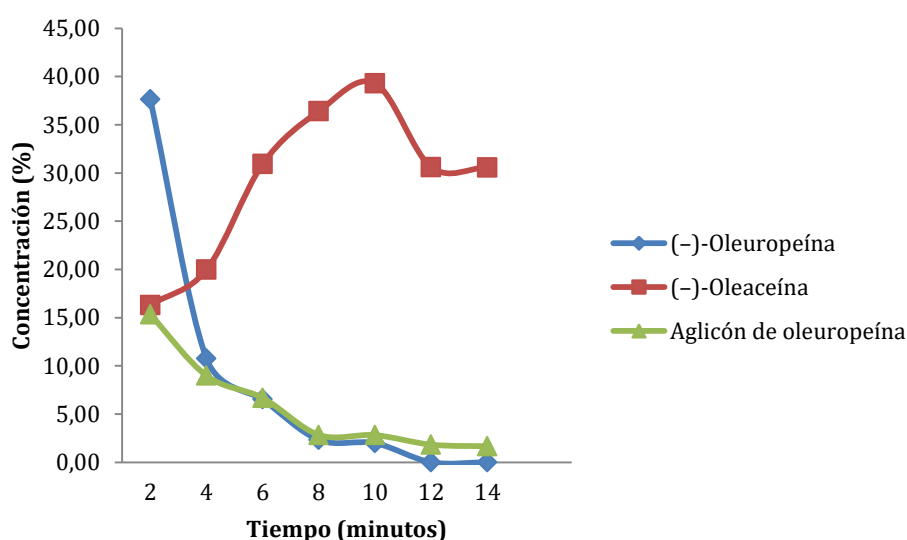


**Figura 7.1.** Variación con el tiempo del porcentaje de presencia de componentes en el crudo de reacción de semisíntesis de (-)-oleaceína a partir de (-)-oleuropeína.

En la **Figura 7.1** se aprecia, a medida que aumenta el tiempo de reacción, una disminución en la concentración de OL y de su aglicón, así como un progresivo aumento en la concentración de OLCN, que alcanza su valor máximo a los 10 minutos. A partir de este momento disminuye la concentración de OLCN.

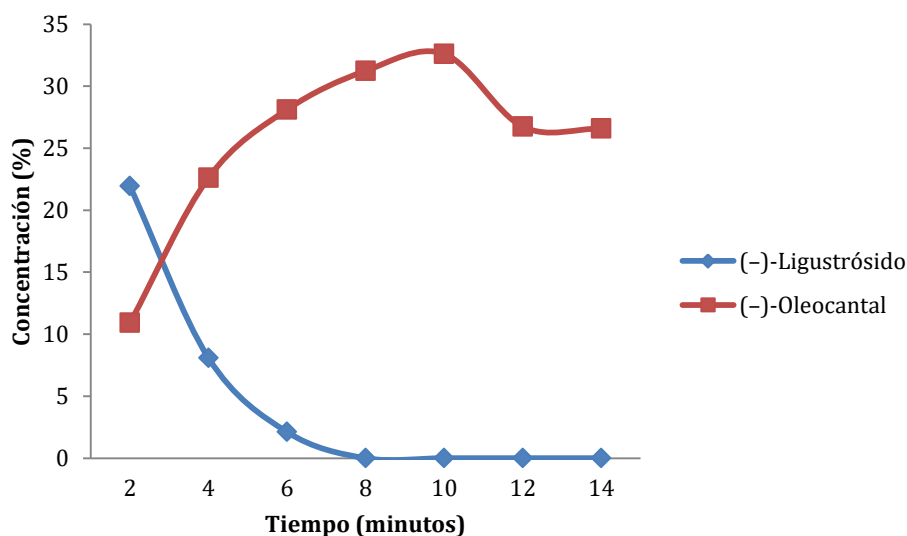


**Figura 7.2.** Variación con el tiempo del porcentaje de presencia de componentes en el crudo de reacción de la semisíntesis de (-)-oleocantal a partir de (-)-ligustrósido.

En cuanto a la semisíntesis de (-)-oleocantal a partir de (-)-ligustrósido, se observa que la máxima concentración de OLCT en el medio ocurre a los 10 minutos de reacción, como sucedía en la síntesis de OLCN. En este caso, la concentración del intermedio de reacción, el aglicón de ligustrósido, es pequeña y su valor no se puede determinar al encontrarse su señal por debajo del límite de cuantificación. Tanto en la semisíntesis de OLCN como de OLCT se observa una conversión total del producto de partida.

La caracterización estructural de los compuestos puros se realizó por RMN, EM y polarimetría, comprobando que los datos de ambas moléculas sintéticas eran idénticos a los de las naturales aisladas a partir de aceite de oliva (Apartado 7.3.1).

## **7.2 Síntesis de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal a mayor escala**

Una vez optimizadas las síntesis de OLCN y OLCT a partir de sus respectivos precursores naturales (OL y LIG) por reacción de Krapcho en condiciones propias de la “química verde”, nos planteamos subir de escala tales procedimientos. Como se ha dicho anteriormente, fueron los compuestos OLCN y OLCT los seleccionados por el proyecto AGL2017-89342-P, como más interesantes para ser evaluados en un modelo de inflamación *in vivo* de LES, lo que significa que sería necesario disponer de unos 2 gramos de cada uno de ellos para preparar la comida “aditivada” con la que alimentar durante 6 meses a la correspondiente línea de 10 ratones. Teniendo en cuenta que la optimización de las síntesis de OLCN y OLCT se ha hecho utilizando 100 mg de producto de partida, y que en tales ensayos se obtenían en torno a 30 mg de producto final, se estima que habría que repetir unas 60-70 veces el protocolo sintético, y posterior purificación, para conseguir las cantidades de OLCN y OLCT necesarias.

Por tal motivo se hicieron pruebas de cambio de escala incrementando de 100 en 100 mg las cantidades de secoiridoide de partida hasta comprobar que los mejores resultados de la optimización previa dejaban de observarse o/y el hecho de que utilizar una mayor cantidad de producto de partida pudiera suponer un riesgo que obligara a volver a procesar más madera de olivo para aislar nuevas cantidades de productos de partida. Por prudencia, se decidió dar por optimizado el cambio de escala llevando a cabo las semisíntesis a partir de 400-500 mg de secoiridoide, si bien aún queda margen para continuar subiendo la masa del material de partida, dado que el reactor de microondas disponible en el laboratorio puede hacer uso de viales de reacción de hasta 80 mL de capacidad. Con estas nuevas cantidades de producto de partida se vio afectado ligeramente el tiempo de reacción óptimo, que pasó de 10 a 13 minutos, tanto si se partía de OL como de LIG.

Los crudos de reacción de OLCN y de OLCT se fueron purificando por FCPC, empleando la mezcla de disolventes de Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:1:1:1 (en volumen), lo que permitió obtener OLCN y OLCT con rendimientos de reacción del 58% y 63%, respectivamente.

### 7.3 Síntesis de derivados metilados de oleuropeína y ligustrósido

Otro de los objetivos planteados en el proyecto AGL2017-89342-P fue obtener derivados *O*-metilados de los secoiridoides (–)-oleuropeína y (–)-ligustrósido, así como de los dialdehídos fenólicos (–)-oleaceína y (–)-oleocantal (**Figura 7.3**), con la finalidad de mejorar su estabilidad química y biodisponibilidad y determinar si son capaces de modular mejor la respuesta inmunoinflamatoria que los correspondientes productos naturales. Esta hipótesis está basada en el hecho de que se ha descrito en flavonoides que la *O*-metilación supone un incremento notable de su estabilidad metabólica, facilitándose el transporte a través de la membrana celular,<sup>536,537</sup> y que aumenta la hidrofobicidad y la actividad biológica sin alterar los índices terapéuticos,<sup>538</sup> además de reducir la respuesta inflamatoria.<sup>539</sup>

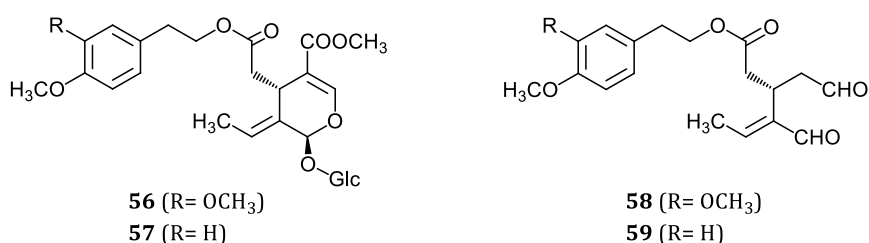
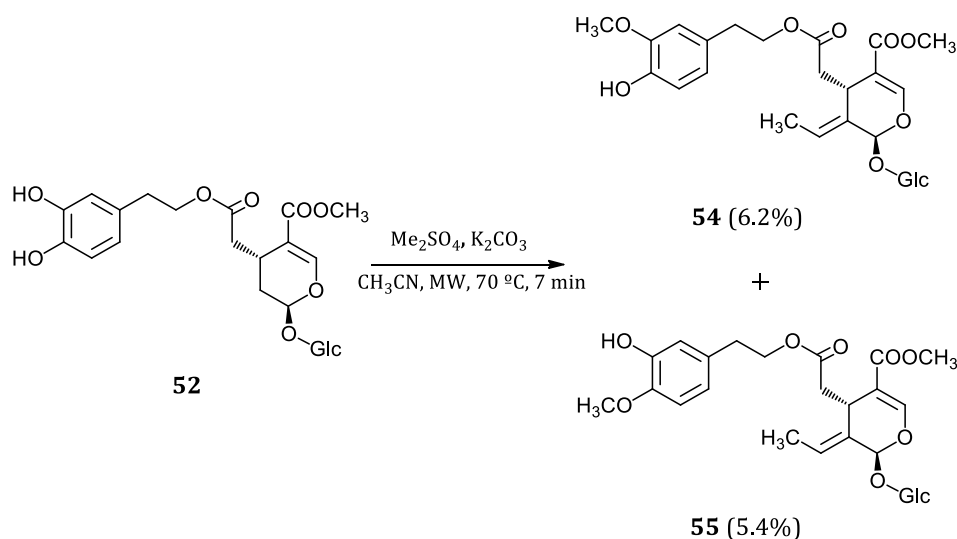


**Figura 7.3.** Estructura de (–)-dimetil-oleuropeína (**56**), metil-ligustrósido (**57**), dimetil-oleaceína (**58**) y metil-oleocantal (**59**).

Para obtener los derivados *O*-metilados de OL y LIG se probó en primer lugar (método 2.a) la reacción de OL con sulfato de dimetilo en medio básico en un reactor de microondas a 70 °C (**Esquema 7.4**). Al hacerlo se obtuvo una mezcla de dos isómeros de posición monometilados, con muy bajos rendimientos, sin que pudieran mejorarse incrementando la cantidad de agente metilante o de tiempo de reacción, por ejemplo. En el caso del ligustrósido, esta reacción de metilación no se producía.

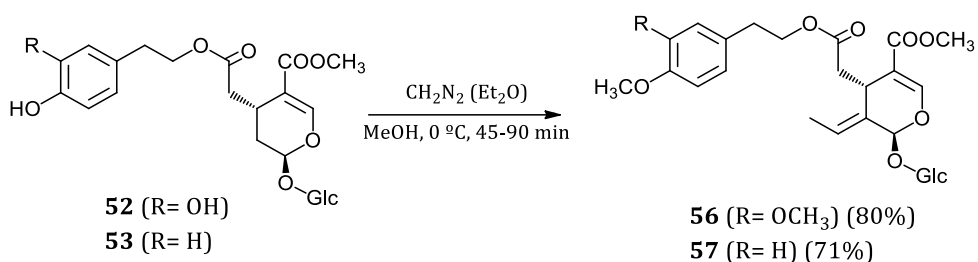




**Esquema 7.4.** Metilación de oleuropeína (**52**) con sulfato de dimetilo en un reactor microondas (Método 2.a).

Ambos derivados monometilados poseían valores de  $R_f$  en CCF y de  $t_R$  en HPLC bastante próximos, por lo que su separación se presentaba complicada *a priori*. No obstante, combinando un primer fraccionamiento del crudo de reacción por cromatografía en columna de gel de sílice, usando mezclas de DCM:EtOH como fase móvil, y la técnica de HPLC semipreparativa, empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo y agua, se llegaron a obtener ambos compuestos con la máxima pureza. La caracterización estructural de ambas moléculas se realizó por RMN. Sus espectros eran similares a los de OL (apartado 7.3.2), con la excepción de que ahora se observaba un singlete a 3.84 ppm para el compuesto **54**, o a 3.85 ppm para el compuesto **55**. A partir de las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales fue posible determinar la posición del grupo metoxilo en cada caso. Estos datos espectroscópicos, junto con los valores de rotación específica ( $[\alpha]_D^{25} -74.1^\circ$  y  $-49.4^\circ$ ), han permitido proponer para los compuestos **54** y **55** las estructuras de (-)-5'-O-metil-oleuropeína y (-)-6'-O-metil-oleuropeína, respectivamente, lo cual se confirmó por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>19,540</sup>

Comprobando que no parecía inmediata la búsqueda de mejores condiciones experimentales para conseguir la metilación completa de OL y de LIG con  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ , decidimos probar la metilación de ambos compuestos con una disolución de diazometano en éter dietílico (Método 2.b) (**Esquema 7.5**).



**Esquema 7.5.** Metilación de (-)-oleuropeína (**52**) y (-)-ligustrósido (**53**) con diazometano (Método 2.b).

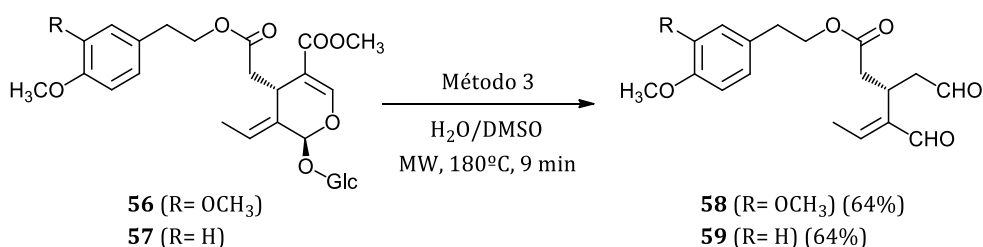
La dimetilación de OL ya había sido descrito por Samara *et al.*,<sup>541</sup> quienes generaban diazometano *in situ* a partir de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald®). En nuestro caso, decidimos generar el agente metilante a partir de otro precursor (*N*-metil-*N*-nitrosourea), sobre el que se habían descrito ventajas de seguridad y mejores conversiones en diazometano que con Diazald®.<sup>542</sup>

De esta forma se obtuvieron los compuestos **56** y **57** con buenos rendimientos (80% y 71%, respectivamente). La purificación de los crudos de reacción se llevó a cabo por FCPC, lo cual permitió obtener ambas moléculas con pureza (90%, por HPLC) suficiente para ser usadas como productos de partida en la siguiente etapa (Apartado 7.4). Sin embargo, para ser evaluadas en los ensayos farmacológicos y para elucidar sus estructuras fue necesario una re-purificación por HPLC semipreparativo hasta obtenerlas con una pureza superior ( $\geq 95\%$ ). La caracterización estructural de estas moléculas se realizó por RMN, EM y polarimetría. Los espectros de los compuestos **56** y **57** eran similares a los de sus precursores **52** y **53**, respectivamente, salvo las señales observadas correspondientes a los nuevos *O*-metilos. Estos datos espectroscópicos, junto con los valores de rotación específica ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $-152,7^\circ$  y  $-154,0^\circ$ ), han permitido proponer para los compuestos **56** y **57** las estructuras de

(-)-5',6'-*O*-dimetil-oleuropeína y (-)-6'-*O*-metil-ligustrósido, respectivamente, lo cual se confirma por comparación con los datos descritos en bibliografía.<sup>541</sup>

#### 7.4 Síntesis de derivados metilados de oleaceína y oleocantal

La síntesis de los derivados *O*-metilados de OLCN y OLCT se podría haber intentado, en principio, por vía directa, haciendo reaccionar OLCN u OLCT con diazometano, pero muy posiblemente se observaría, aparte de la metilación de los grupos fenólicos, la reacción de los grupos aldehído de ambos productos de partida con el agente metilante. Teniendo en cuenta la dificultad de obtener OLCN y OLCT y su alta reactividad, nos pareció menos arriesgado y menos costoso en términos de tiempo acometer su metilación por vía indirecta, es decir, sometiendo los derivados metilados de OL y LIG a la reacción de Krapcho. En principio no hay motivos para pensar que la descarboxilación de Krapcho sobre oleuropeína dimetilada fuera a transcurrir de forma muy diferente a como transcurrió a partir de oleuropeína, y por ese motivo se llevó a cabo la reacción de Krapcho sobre dimetil-oleuropeína (Dimet-OL) y sobre metil-ligustrósido (Met-LIG), siguiendo las condiciones de reacción optimizadas (Apartado 7.2) para la síntesis de OLCN y OLCT a partir de OL y LIG, respectivamente. En el **Esquema 7.6** se muestra la conversión de **56** y **57** en dimetil-oleaceína (Dimet-OLCN, **58**) y en metil-oleocantal (Met-OLCT, **59**), respectivamente (método 3). Tanto Dimet-OL (**56**) como Met-LIG (**57**) se obtuvieron como se ha descrito en el apartado 7.3.



**Esquema 7.6.** Síntesis de (-)-dimetil-oleaceína (**58**) y (-)-metil-oleocantal (**59**) a partir de (-)-dimetil-oleuropeína (**56**) y (-)-metil-ligustrósido (**57**) por reacción de Krapcho (Método 3).

La menor polaridad de los productos de partida utilizados ahora (Dimet-OL y Met-LIG), respecto de OL y LIG, hizo necesaria la adición de una pequeña cantidad de DMSO para facilitar su disolución en el medio de reacción de la descarboxilación de Krapcho. El tiempo de reacción necesario para la conversión total de los productos de partida fue de 9 minutos. Finalizada la reacción se purificaron los crudos de reacción por FCPC, obteniéndose los compuestos **58** (dimetil-OLCN) y **59** (metil-OLCT) con buenos rendimientos (64% en ambos casos).

La determinación estructural de los compuestos puros se llevó a cabo por RMN, EM, EM de alta resolución y polarimetría. Los espectros eran similares a los de sus análogos naturales (OLCN y OLCT), con la excepción de que en este caso se observaban las señales correspondientes a los grupos metilo. Estos datos espectroscópicos, junto con los valores de rotación específica ( $[\alpha]_D^{25}$   $-1.7^\circ$  y  $-1.5^\circ$ ), han permitido proponer para los compuestos **58** y **59** las estructuras de (-)-3'',4''-O-dimetil-oleaceína y (-)-4''-O-metil-oleocantal. Ambos compuestos se han sintetizado por primera vez durante esta Tesis.

## 7.5 Síntesis de (-)-dimetil-oleaceína y (-)-metil-oleocantal a mayor escala

Como se ha comentado en el apartado 7.2, los compuestos OLCN y OLCT fueron seleccionados por el proyecto AGL2017-89342-P para ser evaluados en un modelo de inflamación *in vivo* de LES. Estudios preliminares sobre dimet-OLCN y met-OLCN también aconsejaron incluir estos compuestos en el estudio *in vivo*, para comprobar a este nivel si la O-metilación podría mejorar la actividad biológica de ambas moléculas. Por ello, también fue necesario obtener los compuestos (-)-dimetil-oleaceína (**58**) y (-)-metil-oleocantal (**59**) a escala de multigramo. Como ocurría en el caso anterior, habría que repetir un gran número de veces el protocolo sintético optimizado para conseguir las cantidades necesarias.

Por ello fue necesario incrementar la escala hasta los 750 mg del secoiridoide metilado de partida, viéndose incrementado el tiempo de reacción de 9 a 12 minutos, tanto si se partía de dimet-OL como de met-LIG.

Los crudos de reacción de dimet-OLCN y de met-OLCT se fueron purificando por FCPC, empleando la mezcla de disolventes de Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:1:1:1 (en volumen), lo que permitió obtener dimet-OLCN (**58**) y met-OLCT (**59**) con rendimientos de reacción (58% y 63%, respectivamente) similares a los observados para la síntesis de OLCN y OLCT.



## 8. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE OLEOCANTAL

Una vez obtenidos los compuestos naturales y metilados necesarios para alcanzar los objetivos del proyecto AGL2017-89342-P, nos planteamos abordar la obtención de un compuesto semejante estructuralmente al OLCT (y a la OLCN), pero de estructura más sencilla, de modo que pudiera diseñarse su preparación por síntesis total a partir de moléculas comerciales simples y económicas.

De entre todas las opciones posibles de simplificación de la estructura de OLCT/OLCN, decidimos que el compuesto **60** podría ser la opción más sencilla para iniciar este nuevo capítulo de síntesis de análogos estructurales de OLCT/OLCN (*Figura 8.1*).

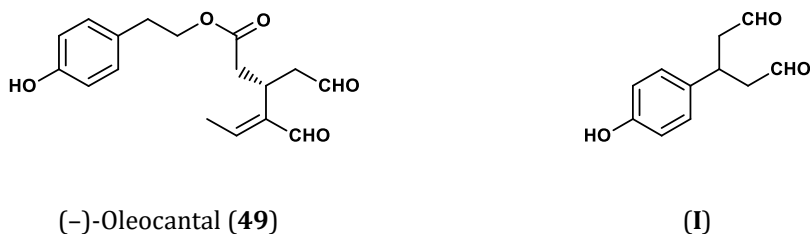
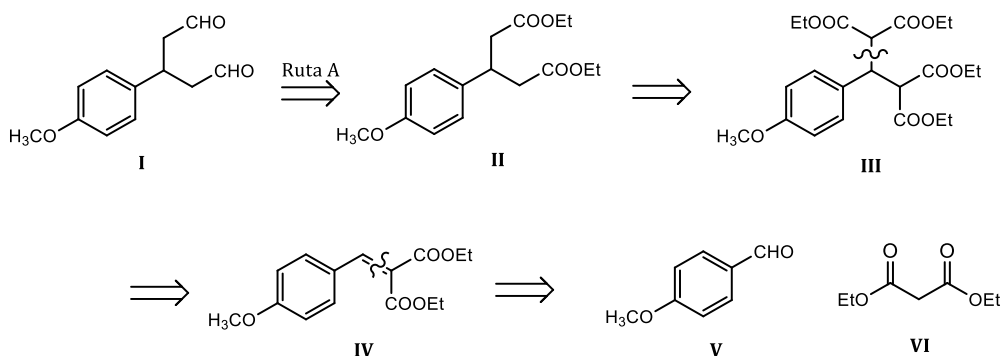


**Figura 8.1.** Estructura del (-)-oleocantal (**49**) y su análogo estructural (**I**).

### 8.1 Planteamiento sintético

La molécula objetivo **I** podría analizarse retrosintéticamente con se indica en el *Esquema 8.1*.



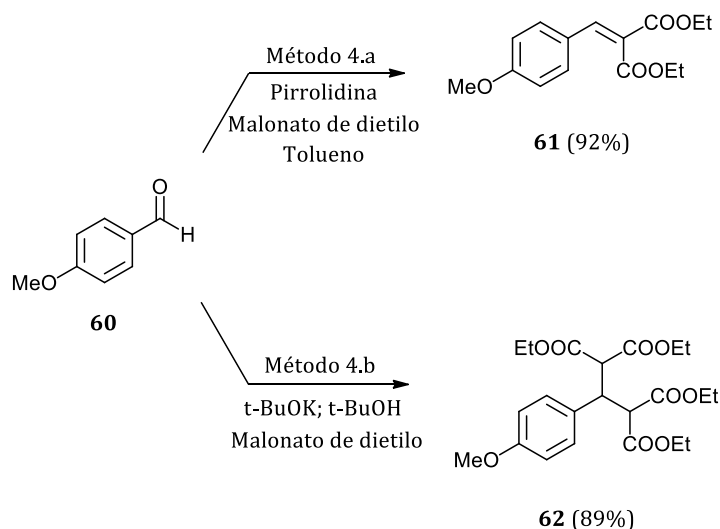
**Esquema 8.1.** Análisis retrosintético del análogo estructural I.

La molécula objetivo **I** posee dos grupos aldehído en disposición relativa 1,5. Uno de los análisis que menos riesgo implicaría sería la transformación de **I**, mediante interconversión de grupo funcional (IGF), en **II**, para proceder a continuación a una doble adición de grupo funcional (AGF) que transformara el diéster **II** en el tetraéster **III**. Éste podría desconectarse por el enlace que se indica en el esquema para transformarse en **IV**, que sería el resultado de una simple reacción de Knoevenagel entre el 4-metoxibenzaldehído **V** y el malonato de dietilo (**VI**).

## 8.2 Adición de malonato de dietilo a 4-metoxibenzaldehído

Para minimizar las posibles reacciones laterales como consecuencia de la presencia del OH fenólico libre en la molécula objetivo **I**, decidimos comenzar las primeras pruebas de síntesis partiendo del 4-metoxibenzaldehído (**60**), donde el OH en posición 4 está protegido en forma de éter metílico (**Esquema 8.2**). En sentido sintético, la reacción de **60** con malonato de dietilo conduciría al producto de condensación de Knoevenagel **61**, el cual podría adicionar conjugadamente una segunda molécula de malonato de dietilo para rendir el tetraéster **62**. Para ello se ensayaron dos métodos (método 4.a y 4.b) previamente descritos en bibliografía para estos sustratos (**Esquema 8.2**).<sup>543,544</sup>



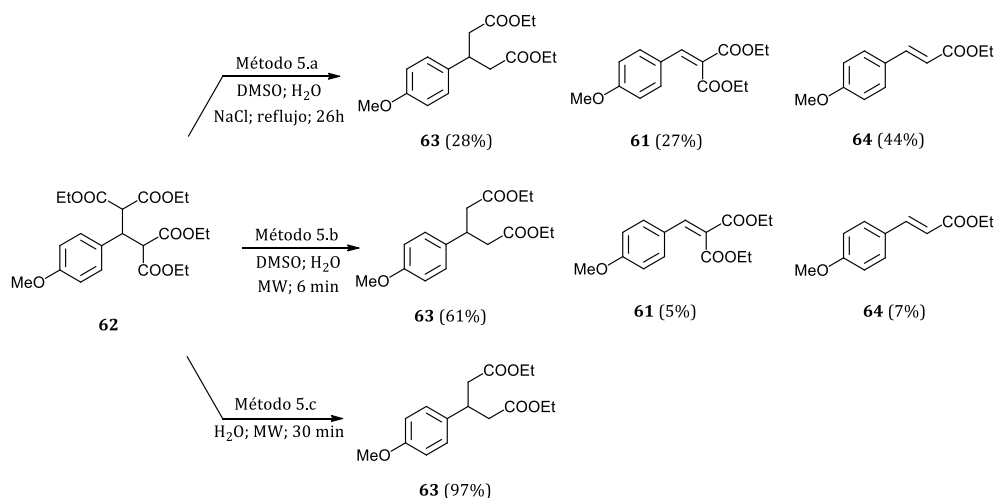


**Esquema 8.2.** Métodos sintéticos de **61** y **62**.

La diferencia entre ambos métodos reside en la base empleada para abstraer el protón  $\alpha$  del malonato de dietilo, y del disolvente. Con el método 4.a se empleó pirrolidina y tolueno, y con el método 4.b, *terc*-butóxido de potasio (*t*-BuOK) y *terc*-butanol (*t*-BuOH), pero sólo con el método 4.b fue posible obtener el producto esperado con un buen rendimiento (89%). La caracterización estructural de ambos compuestos se llevó a cabo por RMN, coincidiendo sus datos espectroscópicos con los descritos en bibliografía.<sup>544</sup>

### 8.3 Descarboxilación de Krapcho del tetraéster 62

Teniendo en cuenta la eficacia de la reacción de Krapcho en las síntesis de OLCN y OLCT (apartado 7.1), y de sus derivados metilados, decidimos probar la doble descarboxilación del tetraéster **62** por esta vía a través de los tres métodos (método 5.a–5.c) mostrados en el **Esquema 8.3**.



**Esquema 8.3.** Métodos de descarboxilación ensayados para la obtención de **63**.

En primer lugar (método 5.a) se llevó a cabo la reacción a reflujo empleando como disolvente una mezcla de DMSO/H<sub>2</sub>O en presencia de NaCl. Con este método, tras 26 horas de reacción, se obtuvieron los mejores resultados, aunque sólo fue posible obtener un 28% (por GC) del producto deseado (**63**), obteniéndose además los productos no deseados **61** (27% por GC) y **64** (44% por GC). También se observó la formación del triéster como producto intermedio de la reacción (**65**) (*Tabla 8.1*).

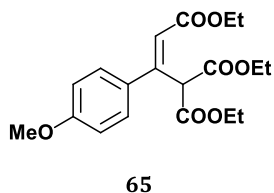


**Tabla 8.1.** Seguimiento de la reacción de Krapcho del compuesto **62** por el método 5.a.

| <b>Tiempo</b> | <b>64</b> | <b>63</b> | <b>61</b> | <b>65</b> | <b>62</b> |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 30'           | 11%       | 0.5%      | 35%       | 10%       | 13%       |
| 1 h           | 16%       | 1%        | 34%       | 19%       | 11%       |
| 1 h 30'       | 16%       | 2.4%      | 37%       | 19%       | 5%        |
| 2 h           | 17%       | 4.5%      | 45%       | 21%       | 6%        |
| 3 h           | 24%       | 7%        | 51%       | 15%       | 0%        |
| 4 h 30'       | 25%       | 11%       | 50%       | 10%       | 0%        |
| 5h 30'        | 26%       | 14%       | 46%       | 7%        | 0%        |
| 7 h           | 28%       | 18%       | 38%       | 5%        | 0%        |
| 24 h          | 40%       | 24%       | 33%       | 0%        | 0%        |
| 26 h          | 44%       | 28%       | 27%       | 0%        | 0%        |
| 28 h          | 52%       | 21%       | 22%       | 0%        | 0%        |

Este resultado subió hasta un 61% (por GC) en el producto deseado cuando la reacción se llevó a cabo en un reactor de microondas, con mezcla de DMSO/H<sub>2</sub>O, en ausencia de NaCl y tras 6 minutos de reacción (método 5.b). En este caso también se observó la formación de los productos no deseados **61** (5%) y **64** (7%), aunque en menor proporción. (**Tabla 8.2**).

**Tabla 8.2.** Seguimiento de la reacción de Krapcho del compuesto **62** por el método 5.b.

| <b>Tiempo</b> | <b>64</b> | <b>63</b> | <b>65</b> | <b>62</b> |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 2'            | 0%        | 25%       | 2%        | 59%       |
| 4'            | 5%        | 49%       | 4%        | 41%       |
| 6'            | 7%        | 61%       | 5%        | 7%        |
| 8'            | 19%       | 39%       | 0%        | 0%        |

Por último, los mejores resultados (97%, por GC) se obtuvieron con el método 5.c, idéntico al método 5.b, pero sin DMSO, empleando sólo agua como disolvente (*Tabla 8.3*).

**Tabla 8.3.** Seguimiento de la reacción de Krapcho del compuesto **62** por el método 5.c.

| Tiempo | <b>63</b> | <b>65</b> | <b>62</b> |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 5'     | 15%       | 8%        | 69%       |
| 10'    | 42%       | 7%        | 38%       |
| 20'    | 65%       | 7%        | 19%       |
| 30'    | 97%       | 1%        | 0%        |

Hay que indicar que no se observaba formación del compuesto **61** cuando la reacción se realizaba bajo irradiación con microondas (métodos 5.b y 5.c), y que se reducía el tiempo de reacción y aumentaba el rendimiento de reacción considerablemente, en comparación con la reacción a reflujo en condiciones convencionales (método 5.a). La caracterización estructural del compuesto **63** se llevó a cabo por RMN.

#### 8.4 Reducción del diéster **63**

Se ha intentado la conversión de los grupos éster del compuesto **63** hasta aldehído, empleando hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL) a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y siguiendo las condiciones descritas para la reducción de compuestos semejantes,<sup>545</sup> aunque no se obtuvieron los resultados esperados en nuestro caso. También se intentó la reducción de ambos grupos éster hasta alcohol con  $\text{LiAlH}_4$  a temperatura ambiente, con la finalidad de convertir el diol resultante en dialdehído con un agente oxidante adecuado. En este caso, con las condiciones ensayadas, se obtuvo el alcohol 4-metoxibencílico como producto mayoritario, observándose en el espectro de RMN del crudo de reacción sólo señales pequeñas asignables al diol objetivo.

Aun tratándose de un objetivo *a priori* sencillo, se deduce que será necesario seguir con la búsqueda de las condiciones de reacción óptimas que permitan obtener el análogo **I** con éxito, lo cual deberá llevarse a cabo más adelante, como continuación del trabajo iniciado en esta Tesis Doctoral.



## **9. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS**

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el de obtener compuestos bioactivos, tanto naturales como sintéticos, que pudieran presentar interés para la industria farmacológica o alimentaria, entre otras. Tal y como se recoge en el apartado de Antecedentes bibliográficos, dentro de las familias de flavonoides, proantocianidinas, triterpenos pentacíclicos y secoiridoides se han identificado numerosos compuestos activos. Por ello, el estudio que se ha realizado sobre composición química, mediante aislamiento y caracterización estructural, de determinadas fuentes vegetales se ha completado con los siguientes ensayos de actividad: (a) antioxidante; (b) inhibidora de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA); (c) antimicrobiana y antibiopelícula; (d) antitumoral; (e) antiangiogénica. Los ensayos de actividad antioxidante y de evaluación de la actividad inhibidora de la enzima LDHA se han llevado a cabo como parte del trabajo experimental desarrollado en esta Tesis y para el resto de actividades se ha contado con las colaboraciones que nuestro Grupo de Investigación tiene establecidas con otros grupos.

### **9.1 Actividad antioxidante de los extractos de cerezo, ciruelo europeo, ciruelo japonés, lichi y arándano rojo americano**

La búsqueda de antioxidantes naturales que permitan satisfacer la creciente demanda de este tipo de compuestos en campos como la salud o la industria alimentaria es una actividad de considerable interés científico y también empresarial. Los antioxidantes actúan protegiendo a otras sustancias frente a la oxidación, jugando un papel de reductores. Por su parte, los radicales libres son especies químicas fuertemente oxidantes y que se generan de forma natural durante el metabolismo, cuando las células del organismo transforman las moléculas presentes en los alimentos en energía. Si bien en condiciones normales estas especies radicalarias se mantienen en concentraciones adecuadas que les permiten desarrollar sus correspondientes funciones fisiológicas, en ocasiones se producen incrementos en los niveles de concentración como consecuencia de numerosos factores externos y esto supone un peligro para la salud del organismo.<sup>546-548</sup> En la industria alimentaria, los antioxidantes

se utilizan para impedir o retardar, en los alimentos y bebidas, las oxidaciones catalíticas y procesos que llevan a enranciamientos naturales.<sup>549</sup>

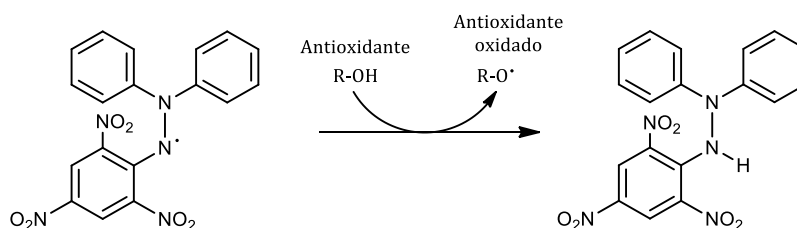
En cuanto a los métodos descritos en bibliografía para determinar la actividad antioxidante, tanto de compuestos puros como de extractos, se dispone de un amplio número de ellos,<sup>550</sup> que pueden clasificarse en dos grupos:

- a) Métodos empleados para evaluar la capacidad de un antioxidante para inhibir la formación de productos de oxidación, primarios o secundarios, entre los que se encuentran el Rancimat o el valor de peróxidos, entre otros.
- b) Métodos empleados para evaluar la capacidad de un antioxidante para retirar del medio agentes desencadenantes del proceso de reacción, ya sean radicalarios o no. Dentro de este grupo se encuentran los métodos que evalúan la capacidad de captura de radicales libres de sistemas modelo, no presentes en los organismos vivos, como es el caso del radical DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y el radical ABTS (sal diamónica del ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sufónico).

En esta Tesis Doctoral se ha empleado el método de determinación de la capacidad de captura del radical DPPH para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos y compuestos puros. Este ensayo se ha utilizado ampliamente por la comunidad científica debido a su rapidez, simplicidad y eficacia, lo que permite llevar a cabo estudios comparativos con otras muestras. El radical DPPH absorbe a la longitud de onda de 515 nm en su forma oxidada, pero cuando reacciona con un compuesto antioxidante, este radical capta un hidrógeno, se reduce y la forma reducida no absorbe a 515 nm (**Esquema 9.1**). Esta disminución en el valor de la absorbancia, marcada por un cambio en el estado de oxidación, es posible determinarla espectrofotométricamente, lo que nos permite una determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante de la muestra (ensayo *offline*).<sup>551</sup> Además de este modo de determinación *offline* (Apartado 9.1.1) nuestro Grupo de Investigación dispone de un



sistema de detección cualitativa *online* (apartado 9.1.2), que permite identificar qué componentes de una mezcla son los responsables de la actividad del conjunto.<sup>19</sup>



**Esquema 9.1.** Reducción del radical DPPH con un antioxidante.

### **9.1.1 Actividad antioxidante offline**

En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de acetato de etilo obtenidos a partir de las muestras de madera de las diferentes variedades de cerezo, ciruelo japonés, ciruelo europeo y lichi, así como, del extracto de acetato de etilo obtenido a partir de un extracto hidroalcohólico comercial de arándano rojo americano. Para cada extracto se prepararon seis concentraciones diferentes, en un rango de concentración de 100.0–0.5 µg/mL y cada una de estas concentraciones se mezclaron en una cubeta con una disolución metanólica de radical DPPH ( $7.09 \times 10^{-5}$  M). Las cubetas se mantuvieron en oscuridad, durante 15 minutos, y después se determinaron los valores de absorbancia a 515 nm y a partir de ellos la concentración de radical DPPH en cubeta. Así el porcentaje de radical DPPH remanente se calculó mediante la siguiente formula:

$$\%DPPH_{rem} = \frac{[DPPH]}{[DPPH]_0} \times 100$$

donde  $[DPPH]_0$  es la concentración inicial de la disolución metanólica de radical DPPH y  $[DPPH]$  es la concentración después de 15 minutos para cada concentración de extracto. Los valores de los porcentajes remanentes de DPPH se representaron en

función de las diferentes concentraciones del extracto y el valor de  $EC_{50}$  (concentración eficiente al 50%) se determinó gráficamente. De modo que la actividad antioxidante se expresa como la concentración de extracto necesaria para que la concentración inicial de radical DPPH se reduzca a la mitad.

A continuación, en las siguientes tablas se recogen los valores de  $EC_{50}$  para los diferentes extractos analizados, en orden de mayor a menor actividad antioxidante y para el extracto de romero comercial, utilizado como referencia. En la **Tabla 9.1**, los extractos de las diferentes variedades de cerezo, en la **Tabla 9.2**, los extractos de las diferentes variedades de ciruelo europeo, en la **Tabla 9.3**, los extractos de las diferentes variedades de ciruelo japonés y en la **Tabla 9.4**, los extractos de las dos variedades de lichi y el de arándano rojo americano.

**Tabla 9.1.** Valores de actividad antioxidante de los extractos de acetato de etilo de madera de cerezo de diferentes variedades y extracto de romero comercial (referencia).

| Variedad                     | Referencia del extracto | $EC_{50}^a$     |
|------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Burlat                       | Pa-M-3a(B)              | $40.3 \pm 0.5$  |
| Starking                     | Pa-M-4a(St)             | $44.6 \pm 3.5$  |
| Lapins                       | Pa-M-7a(L)              | $53.5 \pm 0.5$  |
| Garrafal Napoleón            | Pa-M-1a(G)              | $62.5 \pm 2.9$  |
| Summit (Torres)              | Pa-M-5a(Sm)             | $62.6 \pm 5.8$  |
| Monzón                       | Pa-M-6a(M)              | $81.5 \pm 6.9$  |
| Picota                       | Pa-M-2a(P)              | $125.4 \pm 8.4$ |
| Summit (Alcalá la Real)      | Pa-SSu-5a(Sm)           | $175.5 \pm 7.1$ |
| Extracto de romero comercial | -                       | $27.6 \pm 0.1$  |

<sup>a</sup>Concentración eficiente expresada en  $\mu\text{g/mL} \pm$  desviación estándar (SD).

El extracto de AcOEt de la variedad 'Burlat' es el de mayor actividad, seguido por el de 'Starking'. Si se comparan los datos para las muestras de la variedad 'Summit' recogidas en distinta localización se observa una diferencia significativa, siendo la de mayor actividad la recogida en Torres. Todos los extractos de acetato de etilo de cerezo han presentado una actividad antioxidante inferior a la del extracto de romero comercial ( $27.6 \mu\text{g/mL}$ ).

**Tabla 9.2.** Valores de actividad antioxidante de los extractos de acetato de etilo de madera de ciruelo europeo de diferentes variedades y extracto de romero comercial (referencia).

| <b>Variedad</b>                  | <b>Referencia del extracto</b> | <b>EC<sub>50</sub><sup>c</sup></b> |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| De la Rosa <sup>b</sup>          | Pd-CC-4a                       | 28.9 ± 0.9                         |
| Reina Claudia Verde <sup>c</sup> | Pd-CC-5a(RCV)                  | 32.6 ± 2.6                         |
| Claudia de Tolosa <sup>c</sup>   | Pd-CC-6a(CT)                   | 37.0 ± 1.3                         |
| Reina Claudia Verde <sup>b</sup> | Pd-CC-1a(RCV)                  | 37.0 ± 1.6                         |
| Standley <sup>b</sup>            | Pd-CC-3a                       | 40.4 ± 3.8                         |
| Claudia de Tolosa <sup>b</sup>   | Pd-CC-2a(CT)                   | 52.6 ± 2.3                         |
| Extracto de romero comercial     | -                              | 27.6 ± 0.1                         |

<sup>a</sup>Concentración eficiente expresada en µg/mL ± desviación estándar (SD). <sup>b</sup>Parcela 1;

<sup>c</sup>Parcela 2.

En cuanto a los extractos de ciruelo europeo, el más activo correspondió con el de la variedad 'De la Rosa' seguido por el de 'Reina Claudia Verde' recogido en la parcela 2. Por otro lado, se observó que las dos muestras recogidas en la parcela 2 presentaron una actividad antioxidante superior que los extractos de las mismas variedades obtenidos de restos de poda de árboles de la parcela 1. En este caso, el extracto de la variedad 'De la Rosa' (28.9 µg/mL) mostró un valor de actividad antioxidante similar al observado para el extracto de romero comercial (27.6 µg/mL). El resto de extractos presentaron una actividad antioxidante ligeramente superior a la observada para este extracto comercial de referencia.

**Tabla 9.3.** Valores de actividad antioxidante de los extractos de acetato de etilo de madera de ciruelo japonés de diferentes variedades y extracto de romero comercial (referencia).

| Variedad                     | Referencia del extracto | EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Fortune                      | Ps-SE-4a(Fo)            | 34.9 ± 1.3                    |
| Showtime                     | Ps-SE-7a(Sh)            | 35.3 ± 0.7                    |
| Angelino (Córdoba)           | Ps-CO-1a(An)            | 42.0 ± 0.6                    |
| Songold                      | Ps-SE-1a(Sg)            | 45.3 ± 2.3                    |
| Angelino (Sevilla)           | Ps-SE-2a(An)            | 47.8 ± 3.6                    |
| Souvenir                     | Ps-SE-6a(So)            | 49.9 ± 1.8                    |
| Red Beaut                    | Ps-SE-5a(Rb)            | 51.2 ± 1.6                    |
| Angelino ecológico (Sevilla) | Ps-SE-3a(An)            | 52.1 ± 1.2                    |
| Extracto de romero comercial | -                       | 27.6 ± 0.1                    |

<sup>a</sup>Concentración eficiente expresada en µg/mL ± desviación estándar (SD).

En este caso las muestras de mayor actividad correspondieron con los extractos de la variedad 'Fortune' y 'Showtime', ambas con una actividad muy próxima entre sí. Comparando las tres muestras de la variedad 'Angelino' se puede apreciar que los extractos procedente de cultivo convencional presentan una mayor actividad, y próxima entre sí, que el del frutal cultivado de forma ecológica. Por último, todos los extractos de ciruelo japonés analizados presentaron una actividad antioxidantes ligeramente superior al extracto de romero comercial (27.6 µg/mL).

**Tabla 9.4.** Valores de actividad antioxidante de los extractos de acetato de etilo de madera de lichi de las diferentes variedades estudiadas, arándano rojo americano y extracto de romero comercial (referencia).

| Variedad                     | Referencia del extracto | EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Bengal                       | Lc-Ma-1a(Be)            | 7.4 ± 0.8                     |
| Mauritius                    | Lc-Ma-2a(Ma)            | 6.0 ± 0.2                     |
| Arándano rojo americano      | -                       | 4.8 ± 1.0                     |
| Extracto de romero comercial | -                       | 27.6 ± 0.1                    |

<sup>a</sup>Concentración eficiente expresada en µg/mL ± desviación estándar (SD).

El extracto de acetato de etilo de la muestra de la variedad 'Mauritius' presenta mayor actividad antioxidante que el de la variedad 'Bengal'. Ambos presentan valores de actividad antioxidante muy superiores a los observados para las muestras de cerezo, ciruelo japonés y ciruelo europeo. En cuanto al extracto de AcOEt obtenido a partir del extracto comercial de arándano rojo (Apartado 4.5.1) presentó el mayor valor de actividad antioxidante ( $4.77 \pm 1.0$ ), siendo este junto con el de ambas variedades de lichi, muy superior al resto de muestras analizadas, incluido el extracto de romero comercial ( $27.6 \mu\text{g/mL}$ ).

A continuación, en la **Figura 9.1** se recogen los valores de  $\text{EC}_{50}$  de los extractos de acetato de etilo de madera de las variedades más antioxidante de cada planta y del extracto de romero comercial, utilizado como referencia.

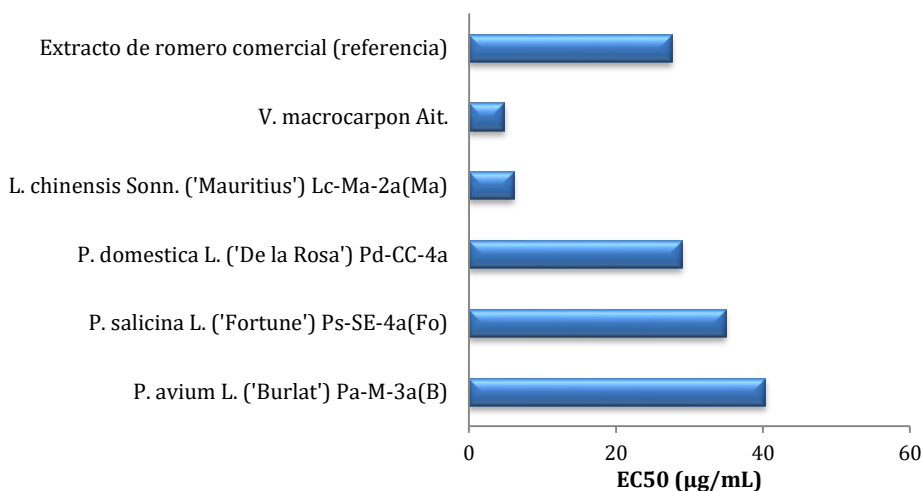


**Figura 9.1.** Valor de  $\text{EC}_{50}$  máximo observado para cada planta estudiada.

Como se observa en el gráfico, el extracto de acetato de etilo obtenido a partir de un extracto hidroalcohólico comercial de arándano rojo americano presentó el mayor valor de actividad antioxidante, seguido muy de cerca por el extracto obtenido de la madera de lichi de la variedad 'Mauritius', y ambos superiores al extracto de

romero comercial. Estos valores son del orden de los observados para extractos obtenidos a partir de plantas aromáticas con un destacado potencial antioxidante como romero (*Rosmarinus officinalis* L.)<sup>552,553</sup>, salvia (*Salvia officinalis* L.)<sup>554,555</sup>, tomillo (*Thymus mastichina* L.)<sup>556</sup> o menta (*Mentha cervina* L.)<sup>556</sup>. En el grupo de Investigación en el que se desarrolla esta Tesis también se han analizado extractos con elevada actividad antioxidante como la mora silvestre o zarzamora (*Rubus urticifolius* Poir.)<sup>557</sup>. Por el contrario, los extractos de *Prunus* fueron los menos antioxidantes.

### 9.1.2 Estudio mediante la técnica online HPLC-DAD-DPPH.

Con el fin de identificar aquellos compuestos que aportaban la actividad antioxidante al extracto de una forma rápida y eficaz, se analizaron, mediante la técnica combinada HPLC-DAD-DPPH, los extractos de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Starking', ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa', ciruelo japonés, variedad 'Showtime', lichi, variedad 'Mauritius', así como la fracción D<sub>2</sub>(IV) enriquecida en procianidinas diméricas tipo A y que fue obtenida a partir del extracto de acetato de etilo de arándano (Apartado 4.5.2). Esta técnica permite detectar de manera cualitativa que compuestos constituyentes de una mezcla compleja presentan actividad antioxidante. Para ello se empleó un equipo HPLC-DAD (Instrument A; véase apartado 10.2.4 en *Materials and Methods*) al que se le ha añadido una válvula de conmutación a la salida de la columna y antes de la entrada al detector. Esta permite dirigir los eluatos hacia el DAD, en una primera inyección de la muestra, o hacia el *coil* de reacción, en una segunda inyección. En este tubo de reacción, los eluatos se mezclan con una disolución del radical DPPH (Véase **Figura 16.1** en apartado 16.1.2 en *Materials and Methods*) y reaccionan aquellos que presenten carácter oxidante, reduciendo el radical a la forma que no absorbe a 515 nm (Véase **Esquema 9.1** en apartado 9.1). A la salida del detector, se registra un cromatograma con señales de disminución de la absorbancia a 515 nm, para los compuestos activos. Este "cromatograma invertido" puede superponerse con el "cromatograma HPLC normal" del extracto y esto permite identificar los picos que presentan actividad antioxidante.

Como ya se ha indicado en apartados anteriores, la mayoría de los compuestos aislados e identificados en las diferentes maderas estudiadas pertenecen al grupo de los flavonoides y proantocianidinas. En este tipo de compuestos todo apunta a que su mayor o menor actividad antioxidante está estrechamente relacionada con el número de grupos hidroxilo que presenten en su estructura, principalmente en el anillo B, aunque también en el anillo A.<sup>558</sup>

En el cromatograma del extracto de AcOEt del cerezo, variedad 'Starking', (**Figura 9.2**) obtenido tras el ensayo de actividad antioxidante *online* se observaron dos picos (perfil superior) correspondientes al compuesto DPPH reducido coincidiendo con el tiempo de retención del compuesto **1** y **4**, e indicando la actividad antioxidante de ambos. Estos compuestos fueron aislados y caracterizados estructuralmente como (-)-catequina (**1**) y (-)-taxifolina (**4**), por lo que, su actividad antioxidante estaría justificada por la unidad de catecol en el anillo B.<sup>558</sup>

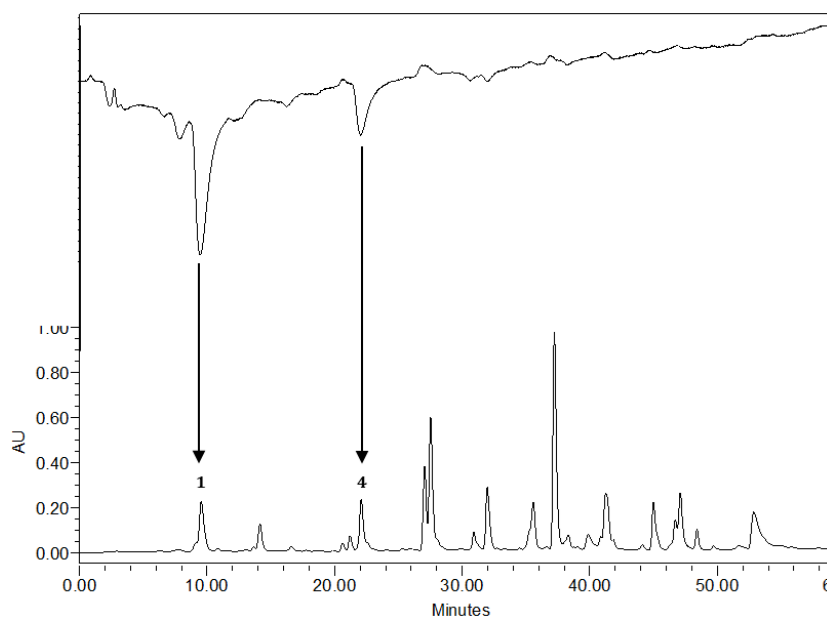


**Figura 9.2.** Cromatograma *online* de la capacidad atrapadora del radical DPPH de la variedad "Starking" (Superior  $\lambda = 515$  nm, inferior  $\lambda = 280$  nm).

En el análisis *online* del extracto de ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa' (**Figura 9.3**), se observan varias señales correspondientes al DPPH reducido (perfil superior). Dos de ellas coinciden con tiempos de retención de 13.8 min y 21.4 min correspondientes a los flavan-3-oles (+)catequina (**18**) y (-)-taxifolina (**19**), respectivamente. También se observan otros picos que indican el carácter antioxidante de las proantocianidinas **21-24**.<sup>559</sup>

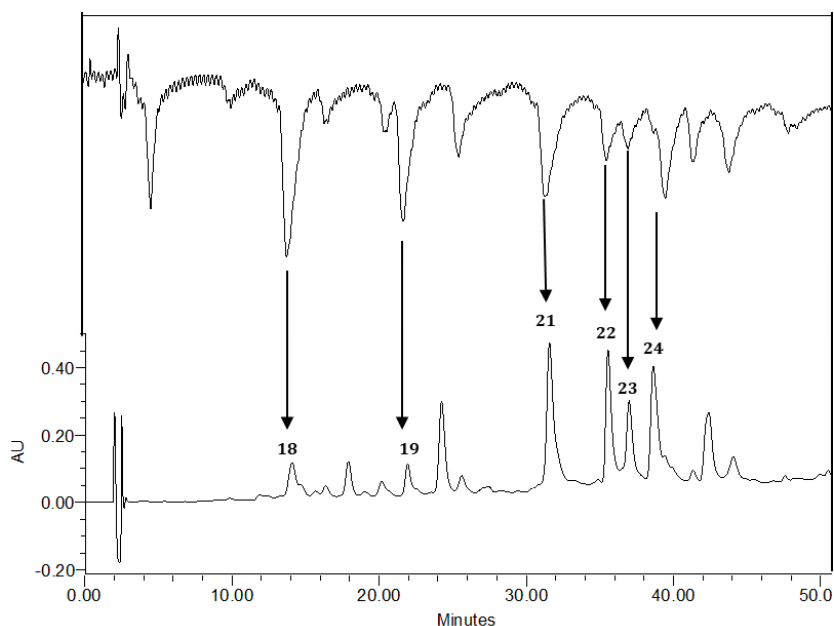


**Figura 9.3.** Cromatograma *online* de la capacidad atrapadora del radical DPPH del extracto de AcOEt de madera de ciruelo europeo 'De la Rosa' (Superior  $\lambda = 515$  nm, inferior  $\lambda = 230$  nm).

Resultados similares se observaron para el extracto de ciruelo japonés, en cuyo caso se mostraron activos los picos **18, 19, 21, 22 y 24** (**Figura 9.4**).



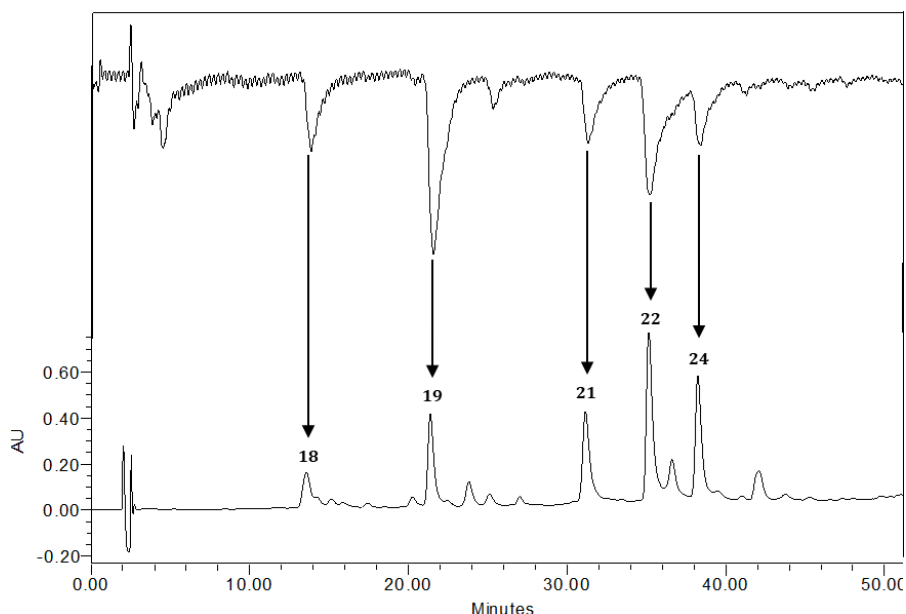


**Figura 9.4.** Cromatograma *online* de la capacidad atrapadora del radical DPPH del extracto de AcOEt de madera de ciruelo europeo ‘Showtime’ (Superior  $\lambda = 515$  nm, inferior  $\lambda = 230$  nm).

El perfil cromatográfico a 280 nm (**Figura 9.5**, perfil inferior) del extracto de AcOEt de madera de lichi, variedad ‘Mauritius’, muestra un pico mayoritario a 26.2 minutos del compuesto **30** (cinamtanina B-1). Coincidente con este tiempo de retención se observa una señal correspondiente al DPPH reducido (perfil superior), indicando actividad antioxidante para este compuesto. Además se observan otras señales que indican actividad antioxidante para los compuestos que aparecen a 10.8 min (**27**), 20.4 min (**28**), 22.0 min (**29**), 26.2 (**30**), 28.6 min (**31**), 36.9 min (**32**) y 46.0 min (**33**). En este caso se puede apreciar como el compuesto **33**, a pesar de encontrarse en pequeña cantidad, presenta una gran capacidad de captura del radical DPPH, poniendo de manifiesto la gran utilidad de esta técnica para identificar compuestos antioxidantes en extractos, aún cuando se encuentran en una baja concentración.

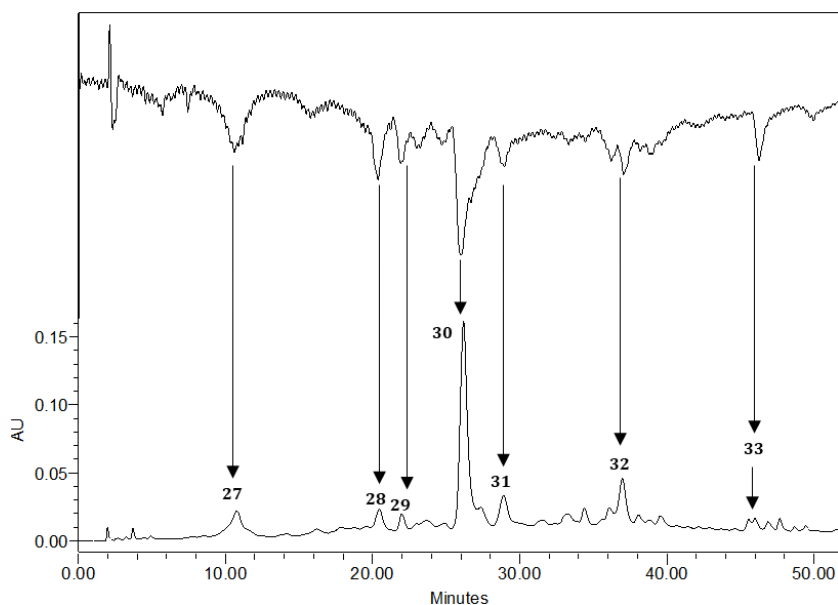


**Figura 9.5.** Cromatograma *online* de la capacidad atrapadora del radical DPPH del extracto de AcOEt de madera de lichi 'Mauritius' (Superior  $\lambda = 515$  nm, inferior  $\lambda = 280$  nm).

Por último, en el perfil cromatográfico a 280 nm de la fracción D<sub>2</sub>(IV) (**Figura 9.6**, perfil inferior) se observan ocho picos, dos correspondientes a los flavan-3-oles (+)-catequina(**18**) y (-)-epicatequina (**19**), y seis a procianidinas diméricas tipo A (**21**, **22**, **32**, **40–42**). Por su parte, la señal correspondiente al DPPH reducido muestra picos coincidentes con cada uno de los ocho compuestos indicando, de este modo, su carácter antioxidante.

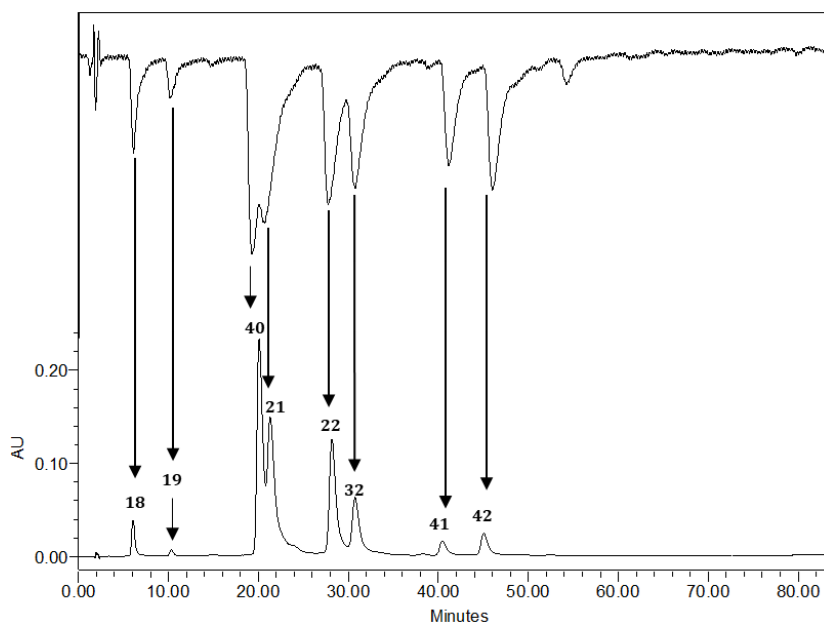


**Figura 9.6.** Cromatograma *online* de la capacidad atrapadora del radical DPPH de la fracción la fracción D<sub>2</sub>(IV) obtenida a partir del extracto de AcOEt de arándano rojo americano (Superior  $\lambda = 515$  nm, inferior  $\lambda = 280$  nm).

## **9.2 Actividad inhibidora de los extractos y compuestos aislados de cerezo y ciruelo de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA)**

El Grupo de Investigación en el que se ha llevado a cabo la presente Tesis Doctoral recibió en 2019 financiación por parte del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, para el desarrollo del proyecto titulado “Development of LDHA inhibitors as new strategy for the treatment of primary hyperoxaluria”. El objetivo principal de este proyecto es la búsqueda de compuestos que pudieran ser potenciales fármacos en el tratamiento de las hiperoxalurias primarias (PHs), aun hoy en día sin tratamiento farmacológico.<sup>560</sup> En este contexto, la evaluación de los extractos obtenidos y de los productos naturales aislados en esta Tesis, como inhibidores de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA), resultó de gran interés.

Las PHs son un conjunto de enfermedades genéticas raras que afectan al metabolismo hepático del glioxilato y que cursan con una producción excesiva de oxalato en el hígado. Este compuesto no se metaboliza en los humanos y ha de

eliminarse por vía renal. Cuando el oxalato se produce en exceso tiende a precipitar en forma de cristales de oxalato cálcico, que causan daños tisulares. El riñón es el principal órgano afectado, produciéndose urolitiasis, nefrocalcinosis y enfermedad renal terminal. De este modo, los enfermos de PH finalmente tienen que someterse a un trasplante combinado de hígado y riñón para preservar su vida.<sup>561</sup> En los últimos veinte años se han conseguido importantes avances en el conocimiento de las mutaciones genéticas causantes del déficit de determinadas enzimas en estos pacientes y se ha profundizado en el conocimiento de las rutas metabólicas y de las enzimas clave en la sobreproducción de oxalato endógeno.<sup>562</sup> Esto ha permitido el planteamiento de terapias moleculares alternativas que eviten las limitaciones y riesgos del doble trasplante.<sup>562-565</sup> Entre estas terapias emergentes se encuentra el empleo de pequeñas moléculas como inhibidores de enzimas implicadas en la formación de glioxilato, como la enzima glicolato oxidasa (GO), y en su conversión a oxalato, como la enzima LDHA (**Figura 9.7**).<sup>566</sup>

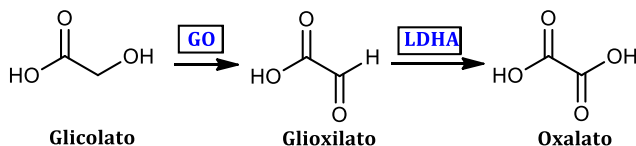


**Figura 9.7.** Participación de las enzimas glicolato oxidasa (GO) y lactato deshidrogenasa A (LDHA) en la formación de oxalato endógeno.

Actualmente, se están sintetizando una amplia variedad de compuestos con actividad inhibidora de GO<sup>567</sup> y LDHA<sup>568</sup>. También se ha evaluado dicha actividad con extractos y productos naturales.<sup>569,570</sup> Se ha observado que moléculas pequeñas que han demostrado capacidad para inhibir la enzima LDHA, generalmente, presentan grupos hidroxilo fenólicos en su estructura<sup>571</sup>, por lo que, moléculas de origen natural como los flavonoides y proantocianidinas podrían ser potenciales inhibidores de la hLDHA.<sup>572</sup> Bader *et al.*<sup>572</sup> evalúan moléculas naturales aisladas a partir de partes aéreas de *Phlomis kurdica* Rech. F., entre las que se encuentran flavonoides (concretamente flavonas), feniletanoides y fenilpropanoides. Los mejores resultados de IC<sub>50</sub> los

presentaron las flavanonas luteolina-7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido (139.2  $\mu$ M), jaceosidina-7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido (153.0  $\mu$ M) y lutenolina-7-*O*-soforósido (163.2  $\mu$ M) (**Figura 9.8**).<sup>572</sup>

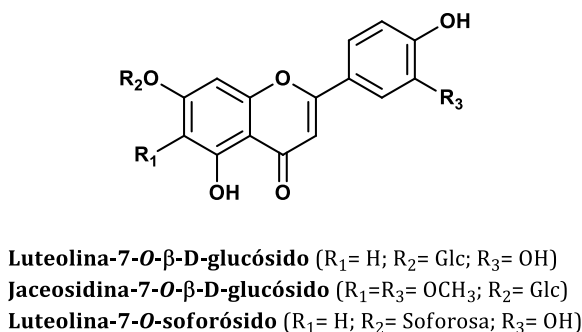


**Figura 9.8.** Estructura de flavonoides para los que se ha evaluado su actividad inhibidora de la LDHA.<sup>572</sup>

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un ensayo de evaluación de la actividad inhibidora de la enzima recombinante humana LDHA (hLDHA) de los extractos obtenidos de las plantas estudiadas y de algunos de los compuestos aislados y caracterizados estructuralmente. Este ensayo está basado en medidas espectrofotométricas de absorbancia a 340 nm, longitud de onda a la que absorbe la forma reducida del coenzima de la LDHA, el dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\beta$ -NADH) (**Figura 9.9**).

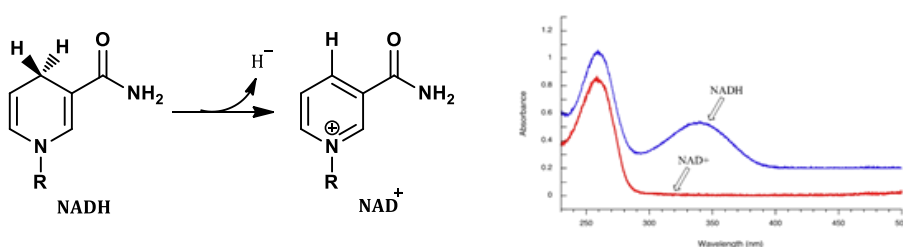


**Figura 9.9.** Estructuras de la forma reducida y oxidada del coenzima  $\beta$ -NADH y sus espectros de UV-visible.

Para el diseño de este ensayo, se tuvieron en cuenta los ensayos recogidos en bibliografía sobre caracterización cinética de *h*LDHA con los sustratos glioxilato<sup>573</sup> y piruvato<sup>570</sup> y los resultados previos obtenidos en el Grupo de Investigación en el que se desarrolla esta Tesis.<sup>574</sup> De acuerdo con estos resultados y comparando el valor de velocidad máxima ( $V_{\max}$ ) de *h*LDHA en la transformación de glioxilato a oxalato (1.16 U/mg) con el valor de  $V_{\max}$  de la transformación de piruvato a lactato (447.63 U/mg),<sup>574</sup> resultó de mayor interés desarrollar el ensayo de evaluación de inhibición de *h*LDHA con el sustrato piruvato y  $\beta$ -NADH como coenzima, monitorizando el descenso de la absorbancia de  $\beta$ -NADH, conforme la enzima *h*LDHA cataliza la reducción de piruvato a lactato y  $\beta$ -NADH se oxida a  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> (**Figura 9.10**).

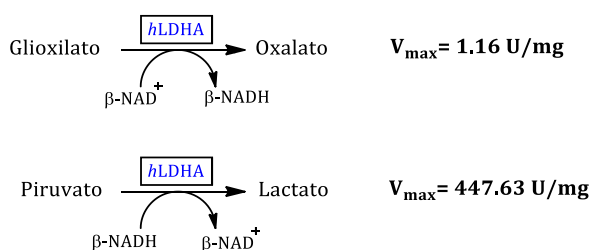


**Figura 9.10.** Reacción de óxido-reducción de glioxilato-oxalato y piruvato-lactato y valores de  $V_{\max}$ .

Así, se ha determinado la actividad de la enzima *h*LDHA midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm, durante 10 minutos, representando el 100% de actividad de la enzima el valor de la pendiente de la parte lineal de la curva de progreso de la reacción enzimática. Por su parte, la capacidad que presenta un extracto o un compuesto puro, aislado del extracto, para inhibir la actividad de la enzima se determinó por comparación de la pendiente de la reacción enzimática en presencia del inhibidor y en ausencia del mismo. De este modo, se han realizado dos tipos de medidas de inhibición. En la primera de ellas, se evalúa la actividad a una sola concentración de extracto o compuesto puro, a 28.8  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto y para el compuesto empleado como referencia (procianidina A-2), y los resultados se expresan como porcentaje de inhibición. En la segunda, se evalúan los compuestos puros que mayores

porcentajes de inhibición hayan presentado y se determina la actividad a ocho concentraciones diferentes, de 200 a 0.09  $\mu\text{M}$ . En este segundo tipo de medida, los resultados se expresan como concentración de extracto o compuesto puro requerida para inhibir el 50% de la actividad de la enzima ( $\text{IC}_{50}$ ) y se calcula a partir de la gráfica dosis-respuesta obtenida con los ocho valores de actividad obtenidos a las correspondientes concentraciones de inhibidor y empleando el *software GraphPad Prism*, versión 5.0.

En la **Tabla 9.5** se recogen los valores de los porcentajes de inhibición que se obtuvieron para los extractos de acetato de etilo de las plantas objeto de estudio y para un compuesto utilizado como referencia, la procianidina A-2. De cada una de las especies se ha elegido una variedad para esta determinación de actividad.

**Tabla 9.5.** Porcentajes de inhibición de la enzima *hLDHA*, en la transformación de piruvato a lactato, con extractos naturales.

| <b>Fuente natural<br/>(variedad)</b>        | <b>Referencia del<br/>extracto</b> | <b>Porcentaje de<br/>inhibición (%)<sup>a</sup></b> |
|---------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <i>Prunus avium</i> L. ('Starking')         | Pa-M-4a(St)                        | 20.8 $\pm$ 3.5                                      |
| <i>Prunus domestica</i> L. ('De la Rosa')   | Pd-CC-4a                           | 35.3 $\pm$ 3.2                                      |
| <i>Prunus salicina</i> L. ('Showtime')      | Ps-SE-7a(Sh)                       | 33.9 $\pm$ 4.0                                      |
| <i>Litchi chinensis</i> Sonn. ('Mauritius') | Lc-Ma-2a(Ma)                       | 39.5 $\pm$ 1.7                                      |
| <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.           | -                                  | 79.1 $\pm$ 1.7                                      |
| Procianidina A-2                            | -                                  | 37.5 $\pm$ 3.5                                      |

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición a concentración 28.8  $\mu\text{g/mL}$ . Los datos se presentan como valor medio de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar (SD).

Los extractos de acetato de etilo de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), ciruelo japonés (*Prunus salicina* L.) y litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) presentan porcentajes de inhibición similares al valor obtenido para el compuesto de referencia. Por su parte, el extracto de cerezo (*Prunus avium* L.) resultó poco activo y destaca la notable actividad inhibidora de la enzima *hLDHA* del extracto de acetato de etilo de arándano (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). Estos interesantes resultados obtenidos con el

extracto de arándano nos animan a continuar estudiando, en un futuro próximo, la actividad inhibidora de los componentes del mismo.

Además, se han evaluado las actividades inhibidoras de los flavanoides aislados del extracto de acetato de etilo de cerezo (Apartado 4.1.3) y de las proantocianidinas aisladas del correspondiente extracto de ciruelo europeo (Apartado 4.2.3), recogiendo en las **Tablas 9.6 y 9.7** los resultados obtenidos.

**Tabla 9.6.** Porcentajes de inhibición de la enzima *h*LDHA, en la transformación de piruvato a lactato, con flavonoides aislados del extracto de AcOEt de cerezo, variedad 'Starking' Pa-M-4a(St).

| Compuesto        | Porcentaje de inhibición (%) <sup>a</sup> |
|------------------|-------------------------------------------|
| <b>15</b>        | 11.6 ±2.1                                 |
| <b>4</b>         | 16.2 ±1.5                                 |
| <b>5</b>         | 18.2 ±4.2                                 |
| <b>12</b>        | 13.6 ±3.4                                 |
| <b>17</b>        | 15.6 ±5.4                                 |
| <b>1</b>         | 15.8 ±1.2                                 |
| Procianidina A-2 | 22.6 ±0.7                                 |

<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición a concentración 50 µM para todos los compuestos y para la referencia (procianidina A-2). Los datos se presentan como valor medio de 3 réplicas ± desviación estándar (SD).

**Tabla 9.7.** Porcentajes de inhibición de la enzima *h*LDHA, en la transformación de piruvato a lactato, con proantocianidinas aisladas del extracto de AcOEt de ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa' (Pd-CC-4a).

| Compuesto        | Porcentaje de inhibición (%) <sup>a</sup> |
|------------------|-------------------------------------------|
| <b>21</b>        | 65.9 ± 1.0                                |
| <b>22</b>        | 49.0 ± 0.6                                |
| <b>23</b>        | 56.1 ±1.6                                 |
| <b>24</b>        | 58.2 ± 0.2                                |
| <b>25</b>        | 41.4 ± 2.2                                |
| <b>26</b>        | 43.8 ± 0.9                                |
| Procianidina A-2 | 34.1 ± 0.5                                |

<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición a concentración 50 µM para todos los compuestos y para la referencia (procianidina A2). Los datos se presentan como valor medio de 3 réplicas ± desviación estándar (SD).



Los flavanoides aislados del extracto de acetato de etilo de cerezo, variedad 'Starking', (Apartado 4.1.3) han resultado ser menos activos que la procianidina A-2, sin embargo las proantocianidinas aisladas del extracto de acetato de etilo de ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa', (Apartado 4.2.3) han mostrado una interesante actividad inhibidora y por lo tanto se llevaron a cabo medidas de IC<sub>50</sub> con estos compuestos (**Tabla 9.8**).

**Tabla 9.8.** Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos aislados del extracto de AcOEt ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa', (Pd-CC-4a), y ajuste R<sup>2</sup> de la curva dosis-respuesta

| Compuesto        | IC <sub>50</sub> (μM) | R <sup>2</sup> |
|------------------|-----------------------|----------------|
| <b>21</b>        | 3.2 ± 0.3             | 0.952          |
| <b>22</b>        | 24.6 ± 2.8            | 0.955          |
| <b>23</b>        | 16.0 ± 1.8            | 0.954          |
| <b>24</b>        | 12.8 ± 0.1            | 0.975          |
| <b>25</b>        | 43.0 ± 2.5            | 0.974          |
| <b>26</b>        | 22.1 ± 1.7            | 0.941          |
| Procianidina A-2 | 54.2 ± 6.4            | 0.960          |

Los datos se presentan como valor medio de 3 réplicas ± desviación estándar (SD).

### 9.3 Actividad antibacteriana y antibiopelícula de los compuestos aislados a partir de madera de cerezo y ciruelo europeo

Existen un gran número de bacterias capaces de adaptarse y vivir en entornos muy variados, provocando la contaminación de encimeras y equipamiento de industrias alimentarias y suponiendo un importante riesgo de deterioro de los alimentos manufacturados. Además, estas bacterias que se encuentran sobre superficies son capaces de formar una biopelícula extracelular que supone un aumento en la resistencia que desarrollan frente a diferentes biocidas, desinfectantes y antibióticos habitualmente empleados,<sup>575,576</sup> como ocurre con la cepa *Enterobacter* sp. UJA37p.

Los flavonoides son compuestos fenólicos que están ampliamente distribuidos en las plantas. Estos metabolitos secundarios han demostrado numerosas propiedades biológicas, entre las que se encuentran las antimicrobianas.<sup>577</sup>

Teniendo en cuenta este aspecto, se evaluó la actividad antimicrobiana y su capacidad de inhibición de la formación de biopelículas bacterianas de los compuestos **1**, **4**, **5**, **12**, **15** y **17** aislados a partir del extracto de acetato de etilo de madera de cerezo, variedad 'Starking' [Pa-M-4a(St)] (Apartado 4.1.3) y de los compuestos **20–26** obtenidos del correspondiente extracto de ciruelo europeo, variedad 'De la Rosa' (Pd-CC-4a) (Apartado 4.2.3). Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo de investigación de los Drs. D. Antonio Gálvez y Dña. Elena Ortega (AGR-230), del Área de Microbiología de la Universidad de Jaén.

La actividad antimicrobiana de estos compuestos se evaluó frente a dos colecciones de bacterias, una Española (*Spanish Type Culture Collection*, CECT), y otra de la Universidad de Göteborg (CCUG), además de con cepas previamente aisladas, en el laboratorio de los colaboradores a partir de alimentos y que presentan una alta resistencia a los antibióticos.

Tras un test preliminar estándar en agar, los compuestos **1**, **4**, **5**, **15** y **17** aislados de madera de cerezo y **20**, **23–25** obtenidos a partir de madera de ciruelo europeo, mostraron los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) menores (100 µg/mL) frente a la cepa multiresistente *Enterobacter* sp. UJA37p, aislada a partir de tomate y que ha mostrado una alta tolerancia a un gran número de biocidas. Estos compuestos fueron los seleccionados para evaluar su capacidad de inhibición de la formación de biopelículas con esta bacteria, expresado en la **Tabla 9.9** como porcentaje de formación, y la capacidad de disgregación de la biopelícula una vez formada, expresado en la **Tabla 9.10** como porcentaje de persistencia. Los mejores resultados se observaron para los compuesto **1** y **17**, éstos eran capaces de inhibir un 15% la formación de la biopelícula (85% de porcentaje de formación, **Tabla 9.9**) a concentración 0.1 µg/mL y para los compuestos **17**, **23** y **24**, los cuales eran capaces de inducir un 28–35% de disgregación de la biopelícula (72–65% de porcentaje de persistencia, **Tabla 9.10**) a concentración 0.1 µg/mL.

**Tabla 9.9.** Porcentaje de formación de biofilm de la cepa *Enterobacter* sp. UJA37p en presencia de los compuestos **1, 4, 5, 15, 17, 20, 23-25** a diferente concentración.

| Compuesto | 10 µg/mL       | 1 µg/mL        | 0.1 µg/mL     |
|-----------|----------------|----------------|---------------|
| 1         | 163.41 ± 19.59 | 113.96 ± 0.74  | 85.99 ± 4.58  |
| 4         | 160.20 ± 5.88  | 71.10 ± 8.35** | 95.86 ± 15.54 |
| 5         | 126.01 ± 19.31 | 109.16 ± 10.84 | 95.86 ± 15.54 |
| 15        | 149.51 ± 9.46  | 114.83 ± 12.34 | 102.40 ± 8.11 |
| 17        | 139.04 ± 8.44  | 112.92 ± 3.66  | 85.11 ± 12.46 |
| 20        | 174.86 ± 15.10 | 146.46 ± 11.91 | 88.06 ± 8.95  |
| 23        | 223.50 ± 27.86 | 148.09 ± 8.55  | 91.71 ± 10.36 |
| 24        | 166.03 ± 16.98 | 148.47 ± 7.05  | 102.02 ± 9.44 |
| 25        | 197.44 ± 17.75 | 114.45 ± 19.38 | 95.42 ± 10.62 |

\*\* P<0.05.

**Tabla 9.10.** Porcentaje de persistencia de biofilm después de la incubación con los compuestos **1, 4, 5, 15, 17, 20, 23-25** a diferente concentración.

| Compuesto | 10 µg/mL      | 1 µg/mL        | 0.1 µg/mL      |
|-----------|---------------|----------------|----------------|
| 1         | 84.59 ± 8.51  | 86.00 ± 7.26   | 89.11 ± 8.83   |
| 4         | 81.75 ± 4.74  | 79.68 ± 8.23   | 77.18 ± 6.34** |
| 5         | 82.52 ± 5.10  | 81.86 ± 8.03   | 92.48 ± 7.17   |
| 15        | 93.52 ± 8.53  | 93.25 ± 11.03  | 97.44 ± 4.85   |
| 17        | 88.73 ± 6.48  | 80.66 ± 3.75   | 72.55 ± 7.97** |
| 20        | 95.26 ± 3.15  | 84.15 ± 1.70   | 75.11 ± 8.12** |
| 23        | 93.41 ± 7.06  | 96.30 ± 4.20   | 71.19 ± 7.79** |
| 24        | 114.60 ± 9.56 | 105.56 ± 10.71 | 65.74 ± 4.66** |
| 25        | 164.81 ± 6.32 | 148.20 ± 9.51  | 112.36 ± 7.31  |

\*\* P<0.05.

#### 9.4 Actividad antitumoral de (-)-oleocantal

La actividad antitumoral del compuesto (-)-oleocantal (**49**) fue ensayada frente a las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación de los Drs. D. Ginés M. Salido y D. Juan A. Rosado, del Área de Fisiología de la Universidad de Extremadura. En este estudio se comprobó que el compuesto **49** inhibía selectivamente la viabilidad y proliferación de las células tumorales MDA-MB-231 sin afectar a las no tumorales MCF10A.<sup>578</sup> Además, era capaz de reducir la capacidad de migración de las células cancerosas MCF7 sin afectar a la de las células MCF10A. Estudios adicionales se han llevado a cabo por el Dr. D. Ignacio J. Molina, del Área de Inmunología de la Universidad de Granada, con el compuesto **49** y sobre líneas celulares de cáncer de mama, colon, melanoma y hematopoyético. Uno de los resultados más interesantes se ha obtenido en células de este último tipo de cáncer (células Jurkat, CEM, Raji y K562) y se describe, por primera vez, una potente actividad proapoptótica con el compuesto **49**.<sup>579</sup>

#### 9.5 Actividad antiinflamatoria de (-)-oleocantal, forma monoaldehídica del aglicón de oleuropeína y (-)-metil-oleocantal

También se han evaluado los efectos antiinflamatorios mediante ensayo *ex vivo* de (-)-oleocantal (**49**), la forma monoaldehídica del aglicón de ligustrósido (Agl-LIG, **51**) y (-)-metil-oleocantal (**59**). Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Dr. Catalina Alarcón de la Lastra, del Área de Farmacognosia de la Universidad de Sevilla. Este estudio ha puesto de manifiesto la actividad antiinflamatoria de estos compuestos proponiéndolos como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunoinflamatorias.

#### 9.6 Actividad antiangiogénica de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal

La actividad antiangiogénica que puede presentar un compuesto hace referencia a su capacidad para inhibir o reducir la formación de nuevos vasos

sanguíneos a partir de otros preexistentes. Esta capacidad tiene utilidad en el tratamiento de enfermedades como la psoriasis o la degeneración macular, entre otras, además de poder actuar también como antitumoral de forma indirecta, mediante la inhibición de la vascularización del tumor. Los compuestos (-)-oleaceína (**48**) y (-)-oleocantal (**49**) han sido ensayados *in vitro* en el grupo de investigación del Dr. D. Miguel A. Medina, del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Málaga, y se ha comprobado que ambos compuestos son capaces de inhibir la proliferación y migración de células endoteliales, inhibiendo también la secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular y que están implicadas en dicha migración celular. Además, ambas moléculas impiden la formación de vasos sanguíneos por células endoteliales, provocando una parada en la fase S/G2/M del ciclo celular y causando así la apoptosis de las células. Estos resultados ponen de manifiesto los efectos antiangiogénicos de estos polifenoles y animan a seguir con este trabajo para tratar de establecer los posibles mecanismos de acción.<sup>580</sup>



# MATERIALS AND METHODS

## 10. GENERAL PROCEDURES

### 10.1 Solvents and reagents

Solvents and reagents used were: methanol (MeOH; HPLC, VWR), acetonitrile (MeCN; HPLC, VWR), dichloromethane (DCM; 99%, VWR), ethyl acetate (EtOAc; 99%, VWR), absolute ethanol (EtOH; 99%, Merck), diethyl ether (Et<sub>2</sub>O; 99%, Honeywell), chloroform (99%, VWR), *n*-hexane (Hex; 98%, VWR), acetic acid (99%, VWR), silica gel 60 F<sub>240</sub> precoated aluminum sheets (TLC, VWR), silica gel 60 (particle size 0.040–0.063 mm and 0.060–0.200 mm, Merck), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•, Sigma-Aldrich), dimethylsulfoxide (96%, Sigma-Aldrich), Sodium pyruvate (96%, Sigma-Aldrich), β-NADH (≥97%, Sigma-Aldrich), Sodium phosphate monobasic dihydrate (≥99%, Sigma-Aldrich), Sodium phosphate dibasic dihydrate (≥99%, Sigma-Aldrich), 3-[[3[(cyclopropylamino)sulfonyl]-7-(2,4-dimethoxy-5-pyrimidinyl)-4-quinolinyl]amino]-5-(3,5-difluorophenoxy)benzoic acid (GSK 2837808 A, Tocris), Recombinant human LDHA (95%, specific activity > 300 units/mg and concentration of 0.5 mg/mL, Abcam), rosemary extract (Bordantix®, Evesa).

Solvents used for high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses, semi-preparative HPLC purification and optical rotation measures were HPLC grade (VWR). Water (ultrapure grade) used for chromatographic separations was produced by a Milli-Q water (1.8 MΩ) equipment (Merck). Deuterated methanol (MeOD, VWR) and deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>, VWR) were used to prepare solutions of isolated compounds for nuclear magnetic resonance (NMR) analyses.

#### ***tert*-Butanol (*t*-BuOH)**

It was firstly dried over anhydrous CaCl<sub>2</sub> (5% w/v) overnight and then refluxed over anh. CaCl<sub>2</sub> (5% w/v). A continuous distillation apparatus was used.

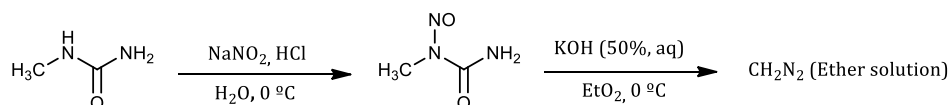
#### **Tetrahydrofuran (THF)**

It was firstly dried over anhydrous CaCl<sub>2</sub> (5% w/v) overnight and then refluxed over Na (1% w/v), and benzophenone (0.3% w/v) as indicator. A continuous distillation apparatus was used.



**Diazomethane (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>)**

Diazomethane used for the methylation of secoiridoids (Section 13.2.1) was obtained *in situ* from *N*-methyl-*N*-nitrosoarea (**Scheme 10.1**).



**Scheme 10.1.** Synthesis of diazomethane from *N*-methyl-*N*-nitrosoarea

A mixture of *N*-methylurea (200 mmol), sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) (220 mmol) and H<sub>2</sub>O (120 mL) was stirred at 0°C. When initial products were totally solubilised, hydrochloric acid (26 mL) was added dropwise for 1 hour. The mixture was continuing stirred for 30 minutes. Finally, the beige precipitate was filtered using a Büchner funnel, washed with cold water (25 mL) and dried under vacuum.

An Erlenmeyer flask with a magnetic stir bar containing a mixture of *N*-methyl-*N*-nitrosoarea (78 mmol) and diethyl ether (Et<sub>2</sub>O) (80 mL) was placed in an ice bath. Then, a 50% KOH aqueous solution (40 mL) was added slowly and the mixture stirred for 30 minutes. The neon-yellow ether layer was separated and using immediately for the methylation.<sup>581</sup>

## 10.2 Chromatographic techniques

### 10.2.1 Analytical Thin Layer Chromatography (TLC)

For analytical TLC were employed precoated aluminium sheets of silicagel (Meck 60 F254). UV radiation (254 nm; 365 nm) and/or a solution of phosphomolybdic acid in absolute ethanol (7% w/v) were used for the visualization of spots.

### **10.2.2 Column Chromatography (CC)**

For column chromatographies were used Merck silica gel 60 (0.063-0.200 mm) or Merck silica gel 60 for flash column (0.040-0.063 mm). Samples were introduced in the column as a mixture with a double amount of silica gel (0.063-0.200 mm). The elution was carried out with an isocratic or increased polarity gradient mode. Fractions were monitored by TLC (Section 10.2.1).

### **10.2.3 Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC®)**

Plant extracts were fractionated with a *FCPC 200*® apparatus (Kromaton Technologies). The instrument is fitted with a rotor of 200 mL and the rotation can be adjusted from 0 to 2.000 rpm. The sample was injected into the FCPC with a *Rheodyne 3725i-038* manual injector equipped with a 10-mL sample loop. The instrument is fitted with an *Alltech 627 isocratic* pump, an UV-Vis *Linear UVIS 200* detector set at 280 nm, and a *Gilson FC 204* fraction collector. A quaternary biphasic solvent system consisting of a mixture of *n*-hexane, ethyl acetate, ethanol and water is necessary to work with this technique. The proportion of each solvent was optimized by TLC (Section 10.2.1) and the solvent mixtures were prepared in a separatory funnel.

Initially, the rotor was filled with the lower phase in descending mode without rotation. Then, the upper phase was loaded in ascending mode rotating at 1.200 rpm and a flow of 7–9 mL min<sup>-1</sup>. Sample was dissolved in 8 mL of lower phase and 2 mL of upper phase, filtered and injected in the system in ascending mode. Fractions of 15–20 mL were collected, initially, in ascending mode, and then in descending mode when the absorbance decreased.

### 10.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### HPLC analytical equipments

**Instrument A.** It consists in a *Waters XX* equipped with a quaternary pump *Waters 600E*, a degassing system with He, a *Rheodyne 7725* manual injector, a C18 *Waters Spherisorb*<sup>®</sup> ODS2 (250 x 3 mm, 5 µm) analytical column, a detector *Water 2996 Photodiode Array Detector* (DAD), a collector of fractions *Waters Fraction Collector* and a controller *Water 600 Controller*.

**Instrument B.** It consists in a *Shimadzu HPLC* system equipped with two *LC-20AD* binary pumps, a *DGU-20A5* on-line degasser, a *CTO-10ASVPC* column oven module, a *SPD-20A* Photodiode Array Detector (DAD), a *SIL-20ACHT* autosampler and a *FRC-10A* fraction collector. Separation was carried out with a C18 *Waters Spherisorb*<sup>®</sup> ODS2 (250 x 4.6 mm, 5 µm) analytical column.

#### HPLC semipreparative equipment

**Instrument C.** It consists in a *Shimadzu HPLC* system equipped with a *LC-20AP Prominence*<sup>®</sup> pump, a *SIL-10AP* autosampler, a C18 *Waters Spherisorb*<sup>®</sup> ODS2 (250 x 10 mm, 5 µm) semipreparative column, a *SPD-M20A Prominence*<sup>®</sup> photodiode array detector and a *CBM20A Prominence*<sup>®</sup> controller.

### 10.2.5 Gas Chromatography (GC)

**Instrument D.** It consist in a *Varian 3350* gas chromatograph equipped with a methyl silicone HP-5MS (crosslinked 5% PH ME siloxane) capillary column (30 m x 0.25 mm), film thickness 0.25 µm and a detector FID at 300°C. He was used as carried gas. Injection volume was 1 µL. The program of temperature consist: from 50 to 110°C at 10°C/min, from 110 to 225°C at 12°C/min and from 225 to 275°C at 15°C/min.

## 10.3 Analytical and spectroscopy techniques

### 10.3.1 Specific optical rotation ( $[\alpha]_D$ )

It was determined in a JASCO P-200 polarimeter with cells of 10 mL and using methanol or chloroform as solvent. Specific optical rotation ( $[\alpha]_D$ ) is defined as:

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{c \times l} \times 100$$

Where  $\alpha$  is the optical rotation,  $c$  is the concentration of sample in  $\text{cg mL}^{-1}$  and  $l$  is the length of cell in decimetres.

### 10.3.2 Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

$^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and 2D NMR spectra were obtained in a *Bruker DPX 400*, dissolving the sample in methanol- $d_4$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) or chloroform- $d$  ( $\text{CDCl}_3$ ) and using tetramethylsilane (TMS, 0.00 ppm) as internal reference in  $^1\text{H}$  NMR. In  $^{13}\text{C}$  NMR the scale was adjusted with the central peak of the heptuplet of  $\text{CD}_3\text{OD}$  (49.00 ppm) or the triplet of  $\text{CDCl}_3$  (77.00 ppm). The degree of substitution of carbons was established with a DEPT-135 pulse sequence. Data of chemical shift ( $\delta$ ) and coupling constant ( $J$ ) are given in parts per million (ppm) and hertz (Hz), respectively. Bidimensional experiments (HSQC, HMBC and COSY) were necessary to assign signals in some cases. Signals multiplicity was showed with the usual abbreviations (*s*: singlet, *d*: doublet, *dd*: double doublet, *t*: triplet, *q*: quadruplet, *quint*: quintuplet...). Samples were prepared in solution in a conventional tube of NMR.

## 10.4 Hyphenated techniques

The **LC-MS** (HPLC-DAD/ESI-MS) analyses were carried out on an *Agilent 1100 Series* HPLC chromatograph (**Instrument E**) equipped with a quaternary pump, a vacuum degasser, an automatic injector, and a *Agilent 1100 Series* diode array

detector (DAD). Separations were carried out using a C18 Kinetex (50 x 2.10 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ) (**Analytical column A**) or a C18 *Waters Spherisorb*<sup>®</sup> ODS2 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) analytical column (**Analytical column B**). The HPLC instrument was connected to an ion trap mass spectrometer *Esquire 600* (*Bruker Daltonics*) with electrospray (ESI). ESI was used in negative mode.

## 11. ISOLATION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND PROANTHOCYANIDINS IN *Prunus*, *Litchi* AND *Vaccinium*

### 11.1 Study of the pruning wood of cherry tree (*Prunus avium* L.)

#### 11.1.1 Collection and extraction of cherry pruning wood

Samples of wood from pruning several cherry trees of the cultivars 'Garrafal Napoleon', 'Picota', 'Burlat', 'Starking', 'Summit', 'Monzón', and 'Lapins' were collected in a farming plot located in Torres, province of Jaén, Spain, in October 2014. In addition, a sample of 'Summit' was collected in a farming plot located in Alcalá la Real, province of Jaén (**Table 11.1**). They consisted of four or five pieces of wood of 2–5.5 cm diameter and 60 cm length without leaves. Plant material was stored in a dry and dark place at room temperature with passive ventilation until extraction. Just before starting the extraction process, a wood piece (approx. 3 cm diameter) was ground.

**Table 11.1.** Collection and processing of pruning woods of cherry tree.

| Reference     | Cultivar          | Location <sup>a</sup> | Collection date | Extraction date |
|---------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Pa-M-1a(G)    | Garrafal Napoleón | Torres                | 13/10/2014      | 6/5/2015        |
| Pa-M-2a(P)    | Picota            | Torres                | 13/10/2014      | 6/5/2015        |
| Pa-M-3a(B)    | Burlat            | Torres                | 13/10/2014      | 11/5/2015       |
| Pa-M-4a(St)   | Starking          | Torres                | 13/10/2014      | 11/5/2015       |
| Pa-M-5a(Sm)   | Summit            | Torres                | 13/10/2014      | 12/5/2015       |
| Pa-SSu-5a(Sm) | Summit            | Alcalá la Real        | 13/10/2014      | 12/5/2015       |
| Pa-M-6a(M)    | Monzón            | Torres                | 13/10/2014      | 13/5/2015       |
| Pa-M-7a(L)    | Lapins            | Torres                | 13/10/2014      | 13/5/2015       |

<sup>a</sup>Province of Jaén, Spain.

The wood samples (**Table 11.1**) were extracted using extraction procedure A: 20 g of wood shavings were extracted with 250 mL of DCM and then with 250 mL of EtOAc, both for 2 h at reflux. DCM extract was discarded. The EtOAc extract was filtered

and the solvent was evaporated under reduced pressure at 40 °C in a *Büchi R-210* rotary evaporator. Dry extracts were stored at -20 °C until analysis.

In addition, a sample of wood shavings (600 g) of cherry tree cultivar 'Starking' was extracted following the same procedure yielding 6.24 g of EtOAc extract.

### **11.1.2 HPLC-DAD analyses of cherry wood extracts**

Cherry EtOAc extracts were analysed by HPLC-DAD (Apartado 10.2.4). Samples were dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>-1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Optimal method (Elution method A) was achieved using methanol (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of acetic acid, v/v, at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. The gradient program consisted in a linear gradient from 15 to 55% A in 75 min, a linear gradient from 55 to 80% A in 2 min, a linear gradient from 80 to 100% A in 3 min, and other 5 min to return to initial conditions.

### **11.1.3 HPLC-DAD/ESI-MS analysis of cherry wood extract, cultivar 'Starking'**

The AcOEt extract obtained from cultivar 'Starking' was analysed by HPLC-DAD/ESI-MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4). The separation was carried out using methanol (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of formic acid, v/v, at a flow rate of 0.25 mL/min. The gradient programme consisted in a linear gradient from 15 to 60% A in 20 min, a linear gradient from 60 to 80% A in 5 min, a linear gradient from 80 to 100% A in 2.5 min, and other 2.5 min to return to initial conditions. Mass spectrometric operation parameters were: capillary voltage: 4 kV; capillary exit voltage: -0.5 kV; nebulizer pressure: 50 psi; dry gas: 10 L min<sup>-1</sup>, and gas temperature: 350 °C. The fragmentation setting used for MS/MS analyses were: energy: 1.0 V; width: 4 m/z, time: 40 ms.

#### **11.1.4 Chromatographic fractionation of cherry wood extract and isolation of flavonoids**

An aliquot (1.75 g) of cherry wood extract, cultivar “Starking”, was chromatographed by FCPC instrument (Section 10.2.3). Optimized system solvent was composed by Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:2:1:2, v/v/v/v). In total, 67 fractions were collected, 55 in ascending mode and the rest in descending mode. Fractions collected were monitored by TLC (Section 10.2.1) and by HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). For HPLC analysis a gradient elution method A (Section 11.1.2) was used. Fractions with similar composition were pooled (**Table 11.2**) and evaporated.

**Table 11.2.** Fractionation of EtOAc extract of cherry wood, cultivar “Starking”, by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:2:1:2, v/v/v/v).

| Major fraction       | Fractions | Mass (mg) |
|----------------------|-----------|-----------|
| A <sub>1</sub> (I)   | 1         | 281       |
| A <sub>1</sub> (II)  | 4         | 13        |
| A <sub>1</sub> (III) | 5–10      | 16        |
| A <sub>1</sub> (IV)  | 12–24     | 18        |
| A <sub>1</sub> (V)   | 33–34     | 56        |
| A <sub>1</sub> (VI)  | 45–47     | 14        |
| A <sub>1</sub> (VII) | 60–62     | 76        |

A<sub>1</sub>(I) (281 mg) was chromatographed by FCPC (Section 10.2.3) using Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:2:6:1, v/v/v/v) as solvent system. Thirty-four fractions were collected, 27 in ascending mode and the rest in descending mode. Fractions collected were monitored by TLC (Section 10.2.1) and by HPLC–DAD analysis (Instrument A, section 10.2.4; elution method A, section 11.1.2). Fractions with similar composition were pooled (**Table 11.3**) and evaporated.

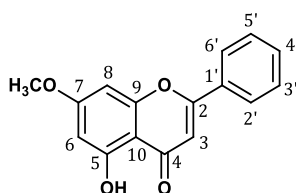


**Table 11.3.** Fractionation of A<sub>1</sub> by FCPC  
(Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:2:6:1, v/v/v/v).

| Major fractions                   | Fractions | Mass (mg) |
|-----------------------------------|-----------|-----------|
| A <sub>1</sub> (I)-B <sub>1</sub> | 16–19     | 16        |
| A <sub>1</sub> (I)-B <sub>2</sub> | 23–31     | 163       |

A<sub>1</sub>(I)-B<sub>1</sub> (16 mg) was a pure compound identified as tectochrysin (**17**) (*Table 11.4*).

### Tectochrysin (**17**)



Tectochrysin (**17**)

Brown solid

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 267 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 251 (100).

**Retention time:** 58.5 min (*Figure 4.3*, section 4.1.1).

**Table 11.4.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **17**.

| <b>Tectochrysin (17) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                              |             |                                         |                               |
|----------------------------------------------------|------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Position</b>                                    | <b><sup>1</sup>H</b>         | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                   |
| 2                                                  | -                            | -           | (164.17)                                | -                             |
| 3                                                  | 6.67 (s)                     | -           | 106.03                                  | 131.50, 164.17, 182.66        |
| 4                                                  | -                            | -           | (182.66)                                | -                             |
| 5                                                  | -                            | -           | (157.97)                                | -                             |
| 6                                                  | 6.51 (d, $J_{6,8}$ = 2.2 Hz) | 6.38        | 92.85                                   | 98.36, 105.88, 157.97, 165.79 |
| 7                                                  | -                            | -           | (165.79)                                | -                             |
| 8                                                  | 6.38 (d, $J_{8,6}$ = 2.2 Hz) | 6.51        | 98.36                                   | 92.85, 105.88, 162.37         |
| 9                                                  | -                            | -           | (162.37)                                | -                             |
| 10                                                 | -                            | -           | (105.88)                                | -                             |
| 1'                                                 | -                            | -           | (131.50)                                | -                             |
| 2'                                                 | 7.88-7.90 (m)                | -           | 126.45                                  | -                             |
| 3'                                                 | 7.50-7.55 (m)                | -           | 129.24                                  | -                             |
| 4'                                                 | 7.50-7.55 (m)                | -           | 131.98                                  | -                             |
| 5'                                                 | 7.50-7.55 (m)                | -           | 129.24                                  | -                             |
| 6'                                                 | 7.88-7.90 (m)                | -           | 126.45                                  | -                             |
| O-CH <sub>3</sub>                                  | 3.88 (s)                     | -           | 55.96                                   | 165.79                        |
| OH                                                 | 12.71 (s)                    | -           | -                                       | -                             |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

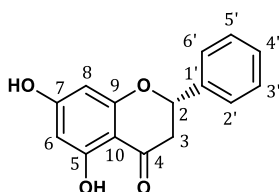
A<sub>1</sub>(I)-B<sub>2</sub> (163 mg) was chromatographed by FCPC (Section 10.2.3) using Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (4:1:1:1, v/v/v/v) as solvent system. Twenty-four fractions were collected, all of them in ascending mode. Fractions collected were monitored by TLC (Section 10.2.1) and by HPLC-DAD analysis (Instrument A, section 10.2.4; elution method A, section 11.1.2). Fractions with similar composition were pooled (**Table 11.5**) and evaporated.

**Table 11.5.** Fractionation of A<sub>1</sub>(I)-B<sub>2</sub> by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:2:6:1, v/v/v/v).

| <b>Major fractions</b>                 | <b>Fractions</b> | <b>Mass (mg)</b> |
|----------------------------------------|------------------|------------------|
| A <sub>1</sub> (I)-B <sub>2</sub> (I)  | 6-7              | 16               |
| A <sub>1</sub> (I)-B <sub>2</sub> (II) | 16-18            | 34               |

A<sub>1</sub>(I)-B<sub>2</sub>(I) (16 mg) was a pure compound identified as pinocembrin (**15**) (**Table 11.6**).

**(+)-Pinocembrin (15)**



**(+)-Pinocembrin (15)**

Whitish solid

$[\alpha]_D^{25} +28.4^\circ$  (*c* 0.7 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 255 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 221 (23), 213 (100), 211 (25), 169 (59), 167 (69), 145 (97), 141 (11), 137 (22).

**Retention time:** 48.4 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

**Table 11.6.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **15**.

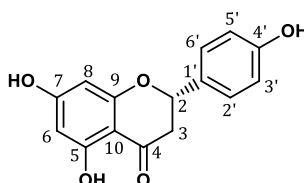
| <b>(+)-Pinocembrin (15) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                          |               |                                    |                               |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Position                                              | <sup>1</sup> H                                           | COSY          | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                          |
| 2                                                     | 5.45 ( <i>dd</i> , $J_{2,3a}=3.1$ ; $J_{2,3b}=12.1$ Hz)  | 2.77;<br>3.08 | 80.44                              | 127.34                        |
| 3a                                                    | 2.77 ( <i>dd</i> , $J_{3a,2}=3.1$ ; $J_{3a,3b}=17.1$ Hz) | 3.08,<br>5.44 | 44.18                              | 197.30                        |
| 3b                                                    | 3.08 ( <i>dd</i> , $J_{3,2}=12.1$ ; $J_{3b,3a}=17.1$ Hz) | 2.77,<br>5.44 | 44.18                              | 80.44, 140.44, 197.30         |
| 4                                                     | -                                                        | -             | (197.30)                           | -                             |
| 5                                                     | -                                                        | -             | (165.49)                           | -                             |
| 6                                                     | 5.90 ( <i>d</i> , $J_{5,7}=2.1$ Hz)                      | 5.94          | 97.20                              | 96.25, 103.38                 |
| 7                                                     | -                                                        | -             | (168.47)                           | -                             |
| 8                                                     | 5.94 ( <i>d</i> , $J_{7,5}=2.1$ Hz)                      | 5.90          | 96.25                              | 97.20, 103.38, 164.67, 168.47 |
| 9                                                     | -                                                        | -             | (164.67)                           | -                             |
| 10                                                    | -                                                        | -             | (103.38)                           | -                             |

|    |               |   |          |   |
|----|---------------|---|----------|---|
| 1' | -             | - | (140.44) | - |
| 2' | 7.48-7.50 (m) | - | 127.34   | - |
| 3' | 7.34-7.43 (m) | - | 129.70   | - |
| 4' | 7.35-7.42 (m) | - | 129.62   | - |
| 5' | 7.34-7.43 (m) | - | 129.70   | - |
| 6' | 7.48-7.50 (m) | - | 127.34   | - |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

A<sub>1</sub>(I)-B<sub>2</sub>(II) (34 mg) was composed mainly by a compound identified as naringenin (**10**) (**Table 11.7**).

### (-)-Naringenin (**10**)



(-)-Naringenin (**10**)

Yellow solid

$[\alpha]_D^{25} -7.7^\circ$  (c 0.9 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 271 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 177 (21), 151 (100), 119 (7).

**Retention time:** 36.7 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

**Table 11.7.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **10**.

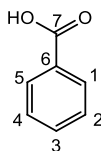
| (-)-Naringenin ( <b>10</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                                                |            |                                    |                        |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------|------------------------|
| Position                                    | <sup>1</sup> H                                                                 | COSY       | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                   |
| 2                                           | 5.29 (dd, <i>J</i> <sub>2,3a</sub> = 3.0; <i>J</i> <sub>2,3b</sub> =13.0 Hz)   | 2.66, 3.07 | 80.41                              | 129.01, 131.05, 197.73 |
| 3a                                          | 2.66 (dd, <i>J</i> <sub>3a,2</sub> = 3.0; <i>J</i> <sub>3a,3b</sub> = 17.1 Hz) | 5.29, 3.07 | 43.97                              | 197.73                 |

|    |                                                               |               |          |                           |
|----|---------------------------------------------------------------|---------------|----------|---------------------------|
| 3b | 3.07 ( <i>dd</i> , $J_{3b,2} = 13.0$ ; $J_{3b,3a} = 17.1$ Hz) | 5.29,<br>2.66 | 43.97    | 80.41, 131.05,<br>197.73  |
| 4  | -                                                             | -             | (197.73) | -                         |
| 5  | -                                                             | -             | (165.40) | -                         |
| 6  | 5.87 ( <i>d</i> , $J_{6,8} = 2.1$ Hz)                         | 5.88          | 97.05    | 96.16, 103.33,<br>168.27  |
| 7  | -                                                             | -             | (168.28) | -                         |
| 8  | 5.88 ( <i>d</i> , $J_{8,6} = 2.1$ Hz)                         | 6.88          | 96.16    | 97.05, 103.33,<br>164.83  |
| 9  | -                                                             | -             | (164.83) | -                         |
| 10 | -                                                             | -             | (103.33) | -                         |
| 1' | -                                                             | -             | (131.05) | -                         |
| 2' | 7.29 ( <i>d</i> , $J_{2',3'} = 8.5$ Hz)                       | 6.81          | 129.01   | 80.41, 129.01,<br>158.96  |
| 3' | 6.81 ( <i>d</i> , $J_{3',2'} = 8.5$ Hz)                       | 7.29          | 116.31   | 116.31, 131.05,<br>158.96 |
| 4' | -                                                             | -             | (158.96) | -                         |
| 5' | 6.81 ( <i>d</i> , $J_{5',6'} = 8.5$ Hz)                       | 7.29          | 116.31   | 116.31, 131.05,<br>158.96 |
| 6' | 7.29 ( <i>d</i> , $J_{6',5'} = 8.5$ Hz)                       | 6.81          | 129.01   | 80.41, 129.01,<br>158.96  |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

A<sub>1</sub>(II) (13 mg) was composed by a crude compound identified as benzoic acid (3) (**Table 11.8**).

### Benzoic acid (3)



Benzoic acid (3)

White solid

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 121 [M-H]<sup>-</sup>.

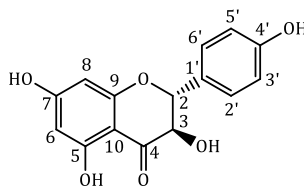
**Retention time:** 21.2 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

**Table 11.8.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound 3.

| <b>Benzoic acid (3) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                         |             |                       |             |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| <b>Position</b>                                   | <b><sup>1</sup>H</b>                                    | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C</b> | <b>HMBC</b> |
| 1                                                 | 8.01 ( <i>dd</i> , $J_{1,5}$ = 1.3; $J_{1,2}$ = 7.5 Hz) | -           | 130.91                | -           |
| 2                                                 | 7.45 ( <i>t</i> , $J_{2,1}$ = $J_{2,3}$ = 7.5 Hz)       | -           | 128.97                | -           |
| 3                                                 | 7.57 ( <i>t</i> , $J_{3,2}$ = $J_{3,4}$ = 7.5 Hz)       | -           | 134.25                | -           |
| 4                                                 | 7.45 ( <i>t</i> , $J_{4,3}$ = $J_{4,5}$ = 7.5 Hz)       | -           | 128.97                | -           |
| 5                                                 | 8.01 ( <i>dd</i> , $J_{5,1}$ = 3.0; $J_{5,4}$ = 7.5 Hz) | -           | 130.91                | -           |
| 6                                                 | -                                                       | -           | 131.58                | -           |
| 7                                                 | -                                                       | -           | 170.01                | -           |

A<sub>1</sub>(III) (16 mg) was composed by a pure compound identified as (+)-aromadendrin (5) (**Table 11.9**).

#### (+)-Aromadendrin (5)



(+)-Aromadendrin (5)

Yellow solid

$[\alpha]_D^{25} +10.6^\circ$  (c 0.5 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 287 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 269 (7), 259 (100), 243 (11).

**Retention time:** 26.1 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

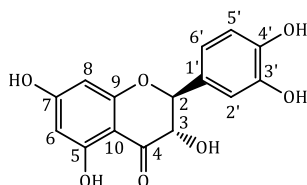
**Table 11.9.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound 5.

| <b>(+)-Aromadendrin (5) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                        |             |                                         |                               |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Position</b>                                       | <b><sup>1</sup>H</b>                   | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                   |
| 2                                                     | 4.97 ( <i>d</i> , $J_{2,3}$ = 11.6 Hz) | 4.53        | 84.96                                   | 73.64, 130.50, 198.49         |
| 3                                                     | 4.53 ( <i>d</i> , $J_{2,3}$ = 11.6 Hz) | 4.97        | 73.64                                   | 84.96, 129.29, 198.49         |
| 4                                                     | -                                      | -           | (198.49)                                | -                             |
| 5                                                     | -                                      | -           | (165.31)                                | -                             |
| 6                                                     | 5.92 ( <i>m</i> )                      | 5.88        | 97.34                                   | 96.29, 101.86, 165.31, 168.69 |
| 7                                                     | -                                      | -           | (168.69)                                | -                             |
| 8                                                     | 5.88 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.0 Hz)  | 5.92        | 96.29                                   | 97.34, 101.86, 164.56 168.69  |
| 9                                                     | -                                      | -           | (164.56)                                | -                             |
| 10                                                    | -                                      | -           | (101.86)                                | -                             |
| 1'                                                    | -                                      | -           | (129.29)                                | -                             |
| 2'                                                    | 7.35 ( <i>d</i> , $J_{2,3}$ = 8.5 Hz)  | 6.83        | 130.50                                  | 84.96, 130.50, 159.21         |
| 3'                                                    | 6.83 ( <i>d</i> , $J_{3,2}$ = 8.5 Hz)  | 7.35        | 116.15                                  | 116.15, 129.29, 159.21        |
| 4'                                                    | -                                      | -           | 159.21                                  | -                             |
| 5'                                                    | 6.83 ( <i>d</i> , $J_{5,6}$ = 8.5 Hz)  | 7.35        | 116.15                                  | 116.15, 129.29, 159.21        |
| 6'                                                    | 7.35 ( <i>d</i> , $J_{6,5}$ = 8.5 Hz)  | 6.83        | 130.50                                  | 84.96, 130.50, 159.21         |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

A<sub>1</sub>(IV) (18 mg) was composed by a pure compound identified as (–)-taxifolin (**4**) (**Table 11.10**).

#### (–)-Taxifolin (**4**)



(–)-Taxifolin (**4**)

Brown solid

$[\alpha]_D^{25}$  –3.4° (*c* 0.7 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$ (negative mode): 303 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$ (negative mode): 286 (17), 285 (100), 177 (15), 125 (15).

**Retention time:** 21.8 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

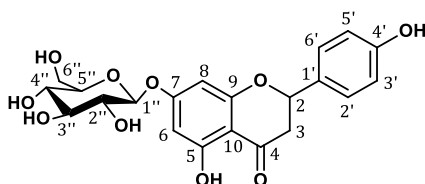
**Table 11.10.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound 4.

| <b>(-)-Taxifolin (4) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                                        |               |                                         |                                       |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Position</b>                                   | <b><sup>1</sup>H</b>                                   | <b>COSY</b>   | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                           |
| 2                                                 | 4.90 ( $d, J_{2,3} = 11.6$ Hz)                         | 4.48          | 85.11                                   | 73.67, 115.89, 120.89, 129.87, 198.40 |
| 3                                                 | 4.48 ( $d, J_{3,2} = 11.6$ Hz)                         | 4.90          | 73.67                                   | 85.11, 129.87, 198.40                 |
| 4                                                 | -                                                      | -             | (198.40)                                | -                                     |
| 5                                                 | -                                                      | -             | (165.30)                                | -                                     |
| 6                                                 | 5.91 ( $d, J_{6,8} = 1.5$ Hz)                          | 5.88          | 97.31                                   | 96.28, 101.85                         |
| 7                                                 | -                                                      | -             | (168.70)                                | -                                     |
| 8                                                 | 5.88 ( $d, J_{8,6} = 1.5$ Hz)                          | 5.91          | 96.28                                   | 97.31, 101.85                         |
| 9                                                 | -                                                      | -             | (164.51)                                | -                                     |
| 10                                                | -                                                      | -             | (101.85)                                | -                                     |
| 1'                                                | -                                                      | -             | (129.87)                                | -                                     |
| 2'                                                | 6.95 ( $d, J_{8,6} = 1.2$ Hz)                          | 6.83          | 116.10 <sup>b</sup>                     | 85.11, 120.89, 147.14                 |
| 3'                                                | -                                                      | -             | (146.31)                                | -                                     |
| 4'                                                | -                                                      | -             | (147.14)                                | -                                     |
| 5'                                                | 6.78 ( $d, J_{3',2'} = 8.1$ Hz)                        | 6.83          | 115.89 <sup>b</sup>                     | 129.87, 146.31                        |
| 6'                                                | 6.83 ( $dd, J_{2',6'} = 1.3;$<br>$J_{2',3'} = 8.1$ Hz) | 6.78,<br>6.95 | 120.89                                  | 85.11, 115.89, 146.31                 |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. <sup>b</sup> These signals may be interchanged.

A<sub>1</sub>(V) (56 mg) was composed by a crude compound identified as naringenin-7-*O*-glucoside (**I**) (**Table 11.11**).



**Naringenin-7-O-glucoside (6)**

Naringenin-7-O-glucoside (6)

Yellow solid

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 433  $[M-H]^-$ .**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 311 (3), 271 (100), 151 (3).**Retention time:** 26.6 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).**Table 11.11.** NMR data in  $CD_3OD$  of compound 6.

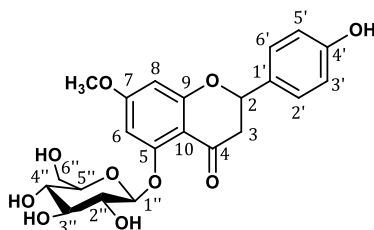
| <b>Naringenin-7-O-glucoside (6) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                             |               |                                              |                          |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Position</b>                                               | <b><math>^1H</math></b>                                     | <b>COSY</b>   | <b><math>^{13}C</math>, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>              |
| 2                                                             | 5.35 ( <i>dd</i> , $J_{2,3a}= 2.8$ ; $J_{2,3b}= 13.0$ Hz)   | 2.74,<br>3.15 | 80.67                                        | 129.10                   |
| 3a                                                            | 2.74 ( <i>dd</i> , $J_{3a,2}= 2.8$ ; $J_{3a,3b}= 17.2$ Hz)  | 5.35,<br>3.15 | 44.13                                        | 198.53                   |
| 3b                                                            | 3.15 ( <i>dd</i> , $J_{3b,2}= 13.0$ ; $J_{3b,3a}= 17.2$ Hz) | 5.35,<br>2.74 | 44.13                                        | 198.53                   |
| 4                                                             | -                                                           | -             | (198.53)                                     | -                        |
| 5                                                             | -                                                           | -             | (164.59)                                     | -                        |
| 6                                                             | 6.18 ( <i>d</i> , $J_{6,8}= 2.2$ Hz)                        | 6.21          | 98.00                                        | 96.91, 104.91,<br>167.01 |
| 7                                                             | -                                                           | -             | (167.01)                                     | -                        |
| 8                                                             | 6.21 ( <i>d</i> , $J_{8,6}= 2.2$ Hz)                        | 6.18          | 96.91                                        | 98.00, 104.91,<br>164.94 |
| 9                                                             | -                                                           | -             | (164.94)                                     | -                        |
| 10                                                            | -                                                           | -             | (104.91)                                     | -                        |
| 1'                                                            | -                                                           | -             | (130.85)                                     | -                        |
| 2'                                                            | 7.30 ( <i>d</i> , $J_{2',3'}= 8.6$ Hz)                      | 6.82          | 129.10                                       | 80.67, 129.10,<br>159.07 |
| 3'                                                            | 6.82 ( <i>d</i> , $J_{3',2'}= 8.6$ Hz)                      | 7.30          | 116.33                                       | 116.33, 129.10           |
| 4'                                                            | -                                                           | -             | (159.07)                                     | -                        |
| 5'                                                            | 6.82 ( <i>d</i> , $J_{5',6'}= 8.6$ Hz)                      | 7.30          | 116.33                                       | 116.33, 129.10           |

|      |                                                                        |      |        |                       |
|------|------------------------------------------------------------------------|------|--------|-----------------------|
| 6'   | 7.30 ( <i>d</i> , $J_{6',5'} = 8.6$ Hz)                                | 6.82 | 129.10 | 80.67, 129.10, 159.07 |
| 1''  | 4.78 ( <i>d</i> , $J_{1'',2''} = 7.4$ Hz)                              | -    | 104.98 | 167.01                |
| 2''  | 3.48-3.71 ( <i>m</i> )                                                 | -    | 74.64  | -                     |
| 3''  | 3.48-3.71 ( <i>m</i> )                                                 | -    | 77.79  | -                     |
| 4''  | 3.48-3.71 ( <i>m</i> )                                                 | -    | 71.14  | -                     |
| 5''  | 3.48-3.71 ( <i>m</i> )                                                 | -    | 78.24  | -                     |
| 6''a | 3.69 ( <i>dd</i> , $J_{6''a,6''b} = 2.9$ Hz; $J_{6''a,5''} = 17.2$ Hz) | -    | 62.33  | -                     |
| 6''b | 3.9 ( <i>dd</i> , $J_{6''b,6''a} = 13.0$ Hz; $J_{6''b,5''} = 17.2$ Hz) | -    | 62.33  | -                     |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

A<sub>1</sub>(VI) (14 mg) was composed by a crude compound identified as sakuranetin-5-*O*-glucoside (**8**) (**Table 11.12**).

#### Sakuranetin-5-*O*-glucoside (**8**)



Sakuranetin-5-*O*-glucoside (**8**)

Yellow solid

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 447 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 432 (32), 294 (9), 286 (15), 285 (100), 269 (25).

**Retention time:** 31.1 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

**Table 11.12.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **8**.

| Sakuranetin-5- <i>O</i> -glucoside ( <b>8</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                            |            |                                    |                |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------|----------------|
| Position                                                       | <sup>1</sup> H                                             | COSY       | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC           |
| 2                                                              | 5.34 ( <i>dd</i> , $J_{2,3} = 2.8$ ; $J_{2,3b} = 13.0$ Hz) | 2.72, 3.01 | 80.37                              | 129.03, 193.18 |

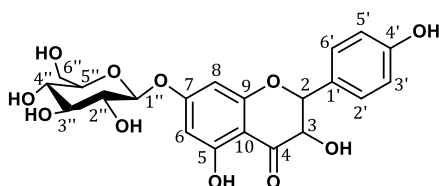
|                    |                                                                     |            |          |                               |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------|------------|----------|-------------------------------|
| 3a                 | 2.72 ( <i>dd</i> , $J_{3a,2} = 2.8$ ; $J_{3a,3b} = 17.3$ Hz)        | 3.01, 5.34 | 46.23    | 193.18                        |
| 3b                 | 3.01 ( <i>dd</i> , $J_{3b,2} = 13.0$ ; $J_{3b,3a} = 17.3$ Hz)       | 2.72, 5.34 | 46.23    | 80.37, 130.85, 193.18         |
| 4                  | -                                                                   | -          | (193.18) | -                             |
| 5                  | -                                                                   | -          | (161.94) | -                             |
| 6                  | 6.59 ( <i>d</i> , $J_{6,8} = 2.3$ Hz)                               | 6.29       | 99.53    | 97.78, 107.87, 161.94, 168.17 |
| 7                  | -                                                                   | -          | (168.17) | -                             |
| 8                  | 6.29 ( <i>d</i> , $J_{8,6} = 2.3$ Hz)                               | 6.59       | 97.78    | 99.53, 107.87, 166.48         |
| 9                  | -                                                                   | -          | (166.48) | -                             |
| 10                 | -                                                                   | -          | (107.87) | -                             |
| 1'                 | -                                                                   | -          | (130.85) | -                             |
| 2'                 | 7.30 ( <i>d</i> , $J_{2',3'} = 8.6$ Hz)                             | 6.80       | 129.03   | 80.37, 129.03, 159.00         |
| 3'                 | 6.81 ( <i>d</i> , $J_{3',2'} = 8.6$ Hz)                             | 7.30       | 116.34   | 116.34, 130.85, 159.00        |
| 4'                 | -                                                                   | -          | 159.00   | -                             |
| 5'                 | 6.81 ( <i>d</i> , $J_{5',6'} = 8.6$ Hz)                             | 7.30       | 116.34   | 116.34, 130.85, 159.00        |
| 6'                 | 7.30 ( <i>d</i> , $J_{6',5'} = 8.6$ Hz)                             | 6.80       | 129.03   | 80.37, 129.03, 159.00         |
| 1''                | 4.79 ( <i>d</i> , $J_{1'',2''} = 7.4$ Hz)                           | -          | 104.98   | 161.94                        |
| 2''                | 3.40-3.60 ( <i>m</i> )                                              | -          | 74.71    | -                             |
| 3''                | 3.40-3.60 ( <i>m</i> )                                              | -          | 78.79    | -                             |
| 4''                | 3.40-3.60 ( <i>m</i> )                                              | -          | 71.44    | -                             |
| 5''                | 3.40-3.60 ( <i>m</i> )                                              | -          | 77.21    | -                             |
| 6''a               | 3.72 ( <i>d</i> , $J_{6''a,5} = 6.0$ Hz; $J_{6''a,6''b} = 12.1$ Hz) | -          | 62.63    | -                             |
| 6''b               | 3.94 ( <i>d</i> , $J_{6''b,5} = 2.1$ Hz; $J_{6''b,6''a} = 12.1$ Hz) | -          | 62.63    | -                             |
| -O-CH <sub>3</sub> | 3.82 ( <i>s</i> )                                                   | -          | 56.42    | 168.17                        |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

A<sub>1</sub>(VII) (76 mg) was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4). The mobile phase consisted of methanol (solvent A) and water (solvent B), both with 0.2% acetic acid. Solutions of samples of 200 mg mL<sup>-1</sup> in methanol were prepared and introduced into the instrument at a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. Separation was carried out using a gradient program that consisted in: linear gradient from 15 to 30% A in 20 minutes, 30% A for 5 minutes; linear gradient from 30 to 70% A in 5 minutes, and other five minutes to return to the initial conditions. A pure

compound (16 mg) was obtained and identified as aromadendrin-7-*O*-glucoside (**2**) (*Table 11.13*).

#### Aromadendrin-7-*O*-glucoside (**2**)



Aromadendrin-7-*O*-glucoside (**2**)

Brown solid

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 433 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 288 (11), 287 (100), 259 (32).

**Retention time:** 13.6 min (*Figure 4.3*, section 4.1.1).

**Table 11.13.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **2**.

| Aromadendrin-7- <i>O</i> -glucoside ( <b>2</b> ) $\delta$ (ppm) |                                         |      |                                    |                                       |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Position                                                        | <sup>1</sup> H                          | COSY | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                                  |
| 2                                                               | 5.02 ( <i>d</i> , $J_{2,3}$ = 11.7 Hz)  | 4.59 | 85.11                              | 73.76, 130.42, 199.37                 |
| 3                                                               | 4.59 ( <i>d</i> , $J_{3,2}$ = 11.7 Hz)  | 5.02 | 73.76                              | 85.11, 129.06, 199.37                 |
| 4                                                               | -                                       | -    | (199.37)                           | -                                     |
| 5                                                               | -                                       | -    | (164.26) <sup>b</sup>              | -                                     |
| 6                                                               | 6.23 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.1 Hz)   | 6.20 | 98.31                              | 97.01, 103.50, 164.26, 164.79, 167.29 |
| 7                                                               | -                                       | -    | (167.29)                           | -                                     |
| 8                                                               | 6.20 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.1 Hz)   | 6.23 | 97.01                              | 98.31, 103.50, 164.26, 164.75, 167.29 |
| 9                                                               | -                                       | -    | (164.75) <sup>b</sup>              | -                                     |
| 10                                                              | -                                       | -    | (103.50)                           | -                                     |
| 1'                                                              | -                                       | -    | (129.03)                           | -                                     |
| 2'                                                              | 7.36 ( <i>d</i> , $J_{2',3'}$ = 8.6 Hz) | 6.83 | 130.42                             | 85.11, 130.42, 159.27                 |
| 3'                                                              | 6.83 ( <i>d</i> , $J_{3',2'}$ = 8.6 Hz) | 7.36 | 116.15                             | 116.15, 129.06                        |
| 4'                                                              | -                                       | -    | (159.27)                           | -                                     |
| 5'                                                              | 6.83 ( <i>d</i> , $J_{5',6'}$ = 8.6 Hz) | 7.36 | 116.15                             | 116.15, 129.06                        |
| 6'                                                              | 7.36 ( <i>d</i> , $J_{6',5'}$ = 8.6 Hz) | 6.83 | 130.42                             | 85.11, 130.42, 159.27                 |

|      |                                                                         |   |        |        |
|------|-------------------------------------------------------------------------|---|--------|--------|
| 1''  | 4.97 ( <i>d</i> , $J_{1'',2''}= 7.2$ Hz)                                | - | 101.28 | 167.29 |
| 2''  | 3.35-3.49 ( <i>m</i> )                                                  | - | 74.61  | -      |
| 3''  | 3.35-3.49 ( <i>m</i> )                                                  | - | 78.23  | -      |
| 4''  | 3.35-3.49 ( <i>m</i> )                                                  | - | 71.12  | -      |
| 5''  | 3.35-3.49 ( <i>m</i> )                                                  | - | 77.76  | -      |
| 6''a | 3.67 ( <i>dd</i> , $J_{6''a,5''}= 5.4$ Hz;<br>$J_{6''a,6''b}= 12.2$ Hz) | - | 62.31  | -      |
| 6''b | 3.87 ( <i>dd</i> , $J_{6''b,5''}= 1.9$ Hz;<br>$J_{6''b,6''a}= 12.2$ Hz) | - | 62.31  | -      |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. <sup>b</sup> These signals may be interchanged.

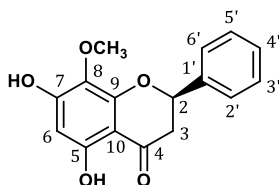
Another aliquot (1.00 g) of EtOAc extract of cherry wood, cultivar 'Starking', was chromatographed by FCPC (Section 10.2.3) using Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:3:2:3, v/v/v/v) as solvent. The aim of this separation was to isolate some apolar compounds from EtOAc extract, not isolated previously. For this reason, only first fractions were collected (34 fractions) in ascending mode. Fractions collected were monitored by TLC (Section 10.2.1) and by HPLC-DAD analysis (Instrument A, section 10.2.4; elution method A, section 11.1.2). Fractions with similar composition were pooled (**Table 11.14**) and evaporated.

**Table 11.14.** Fractionation of EtOAc extract of cherry wood, cultivar 'Starking', by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:2:1:2, v/v/v/v).

| Major fractions     | Fractions | Mass (mg) |
|---------------------|-----------|-----------|
| A <sub>2</sub> (I)  | 6–8       | 110       |
| A <sub>2</sub> (II) | 9–10      | 104       |

A<sub>2</sub>(I) (110 mg) was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4). The mobile phase consisted of methanol (solvent A) and water (solvent B), both with 0.2% acetic acid. Solutions of samples of 200 mg mL<sup>-1</sup> in methanol were prepared and introduced into the instrument at a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. Separation was carried out using isocratic conditions of 51% A for 40 minutes. Two pure compounds were separated and identified as dihydrowogonin (**12**, 18 mg) (**Table 11.15**) and sakuranetin (**14**, 22 mg) (**Table 11.16**).

**(+)-Dihydrowogonin (12)**



**(+)-Dihydrowogonin (12)**

Grey solid

$[\alpha]_D^{25} +20.3^\circ$  (c 0.7 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 285  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 281 (16), 269 (100), 259 (10).

**Retention time:** 45.1 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

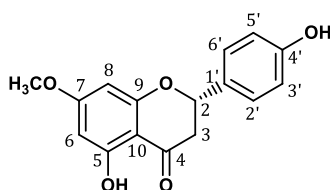
**Table 11.15.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **12**.

| <b>(+)-Dihydrowogonin (12) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                               |             |                                         |                                |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Position</b>                                          | <b><sup>1</sup>H</b>                                          | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                    |
| 2                                                        | 5.49 ( <i>dd</i> , $J_{2,3} = 3.1$ ; 12.7 Hz)                 | 2.80, 3.09  | 80.79                                   | 127.32, 140.32, 197.43         |
| 3a                                                       | 2.80 ( <i>dd</i> , $J_{3a,2} = 3.1$ ; $J_{3a,3b} = 17.1$ Hz)  | 5.49, 3.09  | 44.10                                   | 197.43                         |
| 3b                                                       | 3.09 ( <i>dd</i> , $J_{3b,2} = 12.7$ ; $J_{3b,3a} = 17.2$ Hz) | 5.49, 2.80  | 44.10                                   | 80.78, 140.32, 197.43          |
| 4                                                        | -                                                             | -           | (197.43)                                | -                              |
| 5                                                        | -                                                             | -           | (160.77) <sup>b</sup>                   | -                              |
| 6                                                        | 5.96 ( <i>s</i> )                                             | -           | 97.2                                    | 103.43, 129.95, 160.77, 161.36 |
| 7                                                        | -                                                             | -           | (161.36) <sup>b</sup>                   | -                              |
| 8                                                        | -                                                             | -           | (129.95)                                | -                              |
| 9                                                        | -                                                             | -           | (155.58)                                | -                              |
| 10                                                       | -                                                             | -           | (103.43)                                | -                              |
| 1'                                                       | -                                                             | -           | (140.32)                                | -                              |
| 2'                                                       | 7.51-7.53 ( <i>m</i> )                                        | -           | 127.32                                  | -                              |
| 3'                                                       | 7.35-7.44 ( <i>m</i> )                                        | -           | 129.75                                  | -                              |

|                   |               |   |        |        |
|-------------------|---------------|---|--------|--------|
| 4'                | 7.35-7.44 (m) | - | 129.69 | -      |
| 5'                | 7.35-7.44 (m) | - | 129.75 | -      |
| 6'                | 7.51-7.53 (m) | - | 127.32 | -      |
| O-CH <sub>3</sub> | 3.74 (s)      | - | 61.50  | 129.95 |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbon. <sup>b</sup> These signal may be interchanged.

### Sakuranetin (14)



Sakuranetin (**14**)

Brown solid

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 285 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 270 (11), 165 (100), 119 (7), 93 (10).

**Retention time:** 47.1 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

**Table 11.16.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **14**.

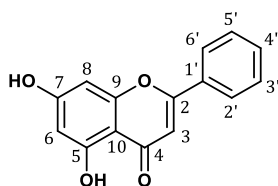
| Sakuranetin ( <b>14</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                              |            |                                    |                                      |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Position                                 | <sup>1</sup> H                                               | COSY       | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                                 |
| 2                                        | 5.32 ( <i>dd</i> , $J_{2,3}$ = 2.8; 13.0 Hz)                 | 2.69, 3.10 | 80.55                              | 129.05, 198.16                       |
| 3a                                       | 2.69 ( <i>dd</i> , $J_{3a,2}$ = 2.8; $J_{3a,3b}$ = 17.1 Hz)  | 3.10, 5.32 | 44.01                              | 198.16                               |
| 3b                                       | 3.10 ( <i>dd</i> , $J_{3b,2}$ = 13.0; $J_{3b,3a}$ = 17.1 Hz) | -          | 44.01                              | 80.55, 130.92, 198.16                |
| 4                                        | -                                                            | -          | (198.16)                           | -                                    |
| 5                                        | -                                                            | -          | (165.24) <sup>b</sup>              | -                                    |
| 6                                        | 5.01 ( <i>brs</i> )                                          | 5.01       | 95.77 <sup>c</sup>                 | 94.93, 95.77, 164.67, 165.24, 169.48 |
| 7                                        | -                                                            | -          | (169.48)                           | -                                    |
| 8                                        | 5.01 ( <i>brs</i> )                                          | 5.01       | 94.93 <sup>c</sup>                 | 94.93, 95.77, 164.67, 165.24, 169.48 |

|                   |                                        |      |                       |                        |
|-------------------|----------------------------------------|------|-----------------------|------------------------|
| 9                 | -                                      | -    | (164.67) <sup>b</sup> | -                      |
| 10                | -                                      | -    | (104.06)              | -                      |
| 1'                | -                                      | -    | (130.92)              | -                      |
| 2'                | 7.29 ( <i>d</i> , $J_{2',3'}= 8.5$ Hz) | 6.81 | 129.05                | 80.55, 129.05, 159.04  |
| 3'                | 6.81 ( <i>d</i> , $J_{3',2'}= 8.5$ Hz) | 7.29 | 116.34                | 116.34, 130.92, 159.04 |
| 4'                | -                                      | -    | (159.04)              | -                      |
| 5'                | 6.81 ( <i>d</i> , $J_{5',6'}= 8.5$ Hz) | 7.29 | 116.34                | 116.34, 130.92, 159.04 |
| 6'                | 7.29 ( <i>d</i> , $J_{6',5'}= 8.5$ Hz) | 6.81 | 129.05                | 80.55, 129.05, 159.04  |
| O-CH <sub>3</sub> | 3.78 (s)                               | -    | 56.23                 | 169.48                 |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. <sup>b,c</sup> These signals may be interchanged.

A<sub>2</sub>(II) was fractionated by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 3:1:3:1, v/v/v/v) (Section 10.2.3) and 7 fractions were collected in ascending mode. Fractions were checked by TLC (Section 10.2.1). Fractions 3 and 4 were pooled (A<sub>2</sub>(II)-B, 55 mg), evaporated and chromatographed again by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 2:1:2:1, v/v/v/v) (Section 10.2.3). Eight fractions were collected in ascending mode and evaluated by TLC (Section 10.2.1). Fraction A<sub>2</sub>(II)-B(I) (25 mg) was composed mainly by a compound identified as chrysin (**16**) (*Table 11.17*).

### Chrysin (**16**)



Chrysin (**16**)

Brown solid

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 253 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 211 (11), 207 (13), 185 (100).

**Retention time:** 53.8 min (*Figure 4.3*, section 4.1.1).



**Table 11.17.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD + CDCl<sub>3</sub> of compound **16**.

| Chrysin ( <b>16</b> ) $\delta$ (ppm) |                |      |                     |      |
|--------------------------------------|----------------|------|---------------------|------|
| Position                             | <sup>1</sup> H | COSY | <sup>13</sup> C     | HMBC |
| 2                                    | -              | -    | 164.13 <sup>a</sup> | -    |
| 3                                    | 6.59 (s)       | -    | 105.50              | -    |
| 4                                    | -              | -    | 182.59              | -    |
| 5                                    | -              | -    | 158.15              | -    |
| 6                                    | 6.23 (brs)     | -    | 99.46 <sup>b</sup>  | -    |
| 7                                    | -              | -    | 164.33 <sup>a</sup> | -    |
| 8                                    | 6.40 (brs)     | -    | 94.50 <sup>b</sup>  | -    |
| 9                                    | -              | -    | 161.72              | -    |
| 10                                   | -              | -    | 104.88              | -    |
| 1'                                   | -              | -    | 131.34              | -    |
| 2'                                   | 7.82-7.84 (m)  | -    | 126.35              | -    |
| 3'                                   | 7.45-7.49 (m)  | -    | 129.09              | -    |
| 4'                                   | 7.45-7.49 (m)  | -    | 131.86              | -    |
| 5'                                   | 7.45-7.49 (m)  | -    | 129.09              | -    |
| 6'                                   | 7.82-7.84 (m)  | -    | 126.35              | -    |

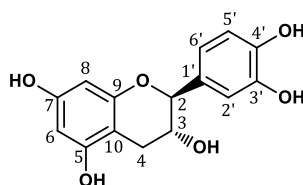
<sup>a,c</sup> These signals may be interchanged.

Finally, one more aliquot (1.8 g) of EtOAc extract of cherry wood, cultivar 'Starking', was chromatographed by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 2:1:2:1, v/v/v/v) (Section 10.2.3). Forty-eight fractions were collected in ascending mode and monitored by TLC (Section 10.2.1) and HPLC–DAD (Instrument A, section 10.2.4; elution method A, section 11.1.2). Fractions from 19 to 45 (A<sub>3</sub>, 340.2 mg) were pooled and evaporated.

A<sub>3</sub> (340.2 mg) was chromatographed by open column chromatography (Section 10.2.2) on 50 g of silica gel 60 (0.040–0.063 mm). A DCM:EtOH mixture of increasing polarity, from 95:5 (v/v) to 90:10 (v/v), was used. Forty-nine fractions of 12 mL each were collected and monitored by TLC (Section 10.2.1). Fractions from 13 to 15 (A<sub>3</sub>-B, 66.3 mg) were pooled and evaporated.

A<sub>3</sub>-B (66 mg) was a pure compound identified as (–)-catechin (**1**) (Table 11.18).

#### (–)-Catechin (**1**)



(-)-Catechin (**1**)

White solid

$[\alpha]_D^{25} -3.4^\circ$  (c 0.9 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 289  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 246 (16), 245 (100), 205 (26), 203 (21), 179 (20).

**Retention time:** 53.8 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

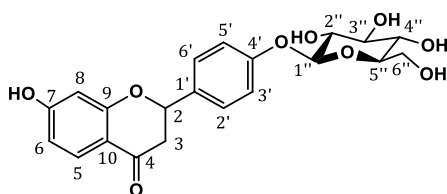
**Table 11.18.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **1**.

| (-)-Catechin ( <b>1</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                             |      |                 |      |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------|-----------------|------|
| Position                                 | <sup>1</sup> H                                              | COSY | <sup>13</sup> C | HMBC |
| 2                                        | 4.57 ( <i>d</i> , $J_{2,3}$ = 7.5 Hz)                       | -    | 82.84           | -    |
| 3                                        | 3.95-4.01 ( <i>m</i> )                                      | -    | 68.81           | -    |
| 4a                                       | 2.51 ( <i>dd</i> , $J_{4a,3}$ = 8.1, $J_{4a,4b}$ = 16.2 Hz) | -    | 28.50           | -    |
| 4b                                       | 2.85 ( <i>dd</i> , $J_{4b,3}$ = 5.4, $J_{4b,4a}$ = 16.2 Hz) | -    | 28.50           | -    |
| 5                                        | -                                                           | -    | 157.83          | -    |
| 6                                        | 5.93 ( <i>brs</i> )                                         | -    | 96.28           | -    |
| 7                                        | -                                                           | -    | 157.58          | -    |
| 8                                        | 5.86 ( <i>brs</i> )                                         | -    | 95.50           | -    |
| 9                                        | -                                                           | -    | 156.91          | -    |
| 10                                       | -                                                           | -    | 100.81          | -    |
| 1'                                       | -                                                           | -    | 132.20          | -    |
| 2'                                       | 6.84 ( <i>brs</i> )                                         | -    | 115.24          | -    |
| 3'                                       | -                                                           | -    | 146.23          | -    |
| 4'                                       | -                                                           | -    | 146.23          | -    |
| 5'                                       | 6.77 ( <i>brd</i> , $J_{5',6'}$ = 8.2 Hz)                   | -    | 116.08          | -    |
| 6'                                       | 6.72 ( <i>brd</i> , $J_{6',5'}$ = 8.2 Hz)                   | -    | 120.04          | -    |

### 11.1.5 Tentatively identification of flavonoids in cherry wood ethyl acetate extract, cultivar 'Starking', by HPLC-DAD/ESI-MS

Furthermore, three compounds were tentatively identified in EtOAc extract by HPLC-DAD/ESI-MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4) according to the experimental procedure described in section 10.1.3.

#### Liquiritin (9)



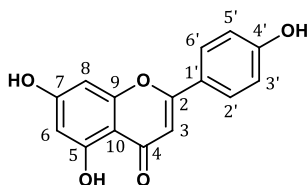
Liquiritin (9)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 289  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 279 (16), 256 (2), 255 (100).

**Retention time:** 35.6 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

#### Apigenin (11)



Apigenin (11)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 269  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 177 (62), 151 (100), 125 (18), 119 (10), 107 (11), 93 (14).

**Retention time:** 41.4 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

#### **Pinocembrin isomer (13)**

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 255 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 235 (12), 213 (64), 212 (18), 211 (100), 151 (10), 145 (27).

**Retention time:** 41.4 min (**Figure 4.3**, section 4.1.1).

#### **11.1.6 Quantification of identified flavonoids in ethyl acetate extracts of cherry tree woods by HPLC-DAD**

Identified phenolic compounds (**1**, **2** and **4–17**) (Section 11.1.4 and section 11.1.5) were quantified in ethyl acetate extracts of cherry tree woods, cultivars ‘Garrafal Napoleon’, ‘Picota’, ‘Burlat’, ‘Starking’, ‘Summit’, ‘Monzón’, and ‘Lapins’. It was achieved making use of an external-standard method, using HPLC peak areas at 280 nm, and following the elution method A (Section 11.1.2) for compounds **1**, **3**, **4**, **7–17**. Quantification of peaks **5** and **6** was achieved using elution method B. In this case, the best separation was carried out using MeCN (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of acetic acid, v/v, at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. The gradient program consisted in a linear gradient from 15 to 15% A in 70 min; a linear gradient from 15 to 60% A in 10 min; and other 5 min to return to initial conditions. Concentrations were calculated as stated above.

Solutions (0.1-1 mg mL<sup>-1</sup> in methanol) of (–)-catechin, previously isolated (Section 11.1.4), and commercial standards of (+)-taxifolin, eriodictiol and apigenin were used to build calibration curves (**Table 11.19**). The concentration of target compounds in the EtOAc extract was determined comparing the HPLC peak area at

280 nm of each component with the calibration curve of the compound (from the same flavonoid group).

**Table 11.19.** Calibration curves for quantification work on cherry woods.

| Compound      | Calibration curve                           |
|---------------|---------------------------------------------|
| (-)-Catechin  | $y = 9000000x - 129376$ ( $r^2 = 0.9934$ )  |
| (+)-Taxifolin | $y = 30000000x - 749964$ ( $r^2 = 0.9957$ ) |
| Eriodyctiol   | $y = 40000000x - 882321$ ( $r^2 = 0.9939$ ) |
| Apigenin      | $y = 20000000x - 551134$ ( $r^2 = 0.9996$ ) |

Samples of cherry wood EtOAc extracts were prepared in MeOH at a concentration of 5 mg/mL, and 5  $\mu$ L of each one was injected on HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Concentrations were calculated as stated above.

## 11.2 Study of the pruning woody of European plum tree (*Prunus domestica* L.)

### 11.2.1 Collection and extraction of European plum pruning wood

Samples of wood from pruning several European plum trees of the cultivars ‘De la Rosa’, ‘Reina Claudia Verde’, ‘Claudia de Tolosa’, and ‘Standley’ were collected in two farming plots located in Jaraíz de la Vera, province of Cáceres, Spain, in November 2015 (**Table 11.20**). They consisted of ten pieces of wood of 0.8–1.4 cm diameter and 60 cm length without leaves. Plant material was stored in a dry and dark place at room temperature with passive ventilation until extraction. Just before starting the extraction process, a wood piece (approx. 1.0 cm diameter) was ground.

**Table 11.20.** Collection and processing of pruning woods of European plum tree.

| Reference     | Cultivar            | Location <sup>a</sup>          | Collection date | Extraction date |
|---------------|---------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| Pd-CC-1a(RCV) | Reina Claudia Verde | Jaraíz de la Vera <sup>b</sup> | 25/11/2015      | 15/12/2015      |
| Pd-CC-2a(CT)  | Claudia de Tolosa   | Jaraíz de la Vera <sup>b</sup> | 25/11/2015      | 15/12/2015      |
| Pd-CC-3a      | Standley            | Jaraíz de la Vera <sup>b</sup> | 25/11/2015      | 17/12/2015      |
| Pd-CC-4a      | De la Rosa          | Jaraíz de la Vera <sup>b</sup> | 25/11/2015      | 17/12/2015      |
| Pd-CC-5a(RCV) | Reina Claudia Verde | Jaraíz de la Vera <sup>c</sup> | 25/11/2015      | 16/12/2015      |
| Pd-CC-6a(CT)  | Claudia de Tolosa   | Jaraíz de la Vera <sup>c</sup> | 25/11/2015      | 16/12/2015      |

<sup>a</sup>Province of Cáceres; <sup>b</sup>Farming plot 1; <sup>c</sup>Farming plot 2.

The wood samples (**Table 11.20**) were extracted using extraction procedure A (Section 11.1.1). In addition, a sample of shaving wood (52 g) of European plum tree, cultivar 'De la Rosa' was extracted followed the same procedure yielding 1.60 g of EtOAc extract. Dry extracts were storage at -20 °C until analysis.

### **11.2.2 HPLC–DAD analyses of European plum wood extracts**

European plum EtOAc extracts were analysed by HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Samples were dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>-1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Optimal method (Elution method C) was achieved using acetonitrile (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of acetic acid v/v, at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. Separation was carried out using a gradient method: linear gradient from 5 to 20% A in 40 minutes; linear gradient from 20 to 25% A in 5 minutes; linear gradient from 25 to 40% in 15 minutes and other 2 minutes to return to the initial conditions.

### **11.2.3 HPLC–DAD/ESI–MS analysis of European plum wood extract, cultivar ‘De la Rosa’**

The AcOEt extract obtained from cultivar ‘De la Rosa’ was analysed by HPLC–DAD/ESI–MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4). The separation was carried out using acetonitrile (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of formic acid v/v, at a flow rate of 0.25 mL/min. The gradient programme consist in a linear gradient from 5 to 20% A in 22.5 min, a linear gradient from 20 to 25% A in 5 min, a linear gradient from 25 to 40% A in 5 min and other 1.0 min to return to initial conditions. Mass spectrometric operation parameters were described in section 11.1.3.

### **11.2.4 Chromatographic fractionation of European plum wood extract and isolation of flavonoids and proanthocyanidins**

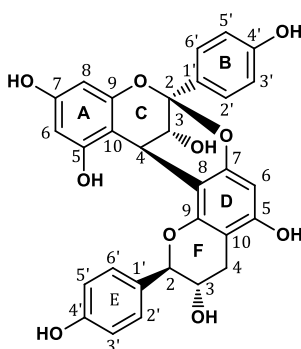
1.6 g of European plum tree, cultivar ‘De la Rosa’, was chromatographed by FCPC (Section 10.2.3). Solvent system was optimized and a mixture composed by Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:2:1:2, v/v/v/v) was selected to carry out the separation. Eighty-five fractions were collected, 76 in ascending mode and the rest in descending mode. They were monitored by TLC (Section 10.2.1) and HPLC–DAD (Instrument A, section 10.2.4; elution method C, section 11.2.2). Fractions with similar composition were pooled and evaporated (**Table 11.21**).

**Table 11.21.** Fractionation of EtOAc extract of European plum wood, cultivar ‘De la Rosa’, by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:2:1:2, v/v/v/v).

| Major fractions | Fractions | Mass (mg) |
|-----------------|-----------|-----------|
| B <sub>1</sub>  | 18        | 10        |
| B <sub>2</sub>  | 19–20     | 22        |
| B <sub>3</sub>  | 21        | 10        |
| B <sub>4</sub>  | 27–35     | 95        |
| B <sub>5</sub>  | 37–54     | 155       |
| B <sub>6</sub>  | 55–70     | 161       |
| B <sub>7</sub>  | 71–74     | 19        |

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> were composed by a mixture of compounds **25** and **26**. B<sub>1</sub> was composed mainly by a compound identified as (+)-epiafzelechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-afzelechin (**25**) (**Table 11.22**), while B<sub>3</sub> by a compounds identified as (-)-*ent*-epiafzelechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epiafzelechin (**26**) (**Table 11.23**).

**(+)-Epiafzelechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-afzelechin (**25**)**



**(+)-Epiafzelechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-afzelechin (**25**)**

Brown solid

$[\alpha]_D^{25} +22.2^\circ$  (c 0.5 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 543 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 507 (10), 417 (35), 391 (30), 274 (13), 273 (100), 269 (49).

**Retention time:** 43.2 min (**Figure 4.11**, section 4.2.1).

**Table 11.22.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **25**.

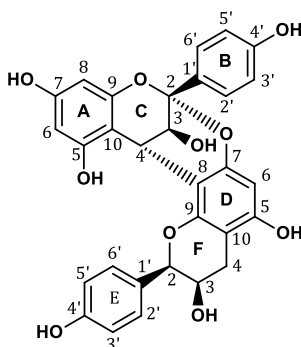
| <b>(+)-Epiafzelechin-(2<math>\beta</math>→O→7,4<math>\beta</math>→8)-afzelechin (<b>25</b>) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                     |             |                                         |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                           | <b><sup>1</sup>H</b>                                | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                      |
| 2 (C)                                                                                                                     | -                                                   | -           | (100.55)                                | -                                |
| 3 (C)                                                                                                                     | 4.12 ( <i>d</i> , <i>J</i> <sub>3,4</sub> = 3.7 Hz) | 4.23        | 67.66                                   | 100.55                           |
| 4 (C)                                                                                                                     | 4.23 ( <i>d</i> , <i>J</i> <sub>4,3</sub> = 3.7 Hz) | 4.12        | 29.29                                   | 67.66, 100.55,<br>104.01, 156.15 |



|                |                                                                                 |                     |          |                                            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------|--------------------------------------------|
| 5 (A)          | -                                                                               | -                   | (156.15) | -                                          |
| 6 (A)          | 5.92 ( <i>d</i> , $J_{6,8} = 2.4$ Hz)                                           | 6.05                | 98.14    | 96.59, 104.01,<br>156.15, 158.19           |
| 7 (A)          | -                                                                               | -                   | (158.19) | -                                          |
| 8(A)           | 6.05 ( <i>d</i> , $J_{8,6} = 2.4$ Hz)                                           | 5.92                | 96.59    | 98.14, 104.01,<br>154.11, 158.19           |
| 9 (A)          | -                                                                               | -                   | (154.11) | -                                          |
| 10 (A)         | -                                                                               | -                   | (104.01) | -                                          |
| 1' (B)         | -                                                                               | -                   | (131.23) | -                                          |
| 2' (B)         | 7.49-7.52 ( <i>m</i> )                                                          | 6.82                | 129.97   | 100.55, 131.23,<br>158.90                  |
| 3' (B)         | 6.81-6.84 ( <i>m</i> )                                                          | 7.50                | 116.35   | 131.23, 158.90                             |
| 4' (B)         | -                                                                               | -                   | (158.90) | -                                          |
| 5' (B)         | 6.81-6.84 ( <i>m</i> )                                                          | 7.50                | 116.35   | 131.23, 158.90                             |
| 6' (B)         | 7.49-7.52 ( <i>m</i> )                                                          | 6.82                | 129.97   | 100.55, 131.23,<br>158.90                  |
| 2 (F)          | 4.76 ( <i>d</i> , $J_{2,3} = 8.3$ Hz)                                           | 4.08                | 83.89    | 29.29, 68.38,<br>115.53, 129.53,<br>131.66 |
| 3 (F)          | 4.05-4.11 ( <i>m</i> )                                                          | 2.98, 2.55,<br>4.76 | 68.38    | 102.97, 131.66                             |
| 4 $\alpha$ (F) | 2.55 ( <i>dd</i> , $J_{4\alpha,3} = 9.2$ Hz;<br>$J_{4\alpha,4\beta} = 16.3$ Hz) | 2.98, 4.08          | 29.29    | 83.89, 102.97                              |
| 4 $\beta$ (F)  | 2.98 ( <i>dd</i> , $J_{4\beta,3} = 5.5$ Hz;<br>$J_{4\beta,4\alpha} = 16.3$ Hz)  | 2.54, 4.05          | 29.29    | 83.89, 102.97                              |
| 5 (D)          | -                                                                               | -                   | (156.71) | -                                          |
| 6 (D)          | 6.08 ( <i>s</i> )                                                               | -                   | 96.59    | 102.97, 106.62,<br>152.26, 156.71          |
| 7 (D)          | -                                                                               | -                   | (152.26) | -                                          |
| 8 (D)          | -                                                                               | -                   | (106.62) | -                                          |
| 9 (D)          | -                                                                               | -                   | (150.96) | -                                          |
| 10 (D)         | -                                                                               | -                   | (102.97) | -                                          |
| 1' (E)         | -                                                                               | -                   | (131.66) | -                                          |
| 2' (E)         | 7.35-7.38 ( <i>m</i> )                                                          | 6.82                | 129.53   | 83.89, 129.53,<br>158.94                   |
| 3' (E)         | 6.86-6.88 ( <i>m</i> )                                                          | 7.36                | 115.53   | 115.53, 131.66                             |
| 4' (E)         | -                                                                               | -                   | (158.94) | -                                          |
| 5' (E)         | 6.86-6.88 ( <i>m</i> )                                                          | 7.36                | 115.53   | 115.53, 131.66                             |
| 6' (E)         | 7.35-7.38 ( <i>m</i> )                                                          | 6.82                | 129.53   | 83.89, 129.53,<br>158.94                   |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

**(-)-ent-Epiafzelechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epiafzelechin (26)**



**(-)-ent-Epiafzelechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epiafzelechin (26)**

Brown solid

$[\alpha]_D^{25}$  -55.5° (c 0.6 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 543  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 507 (15), 481 (13), 417 (36), 391 (18), 274 (14),  
273 (100), 269 (40).

**Retention time:** 43.2 min (**Figure 4.11**, section 4.2.1).

**Table 11.23.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound 26.

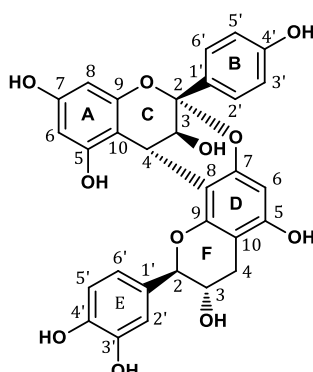
| <b>(-)-ent-Epiafzelechin-(2<math>\alpha</math>→O→7,4<math>\alpha</math>→8)-epiafzelechin (26) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                       |             |                                         |                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                             | <b><sup>1</sup>H</b>                  | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                   |
| 2 (C)                                                                                                                       | -                                     | -           | (100.56)                                | -                             |
| 3 (C)                                                                                                                       | 4.15 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.5 Hz) | 4.40        | 67.08                                   | 104.08                        |
| 4 (C)                                                                                                                       | 4.40 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.5 Hz) | 4.15        | 29.33                                   | 67.08                         |
| 5 (A)                                                                                                                       | -                                     | -           | (156.71)*                               | -                             |
| 6 (A)                                                                                                                       | 5.87 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.3 Hz) | 6.06        | 97.98                                   | 96.56                         |
| 7 (A)                                                                                                                       | -                                     | -           | (158.37)                                | -                             |
| 8(A)                                                                                                                        | 6.06 ( <i>m</i> )                     | 5.87        | 96.56                                   | 97.98, 104.08, 156.71, 158.37 |
| 9 (A)                                                                                                                       | -                                     | -           | (154.18)                                | -                             |
| 10 (A)                                                                                                                      | -                                     | -           | (104.08)                                | -                             |

|        |                                   |                    |           |                                         |
|--------|-----------------------------------|--------------------|-----------|-----------------------------------------|
| 1' (B) | -                                 | -                  | (131.78)  | -                                       |
| 2' (B) | 7.51 ( $d, J_{2',3'}=$<br>8.9 Hz) | 6.82-6.88,<br>7.51 | 129.52    | 100.56, 129.52, 158.92                  |
| 3' (B) | 6.82-6.88 ( $m$ )                 | 7.51               | 116.08    | 131.78, 158.92                          |
| 4' (B) | -                                 | -                  | (158.92)  | -                                       |
| 5' (B) | 6.82-6.88 ( $m$ )                 | 7.51               | 116.08    | 131.78, 158.92                          |
| 6' (B) | 7.51 ( $d, J_{2',3'}=$<br>8.9 Hz) | 6.82-6.88,<br>7.51 | 129.52    | 100.56, 129.52, 158.92                  |
| 2 (F)  | 5.07 ( $s$ )                      | 4.23               | 80.91     | 29.59, 67.75, 115.54,<br>129.23, 130.78 |
| 3 (F)  | 4.23-4.25 ( $m$ )                 | 2.87-2.91,<br>5.07 | 67.75     | 101.93, 130.78                          |
| 4 (F)  | 2.87-2.91 ( $m$ )                 | 4.23, 5.07         | 29.59     | 80.91, 101.93                           |
| 5 (D)  | -                                 | -                  | (156.79)* | -                                       |
| 6 (D)  | 6.08 ( $s$ )                      | -                  | 96.59     | 101.93, 107.00, 152.12,<br>156.79       |
| 7 (D)  | -                                 | -                  | (152.12)  | -                                       |
| 8 (D)  | -                                 | -                  | (107.00)  | -                                       |
| 9 (D)  | -                                 | -                  | (151.39)  | -                                       |
| 10 (D) | -                                 | -                  | (101.93)  | -                                       |
| 1' (E) | -                                 | -                  | (130.78)  | -                                       |
| 2' (E) | 7.48 ( $d, J_{2',6'}=$<br>8.5 Hz) | 6.86-6.89          | 129.23    | 80.91, 129.23, 158.92                   |
| 3' (E) | 6.86-6.89 ( $m$ )                 | 7.48               | 115.54    | 115.54, 130.78                          |
| 4' (E) | -                                 | -                  | (158.92)  | -                                       |
| 5' (E) | 6.86-6.89 ( $m$ )                 | 7.48               | 115.54    | 115.54, 130.78                          |
| 6' (E) | 7.48 ( $d, J_{2',6'}=$<br>8.5 Hz) | 6.86-6.89          | 129.23    | 80.91, 129.23, 158.92                   |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. \*These signals may be interchanged.

B<sub>4</sub> (95 mg) was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4), using as mobile phase a mixture of MeCN:AcOH (99.8:0.2, v/v) (Solvent A) and H<sub>2</sub>O:AcOH (99.8:0.2, v/v) (Solvent B) at a flow rate of 5.0 mL/min. The separation was carried out with a gradient method: linear gradient from 10 to 14% A in 50 minutes and other 5 minutes to return to the initial conditions. Two pure compounds were obtained and identified as (-)-*ent*-epiafzelechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin (**23**, 11 mg) (**Table 11.24**) and (+)-epiafzelechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin (**24**, 15 mg) (**Table 11.25**).

**(-)-ent-Epiafzelechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin (23)**



(-)-ent-Epiafzelechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin (23)

Brown solid

$[\alpha]_D^{25}$  -9.6 ° (c 0.8 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 559 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 523 (20), 434 (36), 433 (87), 407 (41), 313 (13), 291 (11), 289 (100), 269 (20).

**Retention time:** 37.5 min (**Figure 4.11**, section 4.2.1).

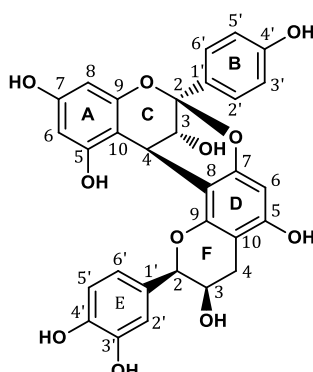
**Table 11.24.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound 23.

| <b>(-)-ent-Epiafzelechin-(2<math>\alpha</math>→O→7,4<math>\alpha</math>→8)-catechin (23) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                       |             |                                         |                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                        | <b><sup>1</sup>H</b>                  | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                   |
| 2 (C)                                                                                                                  | -                                     | -           | (100.55)                                | -                             |
| 3 (C)                                                                                                                  | 4.13 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.5 Hz) | 4.25        | 67.63                                   | 104.04                        |
| 4 (C)                                                                                                                  | 4.25 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.5 Hz) | 4.13        | 29.28                                   | 67.63, 100.55, 104.04, 154.11 |
| 5 (A)                                                                                                                  | -                                     | -           | (156.67)                                | -                             |
| 6 (A)                                                                                                                  | 5.93 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.3 Hz) | 6.05        | 98.20                                   | 96.62, 104.04, 156.67, 158.17 |
| 7 (A)                                                                                                                  | -                                     | -           | (158.17)                                | -                             |
| 8(A)                                                                                                                   | 6.05 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.3 Hz) | 5.93        | 96.62                                   | 98.20, 104.04, 154.11, 158.17 |
| 9 (A)                                                                                                                  | -                                     | -           | (154.11)                                | -                             |
| 10 (A)                                                                                                                 | -                                     | -           | (104.04)                                | -                             |
| 1' (B)                                                                                                                 | -                                     | -           | (131.64)                                | -                             |

|                |                                                                     |                  |          |                                      |
|----------------|---------------------------------------------------------------------|------------------|----------|--------------------------------------|
| 2' (B)         | 7.49-7.53 (m)                                                       | 6.83             | 129.53   | 100.55, 129.53, 158.93               |
| 3' (B)         | 6.82-6.86 (m)                                                       | 7.50             | (115.54) | -                                    |
| 4' (B)         | -                                                                   | -                | (158.93) | -                                    |
| 5' (B)         | 6.82-6.86 (m)                                                       | 7.50             | 115.54   | 132.24, 146.76                       |
| 6' (B)         | 7.49-7.53 (m)                                                       | 6.83             | 129.53   | 100.55, 129.53, 158.93               |
| 2 (F)          | 4.74 (d, $J_{2,3}$ = 8.1 Hz)                                        | 4.06             | 83.90    | 28.82, 68.38, 115.45, 120.34, 130.96 |
| 3 (F)          | 4.04-4.09 (m)                                                       | 2.94, 2.54, 4.74 | 68.38    | 102.86, 130.96                       |
| 4 $\alpha$ (F) | 2.54 (dd, $J_{4\alpha,3}$ = 8.6 Hz; $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16.2 Hz) | 2.94, 4.06       | 28.82    | 83.90, 102.83                        |
| 4 $\beta$ (F)  | 2.94 (dd, $J_{4\beta,3}$ = 5.5 Hz; $J_{4\beta,4\alpha}$ = 16.2 Hz)  | 2.54, 4.06       | 28.82    | 83.90, 102.83                        |
| 5 (D)          | -                                                                   | -                | (156.16) | -                                    |
| 6 (D)          | 6.08 (s)                                                            | -                | 96.57    | 102.86, 106.59, 152.22, 156.16       |
| 7 (D)          | -                                                                   | -                | (152.22) | -                                    |
| 8 (D)          | -                                                                   | -                | (106.59) | -                                    |
| 9 (D)          | -                                                                   | -                | (150.86) | -                                    |
| 10 (D)         | -                                                                   | -                | (102.86) | -                                    |
| 1' (E)         | -                                                                   | -                | (130.96) | -                                    |
| 2' (E)         | 6.96 (d, $J_{2',6'}$ = 1.2 Hz)                                      | 6.86             | 115.45   | 83.90, 120.34, 146.75                |
| 3' (E)         | -                                                                   | -                | (146.75) | -                                    |
| 4' (E)         | -                                                                   | -                | (146.41) | -                                    |
| 5' (E)         | 6.82-6.86 (m)                                                       | 6.86             | 116.37   | 146.75                               |
| 6' (E)         | 6.82-6.86 (m)                                                       | 6.82, 6.96       | 120.34   | 115.45, 146.41                       |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

**(+)-Epiafzelechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin (24)**



**(+)-Epiafzelechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin (24)**

Brown solid

$[\alpha]_D^{25} +10.7^\circ$  (c 0.8 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 559 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 523 (25), 434 (24), 433(100), 407 (22), 290 (13), 289 (95), 269 (19), 245 (20).

**Retention time:** 39.2 min (**Figure 4.11**, section 4.2.1).

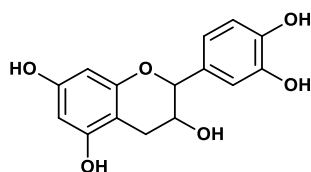
**Table 11.25.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **24**.

| <b>(+)-Epiafzelechin-(2<math>\beta</math>→O→7,4<math>\beta</math>→8)-epicatechin (24) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                       |             |                                         |                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                    | <b><sup>1</sup>H</b>                  | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                   |
| 2 (C)                                                                                                              | -                                     | -           | (100.58)                                | -                             |
| 3 (C)                                                                                                              | 4.17 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.5 Hz) | 4.42        | 67.75                                   | 104.08                        |
| 4 (C)                                                                                                              | 4.42 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.5 Hz) | 4.17        | 29.32                                   | 67.75, 100.58, 104.08, 106.98 |
| 5 (A)                                                                                                              | -                                     | -           | (156.77)                                | -                             |
| 6 (A)                                                                                                              | 5.89 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.4 Hz) | 6.06        | 98.02                                   | 96.58, 104.08, 156.77, 158.17 |
| 7 (A)                                                                                                              | -                                     | -           | (158.17)                                | -                             |
| 8(A)                                                                                                               | 6.06 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.4 Hz) | 5.89        | 96.58                                   | 98.02, 104.08, 154.19, 158.17 |
| 9 (A)                                                                                                              | -                                     | -           | (154.19)                                | -                             |
| 10 (A)                                                                                                             | -                                     | -           | (104.08)                                | -                             |

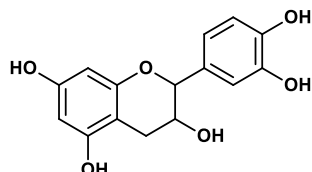
|                |                                                                         |            |          |                                |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|------------|----------|--------------------------------|
| 1' (B)         | -                                                                       | -          | (131.77) | -                              |
| 2' (B)         | 7.51 ( $d, J_{2',3'} = 8.8$ Hz)                                         | 6.83       | 129.53   | 100.58, 129.53, 131.77, 158.95 |
| 3' (B)         | 6.84 ( $d, J_{3',2'} = 8.8$ Hz)                                         | 7.51       | 115.54   | 115.54, 131.77, 158.95         |
| 4' (B)         | -                                                                       | -          | (158.95) | -                              |
| 5' (B)         | 6.84 ( $d, J_{5',6'} = 8.8$ Hz)                                         | 7.51       | 115.54   | 115.54, 131.77, 158.95         |
| 6' (B)         | 7.51 ( $d, J_{6',5'} = 8.8$ Hz)                                         | 6.83       | 129.53   | 100.58, 129.53, 131.77, 158.95 |
| 2 (F)          | 5.03 (s)                                                                | -          | 80.88    | 115.54, 119.46, 131.44         |
| 3 (F)          | 4.22-4.25 (m)                                                           | 2.85, 2.89 | 67.16    | 29.47                          |
| 4 $\alpha$ (F) | 2.85 ( $dd, J_{4\alpha,3} = 2.4$ Hz;<br>$J_{4\alpha,4\beta} = 17.1$ Hz) | -          | 29.47    | 101.95                         |
| 4 $\beta$ (F)  | 2.91 ( $dd, J_{4\beta,3} = 4.2$ Hz;<br>$J_{4\beta,4\alpha} = 17.0$ Hz)  | -          | 29.47    | 101.95                         |
| 5 (D)          | -                                                                       | -          | (156.65) | -                              |
| 6 (D)          | 6.09 (s)                                                                | -          | 96.51    | 101.95, 106.98, 152.11, 156.65 |
| 7 (D)          | -                                                                       | -          | (152.11) | -                              |
| 8 (D)          | -                                                                       | -          | (106.98) | -                              |
| 9 (D)          | -                                                                       | -          | (151.32) | -                              |
| 10 (D)         | -                                                                       | -          | (101.95) | -                              |
| 1' (E)         | -                                                                       | -          | (131.44) | -                              |
| 2' (E)         | 7.13 ( $d, J_{2',6'} = 1.9$ Hz)                                         | 6.95       | 115.26   | 80.88, 119.46, 146.25          |
| 3' (E)         | -                                                                       | -          | (146.25) | -                              |
| 4' (E)         | -                                                                       | -          | (146.25) | -                              |
| 5' (E)         | 6.82-6.86 (m)                                                           | 6.95       | 116.20   | 161.44, 146.25                 |
| 6' (E)         | 6.95 ( $dd, J_{6',2'} = 2.0$ Hz;<br>$J_{6',5'} = 8.3$ Hz)               | 6.84, 7.13 | 119.46   | 80.88, 115.26, 146.25          |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

B<sub>5</sub> (155 mg) was composed by a mixture of catechin (**18**) and epicatechin (**19**). Both compounds were identified comparing their retention time in HPLC with commercial standards.



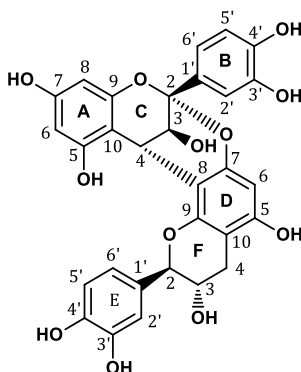
Catechin (**18**)



Epicatechin (**19**)

B<sub>6</sub> (161 mg) was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4), using as mobile phase a mixture of MeCN:AcOH (99.8:0.2, v/v) (Solvent A) and H<sub>2</sub>O: AcOH (99.8:0.2, v/v) (Solvent B) at a flow rate of 5.0 mL/min. The separation was carried out with a gradient method: linear gradient from 10 to 14% A in 50 minutes and other 5 minutes to return to the initial conditions. Two pure compounds were obtained and identified as *ent*-epicatechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin (**21**, 26 mg) (**Table 11.26**) and *ent*-epicatechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epicatechin (**22**, 28 mg) (**Table 11.27**).

**(-)-*ent*-Epicatechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin (**21**)**



(-)-*ent*-Epicatechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin (**21**)

Brown solid

$[\alpha]_D^{25}$  -88.0° (c 0.1 cg/mL, MeOH).



**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 575 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 539 (13), 453 (15), 450 (17), 449 (39), 424 (15), 423 (100), 289 (23), 285 (20).

**Retention time:** 31.7 min (**Figure 4.11**, section 4.2.1).

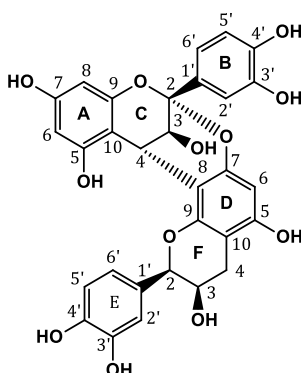
**Table 11.26.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **21**.

| (-)- <i>ent</i> -Epicatechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin ( <b>21</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                                                 |                     |                                    |                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Position                                                                                           | <sup>1</sup> H                                                                  | COSY                | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                              |
| 2 (C)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (100.43)                           | -                                 |
| 3 (C)                                                                                              | 4.12 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.5 Hz)                                           | 4.23                | 67.67                              | 104.06                            |
| 4 (C)                                                                                              | 4.23 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.5 Hz)                                           | 4.12                | 29.25                              | 100.43, 104.06,                   |
| 5 (A)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (156.68)                           | -                                 |
| 6 (A)                                                                                              | 5.92 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.4 Hz)                                           | 6.05                | 98.17                              | 96.61, 104.06                     |
| 7 (A)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (158.18)                           | -                                 |
| 8(A)                                                                                               | 6.05 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.4 Hz)                                           | 5.92                | 96.61                              | 98.17, 104.06                     |
| 9 (A)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (154.11)                           | -                                 |
| 10 (A)                                                                                             | -                                                                               | -                   | (104.06)                           | -                                 |
| 1' (B)                                                                                             | -                                                                               | -                   | (132.24)                           | -                                 |
| 2' (B)                                                                                             | 7.14 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 2.1 Hz)                                         | 7.02                | 115.74*                            | 119.86, 145.67                    |
| 3' (B)                                                                                             | -                                                                               | -                   | (146.76)                           | -                                 |
| 4' (B)                                                                                             | -                                                                               | -                   | (145.67)                           | -                                 |
| 5' (B)                                                                                             | 6.81 ( <i>d</i> , $J_{5',6'}$ = 8.3 Hz)                                         | 7.02                | 115.45*                            | 132.24, 146.76                    |
| 6' (B)                                                                                             | 7.02 ( <i>dd</i> , $J_{6',5'}$ = 8.3 Hz;<br>$J_{6',2'}$ = 2.1 Hz)               | 6.81, 7.14          | 119.86                             | 100.43, 115.74,<br>145.67         |
| 2 (F)                                                                                              | 4.73 ( <i>d</i> , $J_{2,3}$ = 7.8 Hz)                                           | 4.07                | 83.90                              | 28.84, 68.40, 115.45,<br>120.33   |
| 3 (F)                                                                                              | 4.04-4.09 ( <i>m</i> )                                                          | 2.94, 2.54,<br>4.73 | 68.40                              | 102.83, 130.96                    |
| 4 $\alpha$ (F)                                                                                     | 2.54 ( <i>dd</i> , $J_{4\alpha,3}$ = 8.6 Hz;<br>$J_{4\alpha,4\beta}$ = 16.3 Hz) | 2.94, 4.07          | 28.84                              | 83.90, 102.83                     |
| 4 $\beta$ (F)                                                                                      | 2.94 ( <i>dd</i> , $J_{4\beta,3}$ = 5.3 Hz;<br>$J_{4\beta,4\alpha}$ = 16.3 Hz)  | 2.54, 4.07          | 28.84                              | 83.90, 102.83                     |
| 5 (D)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (156.17)                           | -                                 |
| 6 (D)                                                                                              | 6.07 (s)                                                                        | -                   | 96.56                              | 102.83, 106.57,<br>152.23, 156.17 |
| 7 (D)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (152.23)                           | -                                 |
| 8 (D)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (106.57)                           | -                                 |
| 9 (D)                                                                                              | -                                                                               | -                   | (150.85)                           | -                                 |
| 10 (D)                                                                                             | -                                                                               | -                   | (102.83)                           | -                                 |
| 1' (E)                                                                                             | -                                                                               | -                   | (130.96)                           | -                                 |

|        |                                         |      |          |                       |
|--------|-----------------------------------------|------|----------|-----------------------|
| 2' (E) | 6.96 ( <i>d</i> , $J_{2',6'} = 1.5$ Hz) | 6.85 | 116.36   | 68.40, 120.33, 146.43 |
| 3' (E) | -                                       | -    | (146.82) | -                     |
| 4' (E) | -                                       | -    | (146.43) | -                     |
| 5' (E) | 6.84-6.86 ( <i>m</i> )                  | 6.85 | 115.64*  | 146.82                |
| 6' (E) | 6.84-6.86 ( <i>m</i> )                  | 6.85 | 120.33   | 115.45, 146.43        |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. \*These signals may be interchanged.

**(-)-*ent*-Epicatechin-(2 $\alpha$ →*O*→7,4 $\alpha$ →8)-epicatechin (22)**



(-)-*ent*-Epicatechin-(2 $\alpha$ →*O*→7,4 $\alpha$ →8)-epicatechin (22)

Brown solid

$[\alpha]_D^{25} -169.0^\circ$  (*c* 0.1 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 575 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 539 (43), 453 (35), 449 (95), 407 (35), 289 (100),  
287 (26), 285 (42).

**Retention time:** 35.9 min (**Figure 4.11**, section 4.2.1).

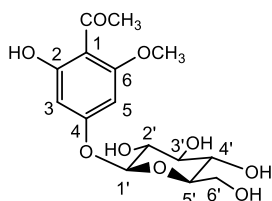
**Table 11.27.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **22**.

| <b>(-)-ent-Epicatechin-(2<math>\alpha</math>→O→7,4<math>\alpha</math>→8)-epicatechin (<b>22</b>) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                                                   |               |                                         |                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                               | <b><sup>1</sup>H</b>                                              | <b>COSY</b>   | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                           |
| 2 (C)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (100.45)                                | -                                     |
| 3 (C)                                                                                                                         | 4.15 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.5 Hz)                             | 4.39          | 67.76                                   | 104.09                                |
| 4 (C)                                                                                                                         | 4.39 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.5 Hz)                             | 4.15          | 29.27                                   | 67.76, 100.45, 104.09, 154.16, 156.73 |
| 5 (A)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (156.73)                                | -                                     |
| 6 (A)                                                                                                                         | 5.88 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.3 Hz)                             | 6.05          | 97.98                                   | 96.56, 104.09, 156.73, 158.14         |
| 7 (A)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (158.14)                                | -                                     |
| 8(A)                                                                                                                          | 6.05 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.3 Hz)                             | 5.88          | 96.56                                   | 97.98, 104.09, 154.16                 |
| 9 (A)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (154.16)                                | -                                     |
| 10 (A)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (104.09)                                | -                                     |
| 1' (B)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (132.34)                                | -                                     |
| 2' (B)                                                                                                                        | 7.14 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 2.1 Hz)                           | 7.02          | 115.64                                  | 100.45, 119.85, 145.68                |
| 3' (B)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (146.23)                                | -                                     |
| 4' (B)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (145.68)                                | -                                     |
| 5' (B)                                                                                                                        | 6.80 ( <i>d</i> , $J_{5',6'}$ = 8.4 Hz)                           | 7.02          | 115.72*                                 | 119.85, 132.34, 146.23                |
| 6' (B)                                                                                                                        | 7.02 ( <i>dd</i> , $J_{6',5'}$ = 8.4 Hz;<br>$J_{6',2'}$ = 2.1 Hz) | 6.80,<br>7.14 | 119.85                                  | 100.45, 115.64, 145.68                |
| 2 (F)                                                                                                                         | 5.01 ( <i>s</i> )                                                 | -             | 80.86                                   | 115.24, 119.44, 131.43                |
| 3 (F)                                                                                                                         | 4.23-4.25 ( <i>m</i> )                                            | 2.88          | 67.16                                   | 101.91                                |
| 4 $\alpha$ (F)                                                                                                                | 2.82-2.94 ( <i>m</i> )                                            | 2.88,<br>4.24 | 29.47                                   | 101.91, 151.30                        |
| 4 $\beta$ (F)                                                                                                                 | 2.82-2.94 ( <i>m</i> )                                            | 2.88,<br>4.24 | 29.47                                   | 101.91, 151.30                        |
| 5 (D)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (156.64)                                | -                                     |
| 6 (D)                                                                                                                         | 6.08 ( <i>s</i> )                                                 | -             | 96.49                                   | 101.91, 106.95, 152.09, 156.64        |
| 7 (D)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (152.09)                                | -                                     |
| 8 (D)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (106.95)                                | -                                     |
| 9 (D)                                                                                                                         | -                                                                 | -             | (151.30)                                | -                                     |
| 10 (D)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (101.91)                                | -                                     |
| 1' (E)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (131.43)                                | -                                     |
| 2' (E)                                                                                                                        | 7.12 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 1.9 Hz)                           | 6.94          | 115.24                                  | 80.86, 119.44, 146.23, 146.81         |
| 3' (E)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (146.81)                                | -                                     |
| 4' (E)                                                                                                                        | -                                                                 | -             | (146.23)                                | -                                     |
| 5' (E)                                                                                                                        | 6.81-6.85 ( <i>m</i> )                                            | 6.94          | 116.20*                                 | 131.43, 146.23                        |
| 6' (E)                                                                                                                        | 6.94 ( <i>dd</i> , $J_{6',2'}$ = 1.9 Hz;<br>$J_{6',5'}$ = 8.3 Hz) | 6.83          | 119.44                                  | 80.86, 115.24, 146.23                 |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. \*These signals may be interchanged.

B<sub>7</sub> (19 mg) was composed by a pure compound identified as annphenone (**20**, 29 mg) (**Table 11.28**).

**(-)-Annphenone (20)**



**(-)-Annphenone (20)**

White solid

$[\alpha]_D^{25} -77.6^\circ$  (*c* 0.1 cg/mL, MeOH)

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 343 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 181 (100).

**Retention time:** 23.8 min (**Figure 4.11**, section 4.2.1).

**Table 11.28.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **20**.

| <b>(-)-Annphenone (20) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                                       |                 |                                         |               |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|---------------|
| <b>Position</b>                                     | <b><sup>1</sup>H</b>                                  | <b>COSY</b>     | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>   |
| 1                                                   | -                                                     | -               | (107.53)                                | -             |
| 2                                                   | -                                                     | -               | (167.56)                                | -             |
| 3                                                   | 6.10 ( <i>d</i> , <i>J</i> <sub>3,5</sub> = 2.5 Hz)   | 6.30            | 96.42                                   | 94.8, 107.5   |
| 4                                                   | -                                                     | -               | (162.22)                                | -             |
| 5                                                   | 6.30 ( <i>d</i> , <i>J</i> <sub>5,3</sub> = 2.5 Hz)   | 6.10            | 94.78                                   | 96.42, 107.53 |
| 6                                                   | -                                                     | -               | (167.56)                                | -             |
| 1'                                                  | 5.05 ( <i>d</i> , <i>J</i> <sub>1',2'</sub> = 7.7 Hz) | 3.54            | 102.13                                  | 78.46, 162.22 |
| 2'                                                  | 3.38-3.40 ( <i>m</i> )                                | 3.38-3.40, 5.05 | 74.76                                   | 78.46, 102.13 |
| 3'                                                  | 3.38-3.40 ( <i>m</i> )                                | 3.38-3.40       | 70.31                                   | 71.38, 74.76  |
| 4'                                                  | 3.38-3.40 ( <i>m</i> )                                | 3.38-3.40       | 71.38                                   | 78.46         |
| 5'                                                  | 3.38-3.40 ( <i>m</i> )                                | 3.38-3.40       | 78.46                                   | 71.38, 62.50  |

|                    |                                                                   |                 |          |        |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|----------|--------|
| 6'a                | 3.68 ( <i>dd</i> , $J_{6'a,5} = 5.9$ Hz; $J_{6'a,6'b} = 12.1$ Hz) | 3.38-3.40, 3.90 | 62.50    | 78.46  |
| 6'b                | 3.90 ( <i>dd</i> , $J_{6'b,5} = 2.0$ Hz; $J_{6'a,6'b} = 12.1$ Hz) | 3.38-3.40, 3.68 | 62.50    | 71.38  |
| CO-CH <sub>3</sub> | 2.70 (s)                                                          | -               | 35.56    | 205.17 |
| O-CH <sub>3</sub>  | 3.80 (s)                                                          | -               | 56.14    | 167.56 |
| CO                 | -                                                                 | -               | (205.17) | -      |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

### 11.2.5 Quantification of identified compounds in ethyl acetate extracts of European plum tree woods by HPLC-DAD

Identified compounds (**18–26**) in section 11.2.4 were quantified in ethyl acetate extract of European plum tree wood, cultivars 'De la Rosa', 'Reina Claudia Verde', 'Claudia de Tolosa' and 'Standley'. It was achieved making use of an external-standard method, using HPLC peak areas at 280 nm and following the elution method C (Section 11.2.2).

Solution (0.1–1 mg mL<sup>-1</sup> in methanol) of (–)-annphenone, previously isolated (section 10.2.4), and a commercial standard of procyanidin A-2 were used to build calibration curves (**Table 11.29**). In addition, the calibration curve of (–)-catechin made in section 11.1.6 was used. The concentration of target compounds in EtOAc extract was determined comparing HPLC peak area at 230 nm of each component with the calibration curve of the compound (from the same phenolic group).

**Table 11.29.** Calibration curves for quantification work on European plum woods.

| Compound        | Calibration curve                           |
|-----------------|---------------------------------------------|
| (–)-Catechin    | $y = 44016x - 907133$ ( $r^2 = 0.9934$ )    |
| (–)-Annphenone  | $y = 30000000x - 58648$ ( $r^2 = 0.9989$ )  |
| Procyanidin A-2 | $y = 40000000x - 842819$ ( $r^2 = 0.9986$ ) |

Samples of European plum wood EtOAc extracts were prepared dissolving in MeOH at a concentration of 5 mg/mL, and 5 µL of each was injected on HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Concentrations were calculated as stated above.

### **11.3 Study of the pruning wood of Japanese plum tree (*Prunus salicina* L.)**

#### **11.3.1 Collection and extraction of Japanese plum pruning wood**

Samples of wood from pruning several Japanese plum trees of the cultivars ‘Songold’, ‘Angeleno’, ‘Fortune’, ‘Red Beaut’, ‘Souvenir’, and ‘Showtime’ were collected at Centro IFAPA “Las Torres-Tomegil”, Alcalá del Río, province of Sevilla, Spain, in November 2015. Furthermore, a sample of ‘Angeleno’ was collected in the farming plot ‘La Veguilla’ located in Guadalquivir, province of Córdoba, Spain (**Table 11.30**). Samples consisted of around ten pieces of wood of 0.8–1.4 cm diameter and 60 cm length without leaves. Plant material was stored in a dry and dark place at room temperature with passive ventilation until extraction. Just before starting the extraction process, a wood piece (ca. 1.0 cm diameter) was ground.

**Table 11.30.** Collection and processing of pruning woods of Japanese plum tree.

| Reference    | Cultivar             | Location                    | Collection date | Extraction date |
|--------------|----------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| Ps-SE-1a(Sg) | Songold              | Alcalá del Río <sup>a</sup> | 09/10/2015      | 14/10/2015      |
| Ps-SE-2a(An) | Angeleno             | Alcalá del Río <sup>a</sup> | 09/10/2015      | 15/10/2015      |
| Ps-SE-3a(An) | Angeleno (ecológico) | Alcalá del Río <sup>a</sup> | 09/10/2015      | 15/10/2015      |
| Ps-CO-1a(An) | Angeleno             | Guadalquivir <sup>b</sup>   | 09/10/2015      | 16/10/2015      |
| Ps-SE-4a(Fo) | Fortune              | Alcalá del Río <sup>a</sup> | 09/10/2015      | 14/10/2015      |
| Ps-SE-5a(Rb) | Red Beaut            | Alcalá del Río <sup>a</sup> | 09/10/2015      | 16/10/2015      |
| Ps-SE-6a(So) | Souvenir             | Alcalá del Río <sup>a</sup> | 09/10/2015      | 19/10/2015      |
| Ps-SE-7a(Sh) | Showtime             | Alcalá del Río <sup>a</sup> | 09/10/2015      | 19/10/2015      |

<sup>a</sup>Province of Sevilla; <sup>b</sup>Province of Córdoba

Every wood sample was extracted following the extraction procedure A (Section 11.1.1).

### ***11.3.2 HPLC–DAD analysis of Japanese plum wood extracts***

Japanese plum EtOAc extracts were analysed by HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Samples were dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>-1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Separations were carried out using the elution method C (Section 11.2.2).

### ***11.3.3 Quantification of identified compounds in ethyl acetate extract of Japanese plum tree woods by HPLC–DAD***

Identified compounds (**18–26**) in section 11.3.2 were quantified in ethyl acetate extracts of Japanese plum tree woods, cultivars ‘Songold’, ‘Angeleno’, ‘Fortune’, ‘Red Beaut’, ‘Souvenir’, and ‘Showtime’. It was achieved making use of an external-standard method, following the elution method C (Section 11.2.2). The concentration of each compound in the EtOAc extracts was determined comparing HPLC peak areas at 280 nm with the calibration curves of the selected compound from the same phenolic group made in section 11.2.5. Samples of EtOAc extracts were prepared in MeOH at a concentration of 5 mg/mL, and 5 µL of each one was injected on HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Concentrations were calculated as stated above.

## **11.4 Study of pruning wood of litchi tree (*Litchi chinensis* Sonn.)**

### ***11.4.1 Collection and extraction of litchi pruning wood***

Samples of wood from pruning several litchi trees of the cultivars ‘Mauritius’ and ‘Bengal’ were collected at the research center “La Mayora”, Algarrobo, province of Málaga, Spain, in November 2019 (**Table 11.31**). They consisted of 4–6 pieces of wood (1.0–8.5 cm of diameter and 40 cm of length). Plant material was stored in a dry and

dark place at room temperature with passive ventilation until extraction. Just before starting the extraction process, a wood piece (ca. 5-8.5 cm diameter) was ground.

**Table 11.31.** Collection and processing of pruning woods of litchi tree.

| Reference    | Cultivar  | Location <sup>a</sup> | Collection date | Extraction date |
|--------------|-----------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Lc-Ma-1a(Be) | Bengal    | Algarrobo             | 08/11/2019      | 30/06/2020      |
| Lc-Ma-2a(Ma) | Mauritius | Algarrobo             | 08/11/2019      | 30/06/2020      |

<sup>a</sup>Province of Málaga, Spain.

The wood samples (**Table 11.31**) were extracted using extraction procedure A (Section 11.1.1) and dry extracts were stored under Ar at -20 °C until use. In addition, a sample of wood shavings (900 g) of litchi tree cultivar 'Mauritius' was extracted using the same extraction procedure yielding 5.03 g of EtOAc extract.

#### **11.4.2 HPLC-DAD analysis of litchi wood extracts**

Litchi EtOAc extracts were analysed by HPLC-DAD (Instrument A; section 10.2.4). Samples were dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>-1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Separations were carried out using the elution method C (Section 11.2.2).

#### **11.4.3 HPLC-DAD/ESI-MS analysis of litchi wood extract, cultivar 'Mauritius'**

The EtOAc extract obtained from cultivar 'Mauritius' was analysed by HPLC-DAD/ESI-MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4). The separation was carried out using acetonitrile (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of formic acid v/v, at a flow rate of 0.25 mL/min. The gradient programme consisted in a linear gradient from 0 to 20% A in 22 min, a linear gradient from 20 to 22.5% A in 0.8 min, an isocratic hold at 22.5% A for 5.2 min, a linear gradient from 22.5 to 25% A in 8



min, and other 2 min to return to initial conditions. Mass spectrometric operation parameters were described in section 11.1.3.

#### ***11.4.4 Chromatographic fractionation of litchi wood extract and isolation of proanthocyanidins***

Two independent aliquots (2 g each) of litchi wood EtOAc extract, cultivar 'Mauritius', were chromatographed by FCPC (Section 10.2.3) using a solvent mixture of Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:19:1:19, v/v/v/v). Forty-five fractions were collected, 53 in ascending mode and the rest in descending mode. They were monitored by TLC (Section 10.2.1) and HPLC-DAD (Instrument A, section 10.2.4; elution method C, section 11.2.2). Fractions with similar composition were pooled (**Table 11.32**) and evaporated.

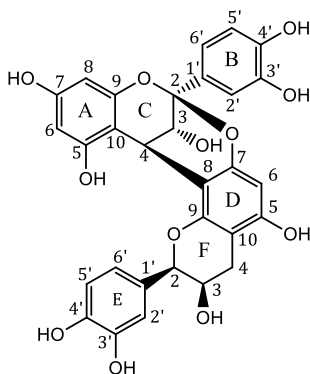
**Table 11.32.** Fractionation of EtOAc extract of litchi wood, cultivar 'Mauritius', by FCPC Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:19:1:19, v/v/v/v).

| Major fraction   | Fractions | Mass (mg) |
|------------------|-----------|-----------|
| C <sub>1</sub>   | 1         | 269       |
| C <sub>2</sub>   | 2         | 132       |
| C <sub>3</sub>   | 4–6       | 221       |
| C <sub>4</sub>   | 7–17      | 179       |
| C <sub>5</sub>   | 18–28     | 207       |
| C <sub>6</sub>   | 29–45     | 460       |
| Aqueous fraction | 46–53     | 515       |

C<sub>1</sub> (269 mg) was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4). The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and water (solvent B), both with 0.2% of acetic acid. Solutions of samples of 150 mg mL<sup>-1</sup> in methanol were prepared and introduced into the instrument at a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. Separation was carried out using an isocratic elution of 25% A. Two pure compounds (17.7 mg) were obtained and identified as epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-

epicatechin (procyanidin A-2) (**32**, 17.7 mg) (**Table 11.33**) and epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →6)-epicatechin (procyanidin A-6) (**33**, 10.7 mg) (**Table 11.34**). Compound **32** was also identified in fraction C<sub>2</sub>.

**(+)-Epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin (Procyanidin A-2) (**32**)**



**(+)-Epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin (procyanidin A-2) (**32**)**

Brown solid

$[\alpha]_D^{25} +30.3^\circ$  (*c* 0.7 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 575 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 539 (10), 453 (12), 449 (45), 423 (100), 289 (17),  
285 (30).

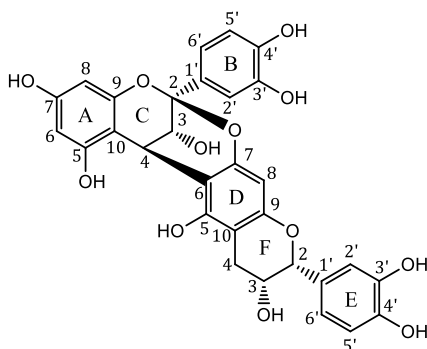
**Retention time:** 35.2 min (**Figure 4.25**, section 4.4.1).

**Table 11.33.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **32**.

| <b>(+)-Epicatechin-(2<math>\beta</math>→O→7,4<math>\beta</math>→8)-epicatechin (procyanidin A-2) (<b>32</b>) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                                                              |             |                                         |                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                                           | <b><sup>1</sup>H</b>                                                         | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                           |
| 2 (C)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (100.19)                                | -                                     |
| 3 (C)                                                                                                                                     | 4.07 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.4 Hz)                                        | 4.42        | 68.06                                   | 104.27                                |
| 4 (C)                                                                                                                                     | 4.42 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.4 Hz)                                        | 4.07        | 29.25                                   | 68.06, 100.19, 107.22, 154.25, 156.99 |
| 5 (A)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (156.99)                                | -                                     |
| 6 (A)                                                                                                                                     | 6.01 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.4 Hz)                                        | 6.08        | 98.32                                   | 96.64, 104.27, 158.12                 |
| 7 (A)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (158.12)                                | -                                     |
| 8(A)                                                                                                                                      | 6.08 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.4 Hz)                                        | 6.01        | 96.64                                   | 98.32, 104.27, 154.25, 158.12         |
| 9 (A)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (154.25)                                | -                                     |
| 10 (A)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (104.27)                                | -                                     |
| 1' (B)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (132.46)                                | -                                     |
| 2' (B)                                                                                                                                    | 7.15 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 2.2 Hz)                                      | 7.03        | 115.68 <sup>a</sup>                     | 100.19, 119.84, 146.76                |
| 3' (B)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (145.65) <sup>b</sup>                   | -                                     |
| 4' (B)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (146.76)                                | -                                     |
| 5' (B)                                                                                                                                    | 6.80 ( <i>d</i> , $J_{5',6'}$ = 8.4 Hz)                                      | 7.03        | 116.05 <sup>a</sup>                     | 132.46, 145.65                        |
| 6' (B)                                                                                                                                    | 7.03 ( <i>dd</i> , $J_{6',2'}$ = 2.2 Hz; $J_{6',5'}$ = 8.4 Hz)               | 6.80, 6.75  | 119.80                                  | 100.19, 115.68, 146.75                |
| 2 (F)                                                                                                                                     | 4.93 ( <i>s</i> )                                                            | -           | 81.76                                   | -                                     |
| 3 (F)                                                                                                                                     | 4.24 ( <i>m</i> )                                                            | 2.77, 2.95  | 66.95                                   | 102.44                                |
| 4 $\alpha$ (F)                                                                                                                            | 2.77 ( <i>dd</i> , $J_{4\alpha,3}$ = 2.2 Hz; $J_{4\alpha,4\beta}$ = 17.3 Hz) | 2.95, 4.24  | 29.89                                   | 66.95, 81.76, 102.44, 152.13, 156.59  |
| 4 $\beta$ (F)                                                                                                                             | 2.95 ( <i>dd</i> , $J_{4\beta,3}$ = 4.9 Hz; $J_{4\beta,4\alpha}$ = 17.3 Hz)  | 2.77, 4.24  | 29.89                                   | 102.44, 152.13, 156.59                |
| 5 (D)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (156.59)                                | -                                     |
| 6 (D)                                                                                                                                     | 6.10 ( <i>s</i> )                                                            | -           | 96.52                                   | 102.44, 107.22, 152.29, 156.59        |
| 7 (D)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (152.29)                                | -                                     |
| 8 (D)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (107.22)                                | -                                     |
| 9 (D)                                                                                                                                     | -                                                                            | -           | (152.13)                                | -                                     |
| 10 (D)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (102.44)                                | -                                     |
| 1' (E)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (131.19)                                | -                                     |
| 2' (E)                                                                                                                                    | 7.16 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 2.2 Hz)                                      | 6.98        | 115.96 <sup>a</sup>                     | 81.76, 120.40, 146.31                 |
| 3' (E)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (145.99) <sup>b</sup>                   | -                                     |
| 4' (E)                                                                                                                                    | -                                                                            | -           | (146.30)                                | -                                     |
| 5' (E)                                                                                                                                    | 6.82 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 8.2 Hz)                                      | 6.98        | 115.65 <sup>a</sup>                     | 131.19, 145.99                        |
| 6' (E)                                                                                                                                    | 6.98 ( <i>dd</i> , $J_{6',2'}$ = 2.2 Hz; $J_{6',5'}$ = 8.2 Hz)               | 6.82, 7.16  | 120.40                                  | 81.76, 115.96, 146.30                 |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. <sup>a,b</sup>These signals may be interchanged.

**(+)-Epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →6)-epicatechin (Procyanidin A-6) (33)**



**(+)-Epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →6)-epicatechin (Procyanidin A-6) (33)**

Brown solid

$[\alpha]_D^{25} +17.9^\circ$  (*c* 0.7 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 575 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 539 (26), 449 (100), 423 (98), 407 (53), 289 (55), 285 (58).

**Retention time:** 36.6 min (**Figure 4.25**, section 4.4.1).

**Table 11.34.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound 33.

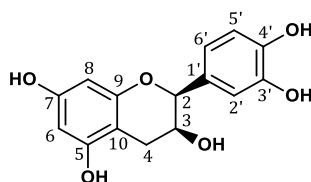
| <b>(+)-Epicatechin-(2<math>\beta</math>→O→7,4<math>\beta</math>→6)-epicatechin (Procyanidin A-6) (33) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                       |             |                                         |                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                                    | <b><sup>1</sup>H</b>                  | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                   |
| 2 (C)                                                                                                                              | -                                     | -           | (100.55)                                | -                             |
| 3 (C)                                                                                                                              | 4.09 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.5 Hz) | 4.28        | 67.64                                   | 104.20                        |
| 4 (C)                                                                                                                              | 4.28 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.5 Hz) | 4.09        | 29.72                                   | 67.64, 100.55, 108.83, 154.44 |
| 5 (A)                                                                                                                              | -                                     | -           | (155.34)                                | -                             |
| 6 (A)                                                                                                                              | 6.08 ( <i>brs</i> )                   | 6.04        | 96.94 <sup>a</sup>                      | 96.58, 104.20, 155.34, 158.19 |
| 7 (A)                                                                                                                              | -                                     | -           | (158.19)                                | -                             |
| 8(A)                                                                                                                               | 6.04 ( <i>brs</i> )                   | 6.08        | 96.58                                   | 96.94, 154.44, 158.19         |
| 9 (A)                                                                                                                              | -                                     | -           | (154.44)                                | -                             |
| 10 (A)                                                                                                                             | -                                     | -           | (104.20)                                | -                             |
| 1' (B)                                                                                                                             | -                                     | -           | (132.23) <sup>b</sup>                   | -                             |

|                |                                                                      |                              |                       |                        |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 2' (B)         | 7.16 ( $d, J_{2',6'} = 2.0$ Hz)                                      | 7.05                         | 115.79                | 100.55, 119.94, 146.82 |
| 3' (B)         | -                                                                    | -                            | (145.79)              | -                      |
| 4' (B)         | -                                                                    | -                            | (146.82)              | -                      |
| 5' (B)         | 6.82 ( $d, J_{5',6'} = 8.3$ Hz)                                      | 7.05                         | 115.62                | 132.23, 145.79         |
| 6' (B)         | 7.05 ( $dd, J_{6',2'} = 2.0$ Hz; $J_{6',5'} = 8.3$ Hz)               | 6.82; 7.16                   | 119.94                | 115.79, 146.82         |
| 2 (F)          | 4.81 (brs)                                                           | 2.80; 2.93; 4.18; 6.78; 6.95 | 79.88                 | 115.25, 119.35, 132.09 |
| 3 (F)          | 4.18 (m)                                                             | 2.80; 2.93; 4.81             | 67.43                 | 103.05                 |
| 4 $\alpha$ (F) | 2.80 ( $dd, J_{4\alpha,3} = 2.7$ Hz; $J_{4\alpha,4\beta} = 17.0$ Hz) | 2.93; 4.18                   | 29.59                 | 79.88, 103.05          |
| 4 $\beta$ (F)  | 2.93 ( $dd, J_{4\beta,3} = 4.9$ Hz; $J_{4\beta,4\alpha} = 17.0$ Hz)  | 2.80; 4.18                   | 29.59                 | 103.05                 |
| 5 (D)          | -                                                                    | -                            | (155.74)              | -                      |
| 6 (D)          | -                                                                    | -                            | (108.83)              | -                      |
| 7 (D)          | -                                                                    | -                            | (152.81)              | -                      |
| 8 (D)          | 6.11 (brs)                                                           | -                            | 96.90 <sup>a</sup>    | 103.05, 108.83, 152.81 |
| 9 (D)          | -                                                                    | -                            | (151.73)              | -                      |
| 10 (D)         | -                                                                    | -                            | (103.05)              | -                      |
| 1' (E)         | -                                                                    | -                            | (132.09) <sup>b</sup> | -                      |
| 2' (E)         | 6.95 (brs)                                                           | 6.78                         | 115.25                | 79.88, 119.35, 145.95  |
| 3' (E)         | -                                                                    | -                            | (145.67)              | -                      |
| 4' (E)         | -                                                                    | -                            | (145.95)              | -                      |
| 5' (E)         | 6.75 ( $d, J_{2',6'} = 8.3$ Hz)                                      | 6.78                         | 115.87                | 132.09, 145.67         |
| 6' (E)         | 6.78 ( $dd, J_{6',2'} = 1.5$ Hz; $J_{6',5'} = 8.3$ Hz)               | 6.75; 6.95                   | 119.35                | 77.88, 115.87, 145.95  |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbon. <sup>a,b</sup>These signals may be interchanged.

C<sub>3</sub> was composed by a crude compound identified as (+)-epicatechin (**29**) (**Table 11.35**).

**(+)-Epicatechin (29)**



(+)-Epicatechin (29)

Brown solid

$[\alpha]_D^{25} +9.7^\circ$  (c 0.1 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 289 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (negative mode): 247 (11), 245 (100), 205 (38), 203 (11), 179 (20), 137 (12).

**Retention time:** 21.7 min (**Figure 4.25**, section 4.4.1).

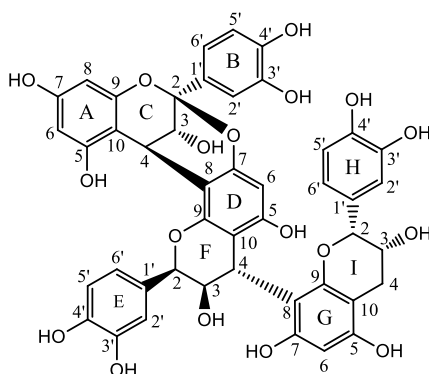
**Table 11.35.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound 29.

| <b>(+)-Epicatechin (X) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                 |             |                       |             |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| <b>Position</b>                                      | <b><sup>1</sup>H</b>                            | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C</b> | <b>HMBC</b> |
| 2                                                    | 4.86 (s)                                        | -           | 79.84                 | -           |
| 3                                                    | 4.17-4.19 (m)                                   | -           | 67.46                 | -           |
| 4a                                                   | 2.74 (dd, $J_{4a,3}=2.8$ , $J_{4a,4b}=16.7$ Hz) | -           | 29.23                 | -           |
| 4b                                                   | 2.86 (dd, $J_{4b,3}=4.6$ , $J_{4b,4a}=16.7$ Hz) | -           | 29.23                 | -           |
| 5                                                    | -                                               | -           | 157.97                | -           |
| 6                                                    | 5.95 (d, $J_{2,3}=2.3$ Hz)                      | -           | 96.40                 | -           |
| 7                                                    | -                                               | -           | 157.66                | -           |
| 8                                                    | 5.93 (d, $J_{2,3}=2.3$ Hz)                      | -           | 95.89                 | -           |
| 9                                                    | -                                               | -           | 157.35                | -           |
| 10                                                   | -                                               | -           | 100.08                | -           |
| 1'                                                   | -                                               | -           | 132.27                | -           |
| 2'                                                   | 6.98 (d, $J_{2',6'}=2.0$ Hz)                    | -           | 115.32                | -           |
| 3'                                                   | -                                               | -           | 145.75*               | -           |
| 4'                                                   | -                                               | -           | 145.92*               | -           |
| 5'                                                   | 6.77 (d, $J_{5',6'}=8.2$ Hz)                    | -           | 115.90                | -           |
| 6'                                                   | 6.80 (dd, $J_{6',2'}=2.0$ , $J_{6',5'}=8.2$ Hz) | -           | 119.40                | -           |

\*These signals may be interchanged.

C<sub>6</sub> (460 mg) was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4). The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and water (solvent B), both with 0.2% of acetic acid. Solution of samples of 150 mg mL<sup>-1</sup> in methanol were prepared and introduced into equipment at a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. Separation was carried out using an isocratic elution of 10% A. A pure compound (58.8 mg) was obtained, identified as epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin (Cinnamtannin B-1) (**30**) (*Table 11.36 and 11.37*). Compound **30** was also identified in fraction C<sub>5</sub>.

**(+)-Epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin  
(Cinnamtannin B-1) (**30**)**



(+)-Epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin  
(cinnamtannina B-1) (**30**)

Brown solid

$[\alpha]_D^{25} +47.5^\circ$  (*c* 0.1 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 863 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (negative mode): 711 (100), 693 (13), 559 (12), 573 (18), 451 (30),  
411 (24), 289 (12).

**Retention time:** 26.2 min (*Figure 4.25*, section 4.4.1).

**Table 11.36.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **30** (major rotamer).

| (+)-Epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechi<br>(major rotamer) ( <b>30</b> ) $\delta(ppm)$ |                                                                |                     |                                    |                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Position                                                                                                                           | <sup>1</sup> H                                                 | COSY                | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                  |
| 2 (C)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (99.91)                            | -                     |
| 3 (C)                                                                                                                              | 3.29 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.5 Hz)                          | 4.15                | 67.14                              | 104.92, 132.42        |
| 4 (C)                                                                                                                              | 4.15 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.5 Hz)                          | 3.29                | 28.83                              | 99.91, 154.12, 156.74 |
| 5 (A)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (156.74)                           | -                     |
| 6 (A)                                                                                                                              | 5.97 ( <i>d</i> , $J_{6,8}$ = 2.3 Hz)                          | 6.02                | 98.26                              | 96.56, 104.92         |
| 7 (A)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (157.80)                           | -                     |
| 8(A)                                                                                                                               | 6.02 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.3 Hz)                          | 5.97                | 96.52                              | 98.26, 104.92         |
| 9 (A)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (154.12)                           | -                     |
| 10 (A)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (104.92)                           | -                     |
| 1' (B)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (132.42)                           | -                     |
| 2' (B)                                                                                                                             | 7.04 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 1.8 Hz)                        | 6.84-6.86           | 115.71                             | 99.91, 119.84         |
| 3' (B)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (145.43)                           | -                     |
| 4' (B)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (146.57)                           | -                     |
| 5' (B)                                                                                                                             | 6.84-6.86 ( <i>m</i> )                                         | 6.84-6.86           | 116.10                             | -                     |
| 6' (B)                                                                                                                             | 6.84-6.86 ( <i>m</i> )                                         | 6.84-6.86,<br>7.04  | 119.84                             | -                     |
| 2 (F)                                                                                                                              | 5.71 ( <i>brs</i> )                                            | -                   | 78.84                              | 38.25, 116.69, 121.33 |
| 3 (F)                                                                                                                              | 4.04-4.09 ( <i>m</i> )                                         | -                   | 72.54                              | 106.37, 131.74        |
| 4 (F)                                                                                                                              | 4.56 ( <i>brs</i> )                                            | -                   | 38.25                              | 151.77, 155.78        |
| 5 (D)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (155.78)                           | -                     |
| 6 (D)                                                                                                                              | 5.80 ( <i>s</i> )                                              | -                   | 96.01                              | 106.37, 106.69        |
| 7 (D)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (151.05)                           | -                     |
| 8 (D)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (106.37)                           | -                     |
| 9 (D)                                                                                                                              | -                                                              | -                   | (151.77)                           | -                     |
| 10 (D)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (106.69)                           | -                     |
| 1' (E)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (131.74)                           | -                     |
| 2' (E)                                                                                                                             | 7.32 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 1.9 Hz)                        | 7.20                | 116.69                             | 78.84, 146.25, 121.33 |
| 3' (E)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (145.86)                           | -                     |
| 4' (E)                                                                                                                             | -                                                              | -                   | (146.25)                           | -                     |
| 5' (E)                                                                                                                             | 6.81-6.83 ( <i>m</i> )                                         | 7.20, 7.32          | 115.71                             | 131.74, 145.86        |
| 6' (E)                                                                                                                             | 7.20 ( <i>dd</i> , $J_{6',2'}$ = 1.9, $J_{6',5'}$ =<br>8.3 Hz) | 6.81-6.83           | 121.33                             | 116.69, 146.25        |
| 2 (I)                                                                                                                              | 4.39 ( <i>brs</i> )                                            | -                   | 80.25                              | 29.83, 115.44, 119.40 |
| 3 (I)                                                                                                                              | 3.86 ( <i>brs</i> )                                            | 4.39, 2.81-<br>2.85 | 67.50                              | 99.98, 133.15         |



|        |                          |                         |          |                       |
|--------|--------------------------|-------------------------|----------|-----------------------|
| 4 (I)  | 2.81-2.85 ( <i>brs</i> ) | 4.39                    | 29.83    | 80.25, 155.99, 155.74 |
| 5 (G)  | -                        |                         | (155.99) | -                     |
| 6 (G)  | 6.10 ( <i>s</i> )        | -                       | 96.52    | 99.98, 108.82         |
| 7 (G)  | -                        | -                       | (155.54) | -                     |
| 8 (G)  | -                        | -                       | (108.82) | -                     |
| 9 (G)  | -                        | -                       | (155.74) | -                     |
| 10 (G) | -                        | -                       | (99.98)  | -                     |
| 1' (H) | -                        | -                       | (133.15) | -                     |
| 2' (H) | 6.81-6.83 ( <i>m</i> )   | 6.74-6.77               | 115.44   | 80.25, 119.40, 145.72 |
| 3' (H) | -                        | -                       | (145.29) | -                     |
| 4' (H) | -                        | -                       | (145.72) | -                     |
| 5' (H) | 6.74-6.77 ( <i>m</i> )   | 6.74-6.77,<br>6.81-6.83 | 115.96   | 133.15, 145.29        |
| 6' (H) | 6.74-6.77 ( <i>m</i> )   | 6.74-6.77               | 119.40   | 80.25, 115.44, 145.72 |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

**Table 11.37.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **30** (minor rotamer).

| <b>(+)-Epicatechin-(2<math>\beta</math>→O→7,4<math>\beta</math>→8)-epicatechin-(4<math>\beta</math>→8)-epicatechin<br/>(minor rotamer) (<b>30</b>) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                                             |             |                                         |                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-----------------------|
| <b>Position</b>                                                                                                                                                                 | <b><sup>1</sup>H</b>                                        | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>           |
| 2 (C)                                                                                                                                                                           | -                                                           | -           | (99.98)                                 | -                     |
| 3 (C)                                                                                                                                                                           | 4.10 ( <i>d</i> , $J_{3,4}$ = 3.3 Hz)                       | 4.46        | 67.14                                   | 104.92, 132.57        |
| 4 (C)                                                                                                                                                                           | 4.46 ( <i>d</i> , $J_{4,3}$ = 3.3 Hz)                       | 4.10        | 28.83                                   | 99.98, 154.16, 156.74 |
| 5 (A)                                                                                                                                                                           | -                                                           | -           | (156.74)                                | -                     |
| 6 (A)                                                                                                                                                                           | 6.02-6.03 ( <i>m</i> )                                      | 6.08        | 98.26                                   | 96.56, 104.92         |
| 7 (A)                                                                                                                                                                           | -                                                           | -           | (157.80)                                | -                     |
| 8(A)                                                                                                                                                                            | 6.08 ( <i>d</i> , $J_{8,6}$ = 2.3 Hz)                       | 6.02-6.03   | 96.56                                   | 98.26, 104.92         |
| 9 (A)                                                                                                                                                                           | -                                                           | -           | (154.16)                                | -                     |
| 10 (A)                                                                                                                                                                          | -                                                           | -           | (104.92)                                | -                     |
| 1' (B)                                                                                                                                                                          | -                                                           | -           | (132.57)                                | -                     |
| 2' (B)                                                                                                                                                                          | 7.05 ( <i>d</i> , $J_{2',6'}$ = 2.1 Hz)                     | 6.93        | 115.71                                  | 99.98, 119.84         |
| 3' (B)                                                                                                                                                                          | -                                                           | -           | (145.43)                                | -                     |
| 4' (B)                                                                                                                                                                          | -                                                           | -           | (146.57)                                | -                     |
| 5' (B)                                                                                                                                                                          | 7.07 ( <i>d</i> , $J_{5',6'}$ = 8.2 Hz)                     | 6.93        | 116.10                                  | -                     |
| 6' (B)                                                                                                                                                                          | 6.93 ( <i>dd</i> , $J_{6',2'}$ = 2.1, $J_{6',5'}$ = 8.2 Hz) | 7.05, 7.07  | 119.84                                  | -                     |
| 2 (F)                                                                                                                                                                           | 5.26 ( <i>s</i> )                                           | -           | 78.84                                   | 38.25, 116.69, 121.33 |
| 3 (F)                                                                                                                                                                           | 3.95 ( <i>brs</i> )                                         | -           | 72.54                                   | 106.69, 131.74        |
| 4 (F)                                                                                                                                                                           | 4.68 ( <i>brs</i> )                                         | -           | 38.25                                   | 151.77, 155.83        |

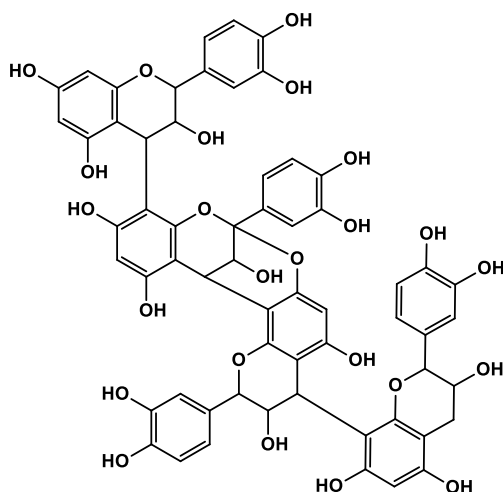
|        |                                 |                 |          |                       |
|--------|---------------------------------|-----------------|----------|-----------------------|
| 5 (D)  | -                               | -               | (155.83) | -                     |
| 6 (D)  | 5.91 (s)                        | -               | 96.01    | 106.37, 106.69        |
| 7 (D)  | -                               | -               | (151.05) | -                     |
| 8 (D)  | -                               | -               | (106.37) | -                     |
| 9 (D)  | -                               | -               | (151.77) | -                     |
| 10 (D) | -                               | -               | (106.69) | -                     |
| 1' (E) | -                               | -               | (131.74) | -                     |
| 2' (E) | 7.12 ( $d, J_{2',6'} = 1.6$ Hz) | 7.07-7.09       | 116.69   | 78.84, 146.20, 121.33 |
| 3' (E) | -                               | -               | (145.90) | -                     |
| 4' (E) | -                               | -               | (146.20) | -                     |
| 5' (E) | 6.81-6.83 (m)                   | 7.12, 6.81-6.83 | 115.71   | 131.74, 145.90        |
| 6' (E) | 7.07-7.09 (m)                   | 7.07-7.09       | 121.33   | 116.69, 146.20        |
| 2 (I)  | 4.97 (brs)                      | -               | 79.70    | 29.83, 115.59, 119.48 |
| 3 (I)  | 4.26-4.28 (m)                   | 4.97, 2.76-2.97 | 67.92    | 100.01, 133.15        |
| 4 (I)  | 2.76-2.97 (m)                   | 4.26-4.28       | 29.83    | 79.70, 155.54, 155.78 |
| 5 (G)  | -                               | -               | 156.07   | -                     |
| 6 (G)  | 6.11 (s)                        | -               | 96.47    | 100.01, 108.82        |
| 7 (G)  | -                               | -               | (155.54) | -                     |
| 8 (G)  | -                               | -               | (108.82) | -                     |
| 9 (G)  | -                               | -               | (155.78) | -                     |
| 10 (G) | -                               | -               | (100.01) | -                     |
| 1' (H) | -                               | -               | (133.15) | -                     |
| 2' (H) | 6.90 ( $d, J_{2',6'} = 1.8$ Hz) | 6.72-6.77       | 115.59   | 79.70, 119.48, 145.78 |
| 3' (H) | -                               | -               | (145.39) | -                     |
| 4' (H) | -                               | -               | (145.78) | -                     |
| 5' (H) | 6.76-6.78 (m)                   | 6.72-6.77       | 116.10   | 133.15, 145.39        |
| 6' (H) | 6.72-6.77 (m)                   | 6.90, 6.76-6.78 | 119.48   | 79.70, 115.59, 145.78 |

<sup>a</sup>Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

### 11.4.5 Tentatively identification of proanthocianidins in litchi wood ethyl acetate extract, cultivar 'Mauritius', by HPLC-DAD/ESI-MS

Furthermore, three compounds were tentatively identified in EtOAc extract by HPLC-DAD/ESI-MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4) according to the experimental procedure described in section 11.4.3.

(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin (27)



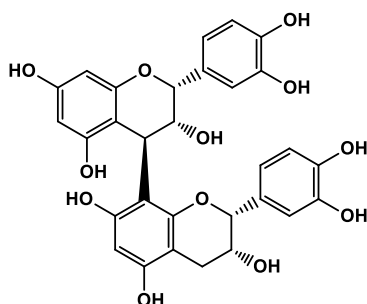
(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin (29)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 1151  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 1025 (17), 999 (17), 863 (100), 711 (36), 451 (16), 411 (22).

**Retention time:** 10.8 min (**Figure 4.25**, section 4.4.1).

**Epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin (Procyanidin B-2) (28)**



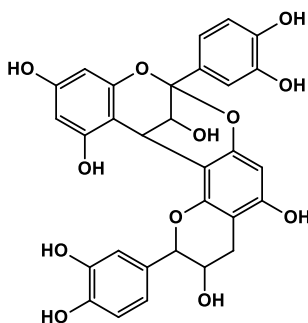
epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin (Procyanidin B-2) (28)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 577 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 451 (21), 425 (100), 407 (87), 289 (28).

**Retention time:** 20.4 min (**Figure 4.25**, section 4.4.1).

**(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (31)**



(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (31)

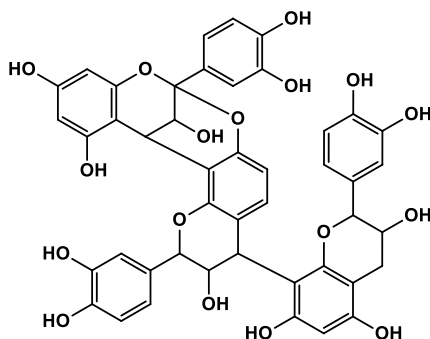
**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 575 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 499 (51), 449 (100), 451 (36), 423 (22), 289 (91).

**Retention time:** 28.8 min (**Figure 4.25**, section 4.4.1).

The fraction C<sub>4</sub> was analysed by HPLC–DAD/ESI–MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4) according to the experimental procedure described in section 11.4.3.

**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin (34)**



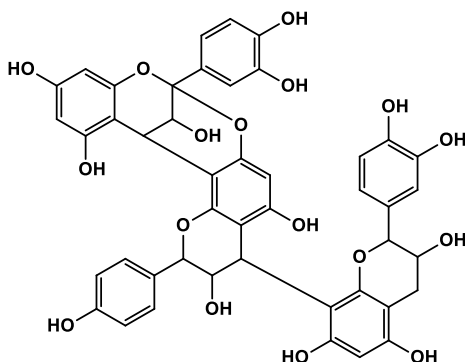
**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin (34)**

**ESI–MS:**  $m/z$  (negative mode): 863 [M–H]<sup>–</sup>.

**ESI–MS–MS:**  $m/z$  (negative mode): 712 (32), 711 (100), 693 (18), 573 (10), 559 (7), 451 (14), 289 (9).

**Retention time:** 25.1 min (**Figure 4.26**, section 4.4.2).

**(Epi)catechin-(2→O→7, 4→8)-(epi)afzelechin-(4→8)-(epi)catechin (35)**



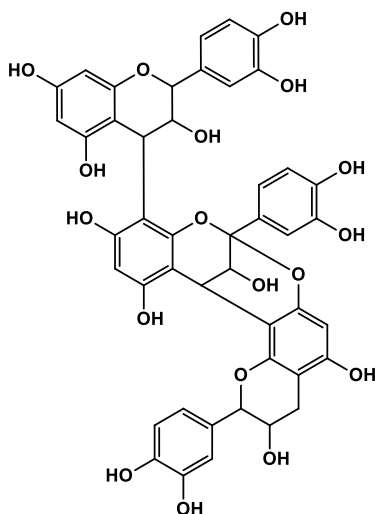
**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)epiafzelechin-(4→8)-(epi)catechin (35)**

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 847  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 721 (12), 711 (88), 695 (25), 693 (21), 559 (17), 557 (41), 435 (31), 431 (18), 411 (100).

**Retention time:** 28.0 min (**Figure 4.26**, section 4.4.2).

**(Epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (36)**



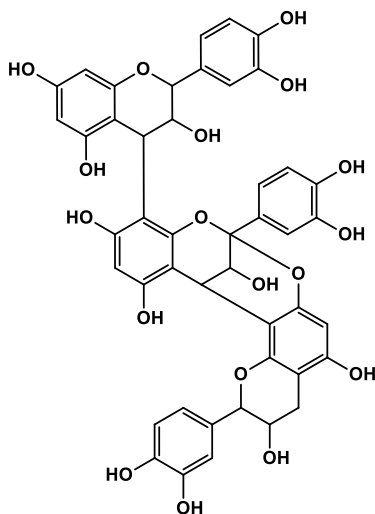
**(Epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (36)**

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 863  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 712 (27), 711 (100), 694 (12), 693 (35), 576 (20), 575 (79), 559 (19), 287 (8).

**Retention time:** 32.6 min (**Figure 4.26**, section 4.4.2).

**(Epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (37)**



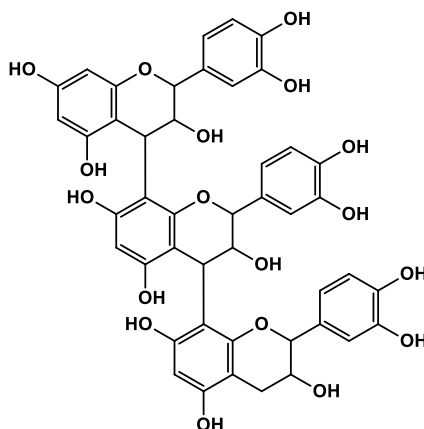
**(Epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (37)**

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 863  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 711 (100), 693 (63), 575 (52), 559 (9), 287 (6).

**Retention time:** 37.5 min (**Figure 4.26**, section 4.4.2).

**(Epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin (38)**



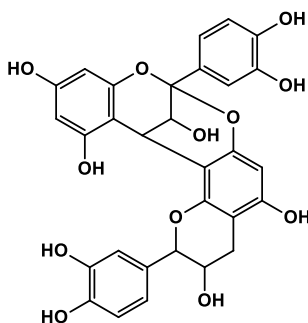
(Epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin-(4→8)-(epi)catechin (**38**)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 865 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 713 (100), 695 (74), 575 (62), 739 (52), 711 (46), 289 (5).

**Retention time:** 39.0 min (**Figure 4.26**, section 4.4.2).

**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (39)**



(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (**39**)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 575 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 411(100), 449 (30), 423(51), 289 (32), 285 (46).

**Retention time:** 40.0 min (**Figure 4.26**, section 4.4.2).



#### **11.4.6 Quantification of identified flavonoids and proanthocyanidins in ethyl acetate extracts of litchi tree woods by HPLC-DAD**

Identified compounds (**28–32**) (Section 11.4.4 and 11.4.5) were quantified in ethyl acetate extracts of litchi tree woods, cultivars ‘Mauritius’ and ‘Bengal’. It was achieved making use of an external-standard method, following the elution method C (Section 11.2.2). Solution (0.1–1 mg mL<sup>-1</sup> in methanol) of cinnamtannin B-1, isolated from laurel wood,<sup>31</sup> and a commercial standard of procyanidin B-2 were used to make calibration curves (**Table 11.38**). In addition, calibration curves constructed previously for (–)-catechin (Section 11.1.6) and procyanidin A-2 (Section 11.2.5) were employed. The concentration of each compound in EtOAc extracts was determined comparing HPLC peak areas at 280 nm with the calibration curves of selected compounds from the same phenolic group made in section 11.2.5.

**Table 11.38.** Calibration curves for quantification work on litchi woods.

| Compound         | Calibration curve                          |
|------------------|--------------------------------------------|
| (–)-Catechin     | $y = 9000000x - 129376$ ( $r^2 = 0.9934$ ) |
| Procyanidin B-2  | $y = 6000000x + 65796$ ( $r^2 = 0.9877$ )  |
| Procyanidin A-2  | $y = 9000000x - 194161$ ( $r^2 = 0.9984$ ) |
| Cinnamtannin B-1 | $y = 7000000x - 88497$ ( $r^2 = 0.9981$ )  |

Samples of litchi wood EtOAc extracts were prepared in MeOH at a concentration of 5 mg/mL, and 5 µL of each one was injected on HPLC-DAD (Instrument A; section 10.2.4). Concentrations were calculated as stated above.

## **11.5 Study of a commercial extract of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.)**

### ***11.5.1 Re-extraction of a commercial cranberry extract***

A sample (9 g) of a dry hydroalcoholic commercial extract (Nutra Green Biotechnology Co., Ltd.; with 50% of proanthocyanidins) of cranberry was extracted (Extraction method B) with 500 mL of EtOH for 2h at reflux. The ethanolic extract (7.5 g) obtained was filtered and evaporated under reduced pressure at 40 °C. Then, an aliquot of this dry ethanolic extract (1.7 g) was dissolved in 500 mL of water and a liquid-liquid extraction was carried out with EtOAc (3×500 mL). The resulting organic phases were pooled and evaporated under reduced pressure. The dry EtOAc extract (0.48 g) was stored at -20 °C until analysis. This procedure was repeated several times to obtain more than 2 g of extract.

### ***11.5.2 HPLC-DAD analysis of cranberry ethyl acetate extract***

The ethyl acetate extract prepared from the commercial cranberry extract was analysed by HPLC-DAD (Instrument A; section 10.2.4). A sample was dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>-1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Optimal method (Elution method D) was achieved using acetonitrile (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of acetic acid, v/v, at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. The gradient program consisted in a linear gradient from 10 to 20% A in 70 min; a linear gradient from 20 to 50% A in 10 min; and other 5 min to return to initial conditions.

### ***11.5.3 Chromatographic fractionation of cranberry extract and tentatively identification of flavonoids and procyanidins by HPLC-DAD/ESI-MS***

An aliquot (2 g) of the ethyl acetate extract of cranberry was chromatographed by FCPC (Section 10.2.3) using as solvent a mixture composed by Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O

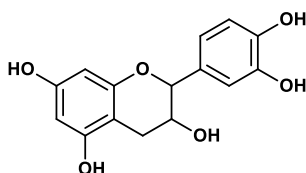
(2:5:2:5, v/v/v/v). Seventy-two fractions were collected, 60 in ascending mode and the rest in descending mode. They were monitored by TLC (Section 10.2.1) and by HPLC–DAD (Instrument A, section 10.2.4; elution method D, section 11.5.2). Fractions with similar composition were pooled (**Table 11.39**) and evaporated.

**Table 11.39.** Fractionation of EtOAc extract of cranberry by FCPC Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:5:2:5, v/v/v/v).

| Major fraction | Fractions | Mass (mg) |
|----------------|-----------|-----------|
| D <sub>1</sub> | 1–18      | 327       |
| D <sub>2</sub> | 19–25     | 105       |
| D <sub>3</sub> | 26–60     | 123       |
| D <sub>4</sub> | 61–72     | 1327      |

The major fraction D<sub>2</sub> was analysed by HPLC–DAD/ESI–MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4) The separation was carried out using acetonitrile (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of formic acid v/v, at a flow rate of 0.400 mL/min. The gradient programme consist in a linear gradient from 10 to 13% A in 40 min, a linear gradient from 13 to 50% A in 5 min and other 2 min to return to initial conditions. Mass spectrometric operation parameters were: capillary voltage: 4 kV; capillary exit voltage: –0.1 kV; nebulizer pressure: 50 psi; dry gas: 10 L min<sup>–1</sup> and gas temperature: 350 °C. The fragmentation setting used for MS/MS analyses were: Energy: 1.0 V; width: 4 *m/z* and time: 40 ms. Fraction D<sub>2</sub> was composed of a mixture of catechin and epicatechin, identified comparing their retention times with those of commercial standards, and four dimeric A-type proanthocyanidins.

### Catechin (18)



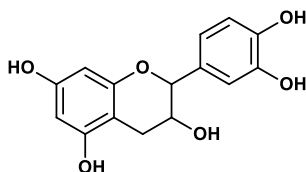
Catechin (18)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 289  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 246 (17), 245 (100), 205 (25), 203 (20), 179 (16).

**Retention time:** 6.1 min (**Figure 4.35**, section 4.5.2).

### Epicatechin (19)



Epicatechin (19)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 289  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 246 (17), 245 (100), 205 (57), 203 (25), 179 (32),  
175 (12), 165 (10).

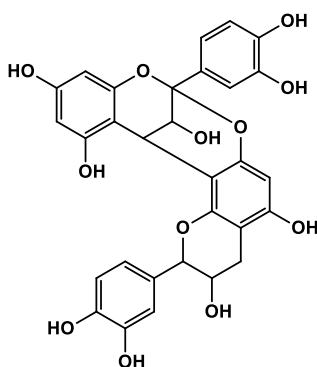
**Retention time:** 10.3 min (**Figure 4.35**, section 4.5.2).



**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 539 (33), 449 (100), 447 (27), 423 (22), 407 (30), 327 (28), 289 (68), 285 (38), 243 (14).

**Retention time:** 21.3 min (**Figure 4.35**, section 4.5.2).

**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (Isomer III) (22)**



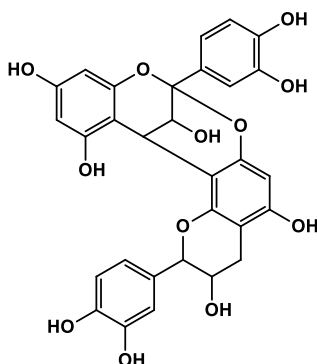
**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (22)**

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 575 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 539 (19), 453 (20), 449 (100), 447 (25), 423 (19), 407 (21), 289 (61), 287 (18), 286 (36).

**Retention time:** 28.2 min (**Figure 4.35**, section 4.5.2).

**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (Isomer IV) (32)**



**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (32)**

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 575  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 539 (23), 453 (23), 449 (100), 447 (22), 423 (18), 407 (22), 289 (53), 285 (33).

**Retention time:** 30.7 min (**Figure 4.35**, section 4.5.2).

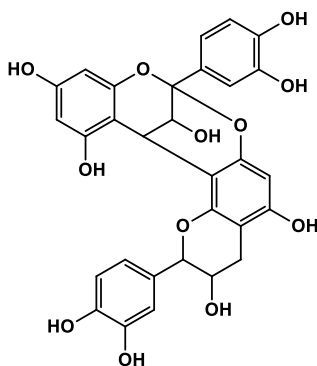
D<sub>2</sub> was further chromatographed by open column chromatography (Section 10.2.2) on 50 g of silica gel 60 (0.040-0.063 mm). A mixture of DCM:EtOH (85:15, v/v) was used as mobile phase. Eleven fractions of 12 mL were collected and monitored by TLC (Section 10.2.1) and HPLC-DAD (Instrument A; section 10.2.4; elution method D, section 11.5.2) (**Table 11.40**).

**Table 11.40.** Fractionation of D<sub>2</sub> by open column chromatography DCM:EtOH (85:15, v/v).

| Fractions             | Mass (mg) |
|-----------------------|-----------|
| D <sub>2</sub> (I)    | 4         |
| D <sub>2</sub> (II)   | 14        |
| D <sub>2</sub> (III)  | 35        |
| D <sub>2</sub> (IV)   | 45        |
| D <sub>2</sub> (V)    | 10        |
| D <sub>2</sub> (VI)   | 1         |
| D <sub>2</sub> (VII)  | 2         |
| D <sub>2</sub> (VIII) | 1         |
| D <sub>2</sub> (IX)   | 2         |
| D <sub>2</sub> (X)    | 1         |
| D <sub>2</sub> (XI)   | 1         |

D<sub>2</sub>(IV) was composed of a mixture of four dimeric A-type procyanidins, identified above (**40**, **21**, **22** y **32**), and two more, which were tentatively identified by HPLC–DAD/ESI–MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4) as follows:

**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (Isomer V) (**41**)**



(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (**41**)

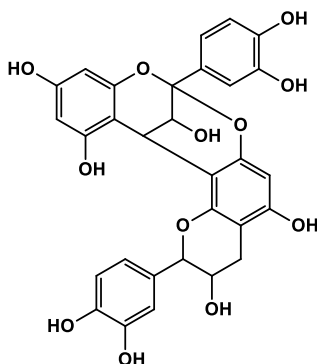


**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 575  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 539 (41), 449 (100), 447 (37), 423 (84), 407 (31), 289 (66), 285 (43).

**Retention time:** 40.5 min (**Figure 4.35**, section 4.5.2).

**(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (Isomer VI) (42)**



(Epi)catechin-(2→O→7,4→8)-(epi)catechin (**42**)

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 575  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 539 (22), 453 (12), 449 (50), 423 (100), 407 (18), 289 (27), 285 (39).

**Retention time:** 45.1 min (**Figure 4.35**, section 4.5.2).

According to the MS fragmentation patterns and their HPLC retention times (comparing with standard) compounds **21** and **22** may be identified as *ent*-epicatechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catechin and *ent*-epicatechin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epicatechin, which had previously been isolated and characterized from wood of *P. domestica* L. (Section 11.2.4). On the other hand, peaks **40** and **32** were identified according to their retention times as procyanidins A-1 and A-2, respectively.

#### **11.5.4 Quantification of procyanidins in cranberry fraction D<sub>2</sub>(IV) by HPLC-DAD**

Identified compounds (**21, 22, 32, 40–42**) (Section 11.5.3) were quantified in fraction D<sub>2</sub>(IV) of the EtOAc extract prepared from a commercial cranberry extract (Section 11.5.1). It was achieved making use of an external-standard method, following the elution method D (Section 11.5.2). Calibration curves constructed previously for (–)-catechin (Section 11.1.6) and procyanidin A-2 (Section 11.2.5) were employed (**Table 11.41**). The concentration of each compound in fraction D<sub>2</sub>(IV) was determined comparing HPLC peak areas at 280 nm with the calibration curves of selected compounds from the same phenolic group.

**Table 11.41.** Calibration curves for quantification work on cranberry.

| Compound        | Calibration curve                          |
|-----------------|--------------------------------------------|
| (–)-Catechin    | $y = 9000000x - 129376$ ( $r^2 = 0.9934$ ) |
| Procyanidin A-2 | $y = 9000000x - 194161$ ( $r^2 = 0.9984$ ) |

Samples of cranberry EtOAc extracts were prepared in MeOH at a concentration of 5 mg/mL, and 5  $\mu$ L of each one was injected on HPLC-DAD (Instrument A; section 10.2.4). Concentrations were calculated as stated above.



## **12. EXTRACTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF PENTACYCLIC TRITERPENOIDS IN *Olea europaea* L.**

### **12.1 Collection and extraction of olive samples**

Samples of fruit, leaf, stem and root of olive trees of the cultivars 'Picual', 'Koroneiki', and 'Frantoio' were collected in the "garden of olive tree cultivars" of the research centre IFAPA "Alameda del Obispo", Córdoba, Spain, in October 2016 and November 2016. Fresh samples were immediately protected with aluminium foil, labelled and immersed in liquid nitrogen to stop enzymatic activity. Then, samples were stored in a freezer at -80 °C until use.

Before extraction, samples of leaves, roots, fruits (previously weighed and destoned), and stems were pulverized in a mortar under liquid nitrogen. Then, samples were oven dried at 100 °C for 12 h.

The extraction of dry samples was carried out following the extraction procedure C: 0.125 g of dry tissue (fruit pulps, leaves, stems or roots) was mixed with 1.5 mL of MeOH/EtOH (1:1, v/v). After vigorous shaking in a Vortex shaker for 1 min and sedimentation, the sample was centrifuged at 7700g for 5 min at 4 °C. The supernatant was removed and collected in another tube. The residue was again re-extracted 5 times with the same volume of MeOH/EtOH. All supernatants were pooled and evaporated with a SpeedVac vacuum concentrator.<sup>437</sup>

### **12.2 HPLC–DAD analyses of alcoholic extracts of olive fruit pulps, leaves and stems**

The dry extracts prepared as described in previous section were re-dissolved in 1 mL of MeOH to be analysed by HPLC–DAD (Instrument B; section 10.2.4). The mobile phase used was composed of a mixture of MeOH and water with acetic acid (pH 3.1) at a ratio of 92:8 (v/v). The separation was carried out using an isocratic method (Elution method E) for 20 minutes at 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The absorbance was recorded at 210 nm, and the injected volume was of 20 µL.

### 12.3 HPLC–DAD/ESI–MS analyses of alcoholic extract of olive roots

The dry extracts of olive roots prepared as described previously (Section 12.1) were re-dissolved in 1 mL of MeOH to be analysed by HPLC–DAD/ESI–MS (Instrument E; analytical column B; section 10.4). A mixture of MeOH/water (98:2, v/v) with 0.1% of formic acid was used as mobile phase. Separation was achieved using an isocratic elution at a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. Temperature and total time of chromatographic analysis were 30 °C and 15 minutes, respectively. Mass spectrometric operation parameters were: capillary voltage: 4 kV; capillary exit voltage: –0.3 kV; nebulizer pressure: 60 psi; dry gas: 11 L min<sup>-1</sup> and gas temperature: 350 °C. The fragmentation setting used for MS/MS analyses were: Energy: 0.8 V; width: 4 *m/z* and time: 40 ms.

### 12.4 Quantification of triterpenoids in olive samples by HPLC–DAD and HPLC–DAD/ESI–MS

Oleanolic acid (OA), maslinic acid (MA), ursolic acid (UA), betulinic acid (BA), erythrodiol (Er) and uvaol (Uv) were quantified in olive samples making use of an external-standard method. Commercial standards of some of these compounds (MA, OA, Er, Uv) were used to make calibration curves: six solutions in MeOH at different concentration of each standard were prepared and injected in the HPLC–DAD (Instrument B, section 10.2.4; elution method E, section 12.2). HPLC peak areas of standards at 210 nm were used to build the calibration curves (**Table 12.1**).

**Table 12.1.** Calibration curves for quantification work on olive samples (fruit, leaf, stem) by HPLC–DAD.

| Compound            | Calibration curve <sup>a</sup> |
|---------------------|--------------------------------|
| Maslinic acid (MA)  | y= 12112280.65x + 5463.35      |
| Oleanolic acid (OA) | y= 10699825.87x – 121293.19    |
| Eritrodiol (Er)     | y= 9795655.56x + 92910.13      |
| Uvaol (Uv)          | y= 7497918x + 14093.16         |

<sup>a</sup>In all cases, the correlation coefficient (R<sup>2</sup>) was 0.99 or above.

Commercial standards of some of these compounds (MA, OA, BA) were used to make calibration curves for their quantification in olive roots: six solutions in MeOH at different concentration of each standard were prepared and injected in the HPLC–DAD/ESI–MS (Instrument E; analytical column B; section 10.4). Relationships between peak areas and concentrations of each solution allowed building the calibration curves (**Table 12.2**).

**Table 12.2.** Calibration curves for quantification work on olive roots by HPLC–DAD/ESI–MS.

| Compound            | Calibration curve <sup>a</sup> |
|---------------------|--------------------------------|
| Maslinic acid (MA)  | $y = 317987991.71146x$         |
| Oleanolic acid (OA) | $y = 2293640505.391x$          |
| Betulinic acid (BA) | $y = 9795655.56x + 92910.13$   |

<sup>a</sup>In all cases, the correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.95 or above.

Samples were analysed in triplicate and results expressed as mean  $\pm$  SD. Concentration of compounds of interest were determined by comparison between peak area of each one and calibration curves (**Table 12.3** and **Table 12.4**).

**Table 12.3.** Concentration of triterpenoids in olive samples collected in October 2016.

| Sample <sup>a</sup> | MA <sup>b</sup> | OA <sup>b</sup> | BA <sup>b</sup> | Er <sup>b</sup> | Uv <sup>b</sup> |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fp                  | 4.051 ± 0.0004  | 1.399 ± 0.001   | N.D             | N.D             | N.D             |
| Pp                  | 4.700 ± 0.013   | 1.583 ± 0.004   | N.D             | N.D             | N.D             |
| Kp                  | 7.190 ± 0.060   | 2.022 ± 0.017   | N.D             | N.D             | N.D             |
| Fl                  | 2.379 ± 0.017   | 17.201 ± 0.153  | N.D             | 0.183 ± 0.074   | 1.465 ± 0.008   |
| Pl                  | 3.886 ± 0.043   | 19.223 ± 0.135  | N.D             | 0.935 ± 0.044   | 0.852 ± 0.030   |
| Kl                  | 1.856 ± 0.019   | 14.404 ± 0.087  | N.D             | 2.576 ± 0.008   | 2.554 ± 0.006   |
| Fs                  | 2.238 ± 0.022   | 9.417 ± 0.023   | N.D             | 1.211 ± 0.004   | 0.216 ± 0.003   |
| Ps                  | 1.921 ± 0.019   | 7.678 ± 0.025   | N.D             | 1.100 ± 0.008   | 0.248 ± 0.002   |
| Ks                  | 1.025 ± 0.005   | 5.041 ± 0.030   | N.D             | 0.634 ± 0.001   | 0.055 ± 0.002   |
| Fr                  | 0.408 ± 0.040   | 0.110 ± 0.029   | 0.075 ± 0.010   | N.D             | N.D             |
| Pr                  | 0.568 ± 0.060   | 0.137 ± 0.048   | 0.084 ± 0.026   | N.D             | N.D             |
| Kr                  | 0.837 ± 0.100   | 0.127 ± 0.016   | 0.101 ± 0.012   | N.D             | N.D             |

N.D (Not detected); <sup>a</sup> Fp (Frantoio pulp), Pp (Picual pulp), Kp (Koroneiki pulp), Fl (Frantoio leaf), Pl (Picual leaf), Kl (Koroneiki leaf), Fs (Frantoio stem), Ps (Picual stem), Ks (Koroneiki stem), Fr (Frantoio root), Pr (Picual root), Kr (Koroneiki root); <sup>b</sup>MA (Maslinic acid), OA (Oleanolic acid), BA (Betulinic acid), Er(Erythrodiol), Uv (Uvaol); Results are expressed as mean (mg compound · g dry sample<sup>-1</sup> ± SD).

**Table 12.4.** Concentration of triterpenoids in olive samples collected in November 2016.

| Sample <sup>a</sup> | MA <sup>b</sup> | OA <sup>b</sup> | BA <sup>b</sup> | Er <sup>b</sup> | Uv <sup>b</sup> |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fp                  | 4.148 ± 0.046   | 1.302 ± 0.014   | N.D             | N.D             | N.D             |
| Pp                  | 5.509 ± 0.031   | 1.481 ± 0.008   | N.D             | N.D             | N.D             |
| Kp                  | 7.642 ± 0.040   | 2.103 ± 0.011   | N.D             | N.D             | N.D             |
| Fl                  | 3.884 ± 0.028   | 22.530 ± 0.097  | N.D             | 2.051 ± 0.010   | 1.640 ± 0.005   |
| Pl                  | 4.136 ± 0.026   | 26.199 ± 0.178  | N.D             | 0.996 ± 0.005   | 1.060 ± 0.001   |
| Kl                  | 2.362 ± 0.023   | 13.852 ± 0.067  | N.D             | 2.127 ± 0.014   | 2.114 ± 0.009   |
| Fs                  | 1.278 ± 0.002   | 6.252 ± 0.041   | N.D             | 0.400 ± 0.004   | 0.060 ± 0.002   |
| Ps                  | 1.269 ± 0.006   | 4.581 ± 0.013   | N.D             | 0.525 ± 0.001   | 0.120 ± 0.003   |
| Ks                  | 0.322 ± 0.003   | 2.305 ± 0.009   | N.D             | 0.105 ± 0.003   | N.D             |
| Fr                  | 0.238 ± 0.023   | N.D             | 0.028 ± 0.002   | N.D             | N.D             |
| Pr                  | 0.340 ± 0.016   | 0.025 ± 0.004   | 0.124 ± 0.005   | N.D             | N.D             |
| Kr                  | 0.158 ± 0.005   | N.D             | 0.037 ± 0.005   | N.D             | N.D             |

N.D (Not detected); M.A (Maslinic acid), OA (Oleanolic acid), BA (Betulinic acid), Er(Erythrodiol), Uv (Uvaol); <sup>a</sup> Fp (Frantoio pulp), Pp (Picual pulp), Kp (Koroneiki pulp), Fl (Frantoio leaf), Pl (Picual leaf), Kl (Koroneiki leaf), Fs (Frantoio stem), Ps (Picual stem), Ks (Koroneiki stem), Fr (Frantoio root), Pr (Picual root), Kr (Koroneiki root); <sup>b</sup> Results are expressed as mean (mg compound · g dry sample<sup>-1</sup> ± SD).





### **13. ISOLATION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SECOIRIDOIDS IN *Olea europaea* L.**

#### **13.1 Isolation of oleacein, oleocanthal and aglycones of oleuropein and ligustroside from olive oil**

##### ***13.1.1 Collection and extraction of olive oil***

A sample of olive oil obtained from ripe olives, supplied by Drs. Francisco Espínola and Manuel Moya (Area of Chemical Engineering, University of Jaén, Spain), was extracted following two methods:

(Extraction method D): An olive oil sample (5 g) was transferred into a separatory funnel and extracted with a mixture of MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) (3×5 mL). The upper phases were pooled with the oil phase and sonicated at room temperature for 15 minutes. Total volume was decanted again and the upper phase was separated from the rest. The hydroalcoholic phase was centrifuged at 4.500 rpm for 25 minutes to remove olive oil remains. Finally, supernatant phases were combined and evaporated under reduced pressure at temperatures not higher than 40°C. Resulting dry extract was stored under argon at -20 °C until use.<sup>524</sup>

(Extraction method E): An olive oil sample (10 g) was transferred into a separatory funnel and was dissolved with 12 mL of cyclohexane. Then, the mixture was extracted with MeCN (3×12 mL). Total volume was centrifuged at 4.500 rpm for 25 minutes. Finally, supernatant phases were combined and evaporated under reduced pressure at temperatures not higher than 40°C. Resulting dry extract was stored under argon at -20 °C until use.<sup>525</sup>

Finally, extraction procedure D was selected to extract a sample (300 g) of this olive oil, and the resulting dry extract (1.5 g) was stored at -20 °C until analysis.

##### ***13.1.2 Analysis of hydroalcoholic extracts of olive oil by HPLC-DAD***

Solutions of the two olive oil extracts, obtained by both extraction procedures, were prepared in MeCN at a concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup> was prepared and analysed by

HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Separations were carried out using a gradient elution. Mobile phase was composed of a mixture of MeOH/MeCN/AcOH (49.9:49.9:0.2, v/v/v, solvent A) and water/AcOH (99.8:0.2, v/v, Solvent C) at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. Five µL of sample were injected in the HPLC–DAD. The gradient program consisted in (Elution method F): linear gradient from 4 to 50% A in 40 minutes; linear gradient from 50 to 60% A in 5 minutes; linear gradient from 60 to 100% in 15 minutes; 100% A for 10 min; and other 12 minutes to return to the initial conditions.

### ***13.1.3 Analysis of hycroalcoholic extract by HPLC–DAD/ESI–MS***

A solution of olive oil extract, obtained by extraction procedure D, was prepared in MeCN at a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> was prepared and analysed by HPLC–DAD/ESI–MS (Instrument E; analytical column A; section 10.4). The separation was carried out using a mixture of MeOH/MeCN/AcOH (49.9:49.9:0.2, v/v/v, solvent A) and water/AcOH (99.8:0.2, v/v, Solvent C) at a flow rate of 0.20 mL min<sup>-1</sup>. The gradient program consisted in: linear gradient from 4 to 50% A in 16 minutes; linear gradient from 50 to 60% A in 2 minutes; linear gradient from 60 to 100% in 6 minutes; 100% A for 4 min; and other 2 minutes to return to the initial conditions. Mass spectrometric operation parameters were: capillary voltage: 4.5 kV; capillary exit voltage: –0.5 kV; nebulizer pressure: 50 psi; dry gas: 10 L min<sup>-1</sup> and gas temperature: 365 °C. The fragmentation setting used for MS/MS analyses were: Energy: 0.6 V; width: 4 *m/z* and time: 40 ms.

### ***13.1.4 Chromatographic fractionation of olive oil extract and purification of phenolics***

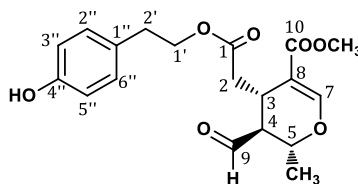
1.5 g of olive oil extract was chromatographed by FCPC (Section 10.2.3) using Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:3:2:3, v/v/v/v) as quaternary binary solvent system. Seventeen fractions (12 mL each) were collected, all in ascending mode, and monitored by HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4) using elution method F (Section 13.1.2). Fractions with similar composition were pooled and evaporated under reduced pressure at temperatures not higher than 40°C (**Table 13.1**).

**Table 13.1.** Fractionation of olive oil extract by FCPC  
(Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 2:3:2:3, v/v/v/v).

| Major fractions | Fractions | Mass (mg) |
|-----------------|-----------|-----------|
| E <sub>1</sub>  | 2–3       | 160       |
| E <sub>2</sub>  | 4–5       | 180       |
| E <sub>3</sub>  | 8–17      | 200       |

Fraction E<sub>1</sub> was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4) using as solvents MeCN/AcOH (99.8:0.2, v/v, solvent A) and H<sub>2</sub>O/AcOH (99.8:0.2, v/v, solvent B) at a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. Separations were carried out with a linear gradient from 20 to 25% A. Two pure compounds were isolated and identified as the aldehydic form of ligustroside aglycon (**51**, 16 mg) (**Table 13.2**) and the aldehydic form of oleuropein aglycon (**50**, 12 mg) (**Table 13.3**).

#### Aldehydic form of ligustroside aglycone (**51**)



Monoaldehydic form of ligustroside aglycone (Major diastereoisomer) (**51**)

Yellow oil

$[\alpha]_D^{25} +14.5^\circ$  (*c* 1.1 cg/mL, CHCl<sub>3</sub>).

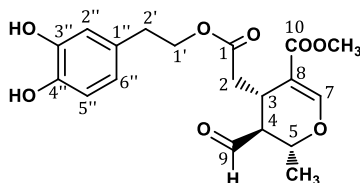
**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 361 [M–H]<sup>–</sup>.

**ESI-MS-MS:** *m/z* (negative mode): 291 (100), 259 (79).

**Retention time:** 42.4 min (**Figure 6.2**, section 6.1.1).

**Table 13.2.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **51**.

| Monoaldehydic form of ligustroside aglycone (Major diastereoisomer) ( <b>51</b> ) |                                          |      |                                    |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------|------------------------------------|------|
| $\delta$ (ppm)                                                                    |                                          |      |                                    |      |
| Position                                                                          | <sup>1</sup> H                           | COSY | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC |
| 1                                                                                 | -                                        | -    | (171.85)                           | -    |
| 2a                                                                                | 2.50-2.57 ( <i>m</i> )                   | -    | 36.98                              | -    |
| 2b                                                                                | 2.87-2.91 ( <i>m</i> )                   | -    | 36.98                              | -    |
| 3                                                                                 | 3.36-3.40 ( <i>m</i> )                   | -    | 27.08                              | -    |
| 4                                                                                 | 2.53-2.57 ( <i>m</i> )                   | -    | 54.26                              | -    |
| 5                                                                                 | 4.39 ( <i>quint</i> , $J_{5,2b}=6.4$ Hz) | -    | 70.71                              | -    |
| CH <sub>3</sub> -5                                                                | 1.37 ( <i>d</i> , $J_{CH3-5,5}=6.7$ )    | -    | 19.30                              | -    |
| 7                                                                                 | 7.55 ( <i>brs</i> )                      | -    | 154.47                             | -    |
| 8                                                                                 | -                                        | -    | (106.49)                           | -    |
| 9                                                                                 | 9.49 ( <i>d</i> , $J_{9,4}=1.8$ Hz)      | -    | 199.93                             | -    |
| 10                                                                                | -                                        | -    | (167.07)                           | -    |
| O-CH <sub>3</sub>                                                                 | 3.71 ( <i>s</i> )                        | -    | 51.37                              | -    |
| 1'                                                                                | 4.24-4.29 ( <i>m</i> )                   | -    | 65.23                              | -    |
| 2'                                                                                | 2.84 ( <i>t</i> , $J_{2',1'}=6.7$ Hz)    | -    | 34.08                              | -    |
| 1''                                                                               | -                                        | -    | (129.52)                           | -    |
| 2''                                                                               | 7.05 ( <i>d</i> , $J_{2'',3''}=8.5$ Hz)  | -    | 129.98                             | -    |
| 3''                                                                               | 6.75 ( <i>d</i> , $J_{3'',2''}=8.5$ Hz)  | -    | 115.39                             | -    |
| 4''                                                                               | -                                        | -    | (155.45)                           | -    |
| 5''                                                                               | 6.75 ( <i>d</i> , $J_{5'',6''}=8.5$ Hz)  | -    | 115.39                             | -    |
| 6''                                                                               | 7.05 ( <i>d</i> , $J_{6'',5''}=8.5$ Hz)  | -    | 129.98                             | -    |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.**Aldehydic form of oleuropein aglycone (50)**Monoaldehydic form of oleuropein aglycone (Major diastereoisomer) (**50**)

Yellow oil

$[\alpha]_D^{25} +14.5^\circ$  (c 1.3 cg/mL, CHCl<sub>3</sub>).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 377 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 345 (11), 307 (100), 275 (81), 149 (7).

**Retention time:** 38.4 min (**Figure 6.2**, section 6.1.1).

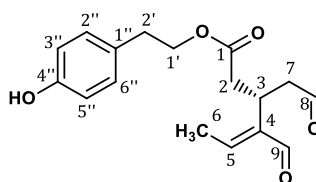
**Table 13.3.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **50**.

| <b>Monoaldehydic form of oleuropein aglycone (Major diastereoisomer) (50) <math>\delta</math>(ppm)</b> |                                                               |                     |                                         |                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                        | <b><sup>1</sup>H</b>                                          | <b>COSY</b>         | <b><sup>13</sup>C, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                            |
| 1                                                                                                      | -                                                             | -                   | (171.84)                                | -                                      |
| 2a                                                                                                     | 2.54 ( <i>dd</i> , $J_{2a,3}= 9.6$ ;<br>$J_{2a,2b}= 16.1$ Hz) | 2.86, 3.37          | 37.09                                   | 26.91, 54.35, 171.84                   |
| 2b                                                                                                     | 2.86 ( <i>dd</i> , $J_{2b,3}= 3.5$ ;<br>$J_{2b,2a}= 16.1$ Hz) | 2.54, 3.37          | 37.09                                   | 26.91, 54.35, 171.84                   |
| 3                                                                                                      | 3.36-3.38 ( <i>m</i> )                                        | 2.54, 2.86          | 26.91                                   | 106.33, 167.68, 171.84,<br>200.15      |
| 4                                                                                                      | 2.58 ( <i>dt</i> , $J_{4,9}= 1.5$ ; $J_{4,2b}= 16.1$ Hz)      | 3.37, 4.43,<br>9.48 | 54.35                                   | 26.91, 37.09, 70.76,<br>106.33, 200.15 |
| 5                                                                                                      | 4.43 ( <i>quint</i> , $J_{5,2b}= 6.5$ Hz)                     | 3.37, 2.58          | 70.76                                   | 19.28, 26.91, 54.35,<br>155.89, 200.15 |
| CH <sub>3</sub> -5                                                                                     | 1.37 ( <i>d</i> , $J_{CH3-5,5}= 6.7$ )                        | 4.43                | 19.28                                   | 54.35, 70.76                           |
| 7                                                                                                      | 7.56 ( <i>s</i> )                                             | -                   | 155.89                                  | 26.91, 70.79, 106.33,<br>167.68        |
| 8                                                                                                      | -                                                             | -                   | (106.33)                                | -                                      |
| 9                                                                                                      | 9.48 ( <i>d</i> , $J_{9,4}= 1.5$ Hz)                          | 2.58                | 200.15                                  | 54.35                                  |
| 10                                                                                                     | -                                                             | -                   | (167.68)                                | -                                      |
| O-CH <sub>3</sub>                                                                                      | 3.71 ( <i>s</i> )                                             | -                   | 51.61                                   | -                                      |
| 1'                                                                                                     | 4.14-4.35 ( <i>m</i> )                                        | 2.78                | 65.23                                   | 130.31, 171.84                         |
| 2'                                                                                                     | 2.78 ( <i>t</i> , $J_{2',1'}= 6.3$ Hz)                        | 4.14-4.35           | 34.13                                   | 65.23, 116.20, 121.17,<br>130.31       |
| 1''                                                                                                    | -                                                             | -                   | (130.31)                                | -                                      |
| 2''                                                                                                    | 6.74-6.78 ( <i>m</i> )                                        | 6.58-6.60           | 116.20                                  | 121.17, 130.31, 142.92                 |
| 3''                                                                                                    | -                                                             | -                   | (142.92)                                | -                                      |
| 4''                                                                                                    | -                                                             | -                   | (143.45)                                | -                                      |
| 5''                                                                                                    | 6.74-6.78 ( <i>m</i> )                                        | 6.58-6.60           | 115.23                                  | 121.17, 130.31, 142.92                 |
| 6''                                                                                                    | 6.58-6.60 ( <i>m</i> )                                        | 6.74-7.78           | 121.17                                  | 116.20, 142.92                         |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

Fraction E<sub>2</sub> was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4) using as solvents MeCN/AcOH (99.8:0.2, v/v, solvent A) and H<sub>2</sub>O/AcOH (99.8:0.2, v/v, solvent B) at a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. Separations were carried out with a linear gradient from 20 to 25% A. Pure (–)-oleocanthal (**49**, 25 mg) (**Table 13.4**) and the monoaldehydic form of oleuropein aglycon (**50**, 18 mg) were obtained.

### (–)-Oleocanthal (**49**)



(–)-Oleocanthal (**49**)

Yellow oil

$[\alpha]_D^{25} -1.7^\circ$  (*c* 1.1 cg/mL, CHCl<sub>3</sub>).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 303 [M–H]<sup>–</sup>.

**ESI-MS-MS:** *m/z* (negative mode): 285 (50), 179 (30), 165 (100).

**Retention time:** 34.3 min (**Figure 6.2**, section 6.1.1).

**Table 13.4.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **49**.

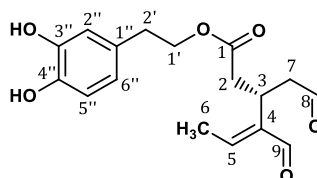
| (–)-Oleocanthal ( <b>49</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                            |                 |                                    |                                                      |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Position                                     | <sup>1</sup> H                                             | COSY            | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                                                 |
| 1                                            | -                                                          | -               | (172.02)                           | -                                                    |
| 2a                                           | 2.61 ( <i>dd</i> , $J_{2a,3}= 6.8$ ; $J_{2a,2b}= 15.9$ Hz) | 2.67, 3.56-3.63 | 36.85                              | 27.19, 46.13, 143.18, 172.02                         |
| 2b                                           | 2.67 ( <i>dd</i> , $J_{2b,3}= 8.3$ ; $J_{2b,2a}= 15.9$ Hz) | 2.61, 3.56-3.63 | 36.85                              | 27.19, 46.13, 143.18, 172.02                         |
| 3                                            | 3.56-3.63 ( <i>m</i> )                                     | 2.61, 2.67      | 27.21                              | 36.85, 46.13, 143.18, 154.57, 172.02, 195.28, 200.59 |
| 4                                            | -                                                          | -               | (143.18)                           | -                                                    |
| 5                                            | 6.62 ( <i>q</i> , $J_{5,6}= 7.1$ Hz)                       | 2.05            | 154.57                             | 15.24, 27.19, 195.28                                 |

|     |                                                                                   |                       |          |                               |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------|-------------------------------|
| 6   | 2.05 ( <i>d</i> , $J_{6,5}$ = 7.1 Hz)                                             | 6.62                  | 15.24    | 143.18, 154.57, 195.28        |
| 7a  | 2.73 ( <i>ddd</i> , $J_{7a,8}$ = 1.0;<br>$J_{7a,3}$ = 5.4; $J_{7a,7b}$ = 18.3 Hz) | 2.95, 3.56-3.63, 9.61 | 46.14    | 27.21, 36.85, 143.18, 200.59  |
| 7b  | 2.95 ( <i>ddd</i> , $J_{7b,8}$ = 0.9;<br>$J_{7b,3}$ = 8.6; $J_{7b,7a}$ = 18.3 Hz) | 2.95, 3.56-3.63, 9.61 | 46.14    | 27.21, 36.85, 143.18, 200.59  |
| 8   | 9.61 ( <i>brs</i> )                                                               | 2.73, 2.95            | 200.59   | 27.21, 46.14                  |
| 9   | 9.21 ( <i>d</i> , $J_{9,7a}$ = 2.1 Hz)                                            | 3.56-3.63             | 195.28   | 27.21, 143.18                 |
| 1'  | 4.14-4.24 ( <i>m</i> )                                                            | 2.80                  | 65.20    | 34.11, 129.56, 172.02         |
| 2'  | 2.80 ( <i>t</i> , $J_{2',1}$ = 6.9 Hz)                                            | 4.14-4.24             | 34.11    | 65.20, 129.99                 |
| 1'' | -                                                                                 | -                     | (129.56) | -                             |
| 2'' | 7.03 ( <i>d</i> , $J_{2'',3''}$ = 8.6 Hz)                                         | 6.74                  | 129.99   | 34.11, 115.36, 129.99, 154.46 |
| 3'' | 6.74 ( <i>d</i> , $J_{3'',2''}$ = 8.6 Hz)                                         | 7.03                  | 115.36   | 115.35, 129.56, 154.46        |
| 4'' | -                                                                                 | -                     | (154.46) | -                             |
| 5'' | 6.74 ( <i>d</i> , $J_{5'',6''}$ = 8.6 Hz)                                         | 7.03                  | 115.36   | 115.35, 129.56, 154.46        |
| 6'' | 7.03 ( <i>d</i> , $J_{6'',5''}$ = 8.6 Hz)                                         | 6.74                  | 129.98   | 34.11, 115.36, 129.99, 154.46 |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

Fraction E<sub>3</sub> was chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4) using the elution method described in the above paragraph. As a result, 32 mg of a pure compound, identified as (-)-oleacein (**48**) (**Table 13.5**), was obtained.

### **(-)-Oleacein (48)**



(-)-Oleacein (**48**)

Yellow oil

$[\alpha]_D^{25}$  -4.5° (c 1.0 cg/mL, CHCl<sub>3</sub>).



**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 319 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 301 (16), 195 (100), 181 (7), 165 (28).

**Retention time:** 29.6 min (**Figure 6.2**, section 6.1.1).

**Table 13.5.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **48**.

| (-)-Oleacein ( <b>48</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                                       |                            |                              |                                              |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| Position                                  | <sup>1</sup> H                                                        | COSY                       | <sup>13</sup> C <sup>a</sup> | HMBC                                         |
| 1                                         | -                                                                     | -                          | (172.00)                     | -                                            |
| 2a                                        | 2.60 (dd, $J_{2a,3}$ = 6.6; $J_{2a,2b}$ = 15.7 Hz)                    | 2.67, 3.57-3.65            | 36.94                        | 27.16, 46.21, 143.13, 172.00                 |
| 2b                                        | 2.67 (dd, $J_{2b,3}$ = 7.1; $J_{2b,2a}$ = 15.7 Hz)                    | 2.67, 3.57-3.65            | 36.94                        | 27.16, 46.21, 143.13, 172.00                 |
| 3                                         | 3.57-3.65 (m)                                                         | 2.61, 2.67                 | 27.16                        | 36.94, 46.21, 143.13, 155.20, 195.77, 200.96 |
| 4                                         | -                                                                     | -                          | (143.13)                     | -                                            |
| 5                                         | 6.63 (q, $J_{5,6}$ = 7.0 Hz)                                          | 2.04                       | 155.20                       | 15.26, 27.16, 195.77                         |
| 6                                         | 2.04 (d, $J_{6,5}$ = 7.0 Hz)                                          | 6.63                       | 15.26                        | 143.16, 155.20, 195.77                       |
| 7a                                        | 2.72-2.78 (m)                                                         | -                          | 46.21                        | -                                            |
| 7b                                        | 2.92 (ddd, $J_{7b,8}$ = 1.2; $J_{7b,3}$ = 8.3; $J_{7b,7a}$ = 18.4 Hz) | 2.72-2.78, 3.57-3.65, 9.62 | 46.21                        | 27.16, 36.94, 143.16, 200.96                 |
| 8                                         | 9.62 (brs)                                                            | 2.72-2.78, 2.92            | 200.96                       | 27.16, 46.21                                 |
| 9                                         | 9.19 (d, $J_{9,7b}$ = 1.9 Hz)                                         | 3.57-3.65                  | 195.77                       | 27.16, 143.16                                |
| 1'                                        | 4.11-4.24 (m)                                                         | 2.75-2.78                  | 65.22                        | 130.43, 172.00                               |
| 2'                                        | 2.75-2.78 (m)                                                         | -                          | 34.21                        | -                                            |
| 1''                                       | -                                                                     | -                          | (130.43)                     | -                                            |
| 2''                                       | 6.69 (d, $J_{2'',6''}$ = 1.9 Hz)                                      | 6.58                       | 116.26                       | 34.21, 121.17, 143.51                        |
| 3''                                       | -                                                                     | -                          | (143.51)                     | -                                            |
| 4''                                       | -                                                                     | -                          | (142.73)                     | -                                            |
| 5''                                       | 6.77 (d, $J_{5'',6''}$ = 8.1 Hz)                                      | 6.58                       | 115.26                       | 130.43, 142.73                               |
| 6''                                       | 6.58 (dd, $J_{6'',2''}$ = 1.9 Hz; $J_{6'',5''}$ = 8.1 Hz)             | 6.69, 6.77                 | 121.17                       | 34.2, 116.26, 143.51                         |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

## 13.2 Content of (-)-oleacein and (-)-oleocanthal in olive oils

### 13.2.1 Collection and extraction of olive oils

Olive oil samples were acquired from several oil mills (**Table 13.6**). Unfiltered olive oils were filtered before storing. All samples were stored at -20 °C until use.

**Table 13.6.** Collection and processing of olive oils.

| Reference       | Location                    | Collection date | Extraction date |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| AOVE-Koroneiki  | Baeza <sup>a</sup>          | 07/04/2017      | 03/07/2017      |
| AOVE-Arbequina  | Baeza <sup>a</sup>          | 07/04/2017      | 03/07/2017      |
| AOVE-Frantoio   | Baeza <sup>a</sup>          | 07/04/2017      | 03/07/2017      |
| AOVE-Cornicabra | Ciudad Real                 | 27/01/2017      | 07/07/2017      |
| AOVE-Picudo     | Castro del Río <sup>b</sup> | 03/01/2018      | 12/04/2018      |
| AOVE-Picual_1   | Baeza <sup>a</sup>          | 07/04/2017      | 03/07/2017      |
| AOV-Picual_3    | Sabiote <sup>a</sup>        | 23/05/2017      | 23/05/2017      |
| AOV-Picual_4    | Alcaudete <sup>a</sup>      | 08/01/2018      | 12/04/2018      |
| AOV-Picual_5    | Jaén <sup>a</sup>           | 11/02/2018      | 12/04/2018      |
| AOV-Picual_6    | Montoro <sup>b</sup>        | 22/11/2017      | 07/12/2017      |
| AOVE-Picual_7   | Pegalajar <sup>a</sup>      | 18/01/2018      | 12/04/2018      |
| AOR_1           | Mancha Real <sup>a</sup>    | 10/11/2016      | 13/12/2016      |
| AOR_2           | Baeza <sup>a</sup>          | 18/01/2018      | 24/10/2017      |
| AOR_3           | Mogón <sup>a</sup>          | 27/10/2017      | 07/12/2017      |

<sup>a</sup>Province of Jaén; <sup>b</sup>Province of Córdoba

Samples of olive oils were extracted following the extraction method D (Section 13.1.1). Obtained dry extracts were stored under an inert atmosphere of argon at -20 °C until its use.

### 13.2.2 Analysis of hydroalcoholic extracts by HPLC-DAD

Solution of olive oil extracts in MeCN at a concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup> were prepared and analysed by HPLC-DAD (Instrument A; section 10.2.4). Separations were carried out using elution method F (Section 13.1.2).

### 13.2.3 Quantification of (-)-oleacein and (-)-oleocanthal in olive oils by HPLC-DAD

Quantification of (-)-oleacein (**48**) and (-)-oleocanthal (**49**) in hydroalcoholic extracts of olive oil was achieved making use of an external-standard method, using HPLC peak areas at 280 nm, and following the elution method F (Section 13.1.2).

Solutions (0.01-0.3 mg mL<sup>-1</sup> in acetonitrile) of (-)-oleacein and (-)-oleocanthal, previously purified (Section 13.1.4), were used to build calibration curves (**Table 13.7**). The concentration of target compounds in hydroalcoholic extracts was determined comparing the HPLC peak area at 280 nm of each component with the calibration curves of (-)-oleacein and (-)-oleocanthal.

**Table 13.7.** Calibration curves for quantification work on olive oils.

| Compound        | Calibration curve                         |
|-----------------|-------------------------------------------|
| (-)-Oleacein    | $y = 5117.1x - 25442$ ( $r^2 = 0.9993$ )  |
| (-)-Oleocanthal | $y = 3121.8x - 6706.6$ ( $r^2 = 0.9974$ ) |

Samples of hydroalcoholic extracts were prepared in MeCN at a concentration of 5 mg/mL, and 5  $\mu$ L of each one was injected on HPLC-DAD (Instrument A, section 10.2.4; Elution method F, section 13.1.2). Concentrations were calculated as stated above.

### **13.3 Isolation of (-)-oleuropein and (-)-ligustroside from olive tree wood**

#### ***13.3.1 Collection and extraction of olive pruning wood***

A sample of wood from pruning an olive tree of the cultivar 'Picual' was collected in a farming plot located in Fuensanta de Martos, province of Jaén, Spain, in April 2003. It consisted of one piece of wood of 25 cm diameter and 70 cm length without leaves. Plant material was stored in a dry and dark place at room temperature with passive ventilation until extraction. Just before starting the extraction process, a wood piece (ca. 25 cm diameter) was ground.

Olive wood shavings (3 kg) were extracted with EtOAc (15 L) at reflux for 2 h, yielding 141 g of dry extract that was stored at -20 °C until use.

#### ***13.3.2 HPLC-DAD analysis of olive wood extract***

The olive EtOAc extract was analysed by HPLC-DAD (Instrument A; section 10.2.4). The sample was dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>-1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Optimal method (Elution method G) was achieved using MeOH (Solvent A) and water (Solvent B), both with 0.2% of acetic acid, v/v, at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. The gradient program consisted in a linear gradient from 20 to 80% A in 55 min; a linear gradient from 70 to 100% A in 5 min; and other 10 min to return to initial conditions.

#### ***13.3.3 Chromatographic fractionation of olive wood extract and isolation of secoiridoids***

An aliquot (8.0 g) of olive wood EtOAc extract was pre-fractionated by conventional column chromatography (Section 10.2.2), using 600 g of silica gel 60 (0.063-0.200 mm). The sample was mixed with 16 g of silica gel 60 (0.063-0.200 mm) and loaded into the column, that was eluted using a mixture of DCM:EtOH (9:1, v/v).

Initially, 1.5 L of mobile phase was discarded and then, 38 fractions (75 mL each) were collected. Fractions were monitored by TLC (Section 10.2.1), pooled according to their similar composition, and evaporated under reduced pressure (**Table 13.8**).

**Table 13.8.** Fractionation of olive wood EtOAc extract by a conventional column chromatography (DCM:EtOH, 9:1, v/v).

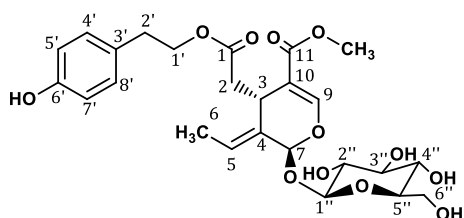
| Major fractions | Fractions | Mass (g) |
|-----------------|-----------|----------|
| F <sub>1</sub>  | 14–17     | 0.34     |
| F <sub>2</sub>  | 18–30     | 3.20     |
| F <sub>3</sub>  | 31–37     | 1.30     |

Fractions F<sub>1</sub> and F<sub>3</sub> were composed of (–)-ligustroside and (–)-oleuropein, respectively. A mixture of both compounds was found in fraction F<sub>2</sub>.

An aliquot (2 g) of fraction F<sub>2</sub> was chromatographed by FCPC (Section 10.2.3). The best separation was carried out using a mixture of Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (1:2:1:2, v/v/v/v) as solvent system. Seventy-five fractions were collected in ascending mode, and monitored by TLC (Section 10.2.1). Fractions with similar composition were pooled and evaporated under reduced pressure to yield two major fractions: F<sub>2</sub>(I) (fractions 3–23, 0.532 g) and F<sub>2</sub>(II) (fractions 30–74, 1.103 g), containing ligustroside (**53**) (purity by HPLC: 84%) and oleuropein (**52**) (purity by HPLC: 94%), respectively.

Fraction F<sub>2</sub>(I) (100 mg) and fraction F<sub>2</sub>(II) (100 mg) were chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4), using as mobile phase a mixture of MeCN:AcOH (99.8:0.2, v/v) (Solvent A) and H<sub>2</sub>O:AcOH (99.8:0.2, v/v) (Solvent B) at a flow rate of 5.0 mL/min. The separation was carried out with an isocratic method of 23% A in 50 minutes, and pure (–)-ligustroside (47 mg) (**Table 13.9**) and pure (–)-oleuropein (62 mg) (**Table 13.10**) were obtained.

**(-)-Ligustroside (53)**



(-)-Ligustroside (53)

White solid

$[\alpha]_D^{25} -145.1^\circ$  (c 0.7 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:**  $m/z$  (negative mode): 523  $[M-H]^-$ .

**ESI-MS-MS:**  $m/z$  (negative mode): 361 (100), 291 (45), 259 (32).

**Retention time:** 35.2 min.

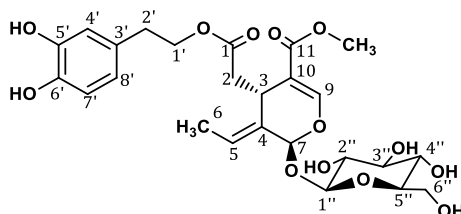
**Table 13.9.** NMR data in  $CD_3OD$  of compound **53**.

| <b>(-)-Ligustroside (53) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                        |             |                                              |             |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------|----------------------------------------------|-------------|
| <b>Position</b>                                        | <b><math>^1H</math></b>                                | <b>COSY</b> | <b><math>^{13}C</math>, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b> |
| 1                                                      | -                                                      | -           | (173.17)                                     | -           |
| 2a                                                     | 2.43 (dd, $J_{2a,3} = 9.2$ ; $J_{2a,2b} = 14.1$ Hz)    | -           | 41.22                                        | -           |
| 2b                                                     | 2.70 (dd, $J_{2b,3} = 4.4$ ; $J_{2b,2a} = 14.1$ Hz)    | -           | 41.22                                        | -           |
| 3                                                      | 3.97 (dd, $J_{3,2b} = 4.4$ ; $J_{3,2a} = 9.1$ Hz)      | -           | 31.81                                        | -           |
| 4                                                      | -                                                      | -           | (130.43)                                     | -           |
| 5                                                      | 6.08 (q, $J_{5,6} = 6.9$ Hz)                           | -           | 124.86                                       | -           |
| 6                                                      | 1.64 (dd, $J_{6,7} = 7.1$ )                            | -           | 13.56                                        | -           |
| 7                                                      | 5.92 (brs)                                             | -           | 95.09                                        | -           |
| 9                                                      | 7.51 (s)                                               | -           | 155.13                                       | -           |
| 10                                                     | -                                                      | -           | (109.35)                                     | -           |
| 11                                                     | -                                                      | -           | (168.62)                                     | -           |
| 1'a                                                    | 4.10 (dt, $J_{1'a,2} = 7.1$ ; $J_{1'a,1'b} = 10.6$ Hz) | -           | 66.89                                        | -           |
| 1b'                                                    | 4.22 (dt, $J_{1'b,2} = 6.9$ ; $J_{1'b,1'a} = 10.6$ Hz) | -           | 66.89                                        | -           |
| 2'                                                     | 2.82 (t, $J_{2',1} = 6.9$ Hz)                          | -           | 35.15                                        | -           |
| 3'                                                     | -                                                      | -           | (130.00)                                     | -           |

|                       |                                                                      |   |          |   |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|---|----------|---|
| 4'                    | 7.05 ( <i>d</i> , $J_{4',5'} = 8.2$ Hz)                              | - | 131.00   | - |
| 5'                    | 6.72 ( <i>d</i> , $J_{5',4'} = 8.4$ Hz)                              | - | 116.27   | - |
| 6'                    | -                                                                    | - | (157.05) | - |
| 7'                    | 6.72 ( <i>d</i> , $J_{7',8'} = 8.4$ Hz)                              | - | 116.27   | - |
| 8'                    | 7.05 ( <i>d</i> , $J_{8',7'} = 8.2$ Hz)                              | - | 131.00   | - |
| 1''                   | 4.81 ( <i>d</i> , $J_{1'',2''} = 7.8$ Hz)                            | - | 100.80   | - |
| 2''                   | 3.32-3.44 ( <i>m</i> )                                               | - | 74.74    | - |
| 3''                   | 3.32-3.44 ( <i>m</i> )                                               | - | 77.90    | - |
| 4''                   | 3.32-3.44 ( <i>m</i> )                                               | - | 71.45    | - |
| 5''                   | 3.32-3.44 ( <i>m</i> )                                               | - | 78.43    | - |
| 6''a                  | 3.67 ( <i>dd</i> , $J_{6''b,5''} = 5.4$ ; $J_{6''b,6''a} = 11.9$ Hz) | - | 62.73    | - |
| 6''b                  | 3.89 ( <i>brd</i> , $J_{6''b,6''a} = 12.2$ Hz)                       | - | 62.73    | - |
| O-CH <sub>3</sub> -11 | 3.71 ( <i>s</i> )                                                    | - | 51.90    | - |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

### (-)-Oleuropein (52)



(-)-Oleuropein (52)

White solid

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -145.0^{\circ}$  (*c* 1.0 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (negative mode): 539 [M-H]<sup>-</sup>.

**ESI-MS-MS:** *m/z* (negative mode): 377 (100), 345 (7), 307 (69), 275 (73).

**Retention time:** 26.4 min.

**Table 13.10.** NMR data in CD<sub>3</sub>OD of compound **52**.

| <b>(-)-Oleuropein (52) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                            |             |                       |             |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| <b>Position</b>                                      | <b><sup>1</sup>H</b>                                       | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C</b> | <b>HMBC</b> |
| 1                                                    | -                                                          | -           | (173.20)              | -           |
| 2a                                                   | 2.43 (dd, $J_{2a,3}$ = 9.2; $J_{2a,2b}$ = 14.1 Hz)         | -           | 41.24                 | -           |
| 2b                                                   | 2.70 (dd, $J_{2b,3}$ = 4.4; $J_{2b,2a}$ = 14.1 Hz)         | -           | 41.24                 | -           |
| 3                                                    | 3.97 (dd, $J_{3,2b}$ = 4.4; $J_{3,2a}$ = 9.0 Hz)           | -           | 31.79                 | -           |
| 4                                                    | -                                                          | -           | (130.43)              | -           |
| 5                                                    | 6.08 (brq, $J_{5,6}$ = 6.9 Hz)                             | -           | 124.86                | -           |
| 6                                                    | 1.66 (d, $J_{6,5}$ = 7.1 Hz)                               | -           | 13.56                 | -           |
| 7                                                    | 5.91 (brs)                                                 | -           | 95.15                 | -           |
| 9                                                    | 7.51 (s)                                                   | -           | 155.14                | -           |
| 10                                                   | -                                                          | -           | (109.34)              | -           |
| 11                                                   | -                                                          | -           | (168.66)              | -           |
| 1'a                                                  | 4.10 (dt, $J_{1'a,2}$ = 7.0; $J_{1'a,1'b}$ = 10.7 Hz)      | -           | 66.89                 | -           |
| 1'b                                                  | 4.21 (dt, $J_{1'b,2}$ = 7.1; $J_{1'b,1'a}$ = 10.7 Hz)      | -           | 66.89                 | -           |
| 2'                                                   | 2.76 (t, $J_{2',1}$ = 7.0 Hz)                              | -           | 35.37                 | -           |
| 3'                                                   | -                                                          | -           | (130.70)              | -           |
| 4'                                                   | 6.66 (d, $J_{4',8}$ = 1.7 Hz)                              | -           | 117.03                | -           |
| 5'                                                   | -                                                          | -           | (146.21)              | -           |
| 6'                                                   | -                                                          | -           | (144.89)              | -           |
| 7'                                                   | 6.69 (d, $J_{7',8}$ = 8.0 Hz)                              | -           | 116.41                | -           |
| 8'                                                   | 6.55 (dd, $J_{8',4}$ = 1.5; $J_{8',7}$ = 8.0 Hz)           | -           | 121.30                | -           |
| 1''                                                  | 4.81 (d, $J_{1'',2''}$ = 7.7 Hz)                           | -           | 100.84                | -           |
| 2''                                                  | 3.32-3.44 (m)                                              | -           | 74.71                 | -           |
| 3''                                                  | 3.32-3.44 (m)                                              | -           | 77.88                 | -           |
| 4''                                                  | 3.32-3.44 (m)                                              | -           | 71.41                 | -           |
| 5''                                                  | 3.32-3.44 (m)                                              | -           | 78.38                 | -           |
| 6''a                                                 | 3.67 (dd, $J_{6''a,5''}$ = 5.1; $J_{6''a,6''b}$ = 12.0 Hz) | -           | 62.68                 | -           |
| 6''b                                                 | 3.88 (dd, $J_{6''a,6''b}$ = 11.9 Hz)                       | -           | 62.68                 | -           |
| O-CH <sub>3</sub> -11                                | 3.71 (s)                                                   | -           | 51.92                 | -           |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.



### 13.4 Study of the pruning woods and leaves of several olive tree cultivars and other Oleaceae species

#### 13.4.1 Collection and extraction of olive pruning woods and leaves

Samples of wood and leaf of several olive trees were collected at (a) the research centre IFAPA “Alameda del Obispo”, Córdoba; (b) a farming plot located in Torres, Jaén province; (c) a farming plot located in Mogón, Jaén province; (d) a farming plot located in Jaén; and (e) a farming plot located in Enguera, Valencia province. They consisted of some pieces of wood (0.5–1.2 cm of diameter and 40 cm of length) and leaves. Samples of wood and leaves (removed from stems) were stored in a dry and dark place at room temperature with passive ventilation until extraction. Just before starting the extraction process, a wood piece (*ca.* 1 cm diameter) was shaved and a few grams of leaves were ground (**Table 13.11**).

**Table 13.11.** Collection and processing of olive woods and leaves.

| Reference     | Cultivar                            | Collection date | Extraction date wood | Extraction date leaves |
|---------------|-------------------------------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| Oe-CO-1a(Ca)  | Caballo <sup>a</sup>                | 11/2/2019       | 08/4/2019            | 09/4/2019              |
| Oe-CO-2a(Ka)  | Kalamon <sup>a</sup>                | 11/2/2019       | 08/4/2019            | 09/4/2019              |
| Oe-CO-3a(PB)  | Plementa Bjelica <sup>a</sup>       | 11/2/2019       | 08/4/2019            | 09/4/2019              |
| Oe-CO-4a(P)   | Picual <sup>a</sup>                 | 11/2/2019       | 10/4/2019            | 11/4/2019              |
| Oe-CO-5a(Pe)  | Pendolino <sup>a</sup>              | 11/2/2019       | 10/4/2019            | 11/4/2019              |
| Oe-CO-6a(EA)  | Enagua de Arenas <sup>a</sup>       | 11/2/2019       | 10/4/2019            | 11/4/2019              |
| Oe-CO-7a(Ce)  | Cerezuela <sup>a</sup>              | 11/2/2019       | 12/4/2019            | 15/4/2019              |
| Oe-CO-8a(BI)  | Blanqueta <sup>a</sup>              | 11/2/2019       | 12/4/2019            | 15/4/2019              |
| Oe-CO-9a(Pic) | Picudo <sup>a</sup>                 | 11/2/2019       | 12/4/2019            | 15/4/2019              |
| Oe-CO-10a(Al) | Alfara <sup>a</sup>                 | 11/2/2019       | 16/4/2019            | 17/4/2019              |
| Oe-CO-11a(NC) | Negrillo de la Carlota <sup>a</sup> | 11/2/2019       | 16/4/2019            | 17/4/2019              |
| Oe-VA-1a(Al)  | Alfara <sup>b</sup>                 | 27/12/2018      | 09/01/2019           | 09/01/2019             |
| Oe-LL-4a(Ce)  | Cerezuela <sup>c</sup>              | 07/12/2018      | 12/12/2019           | 12/12/2019             |
| Oe-CS-1a (A)  | Arbequina <sup>d</sup>              | 16/03/2017      | 10/05/2017           | 10/05/2017             |
| Oe-M-2a (Cc)  | Cornicabra <sup>e</sup>             | 15/03/2017      | 10/05/2017           | 10/05/2017             |
| Oe-M-3b (Cz)  | Cornezuelo <sup>e</sup>             | 15/03/2017      | 10/05/2017           | 10/05/2017             |
| Oe-M-4a (P)   | Picual <sup>e</sup>                 | 22/03/2017      | 10/05/2017           | 10/05/2017             |

Collected in Córdoba<sup>a</sup>, Valencia<sup>b</sup>, Mogón<sup>c</sup>, and Albánchez de Mágina<sup>e</sup>, province of Jaén, and Jaén<sup>d</sup>, Spain.

In addition, wood and leaf samples of other Oleaceae species, such as *Ligustrum vulgare* L. and *Fraxinus angustifolia* L., were collected at (a) the botanical garden “Torre del Vinagre”, Natural Park of the Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas, Jaén province; (b) Albánchez de Mágina, Jaén province; (c) Mogón, Jaén province (**Table 13.12**).

**Table 13.12.** Collection and processing of *Ligustrum vulgare* L. and *Fraxinus angustifolia* L samples.

| Reference                                                                                                                             | Collection date | Extraction date wood | Extraction date leaves |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| Lv-C-1a <sup>a</sup>                                                                                                                  | 21/11/2016      | 11/05/2017           | 11/05/2017             |
| Fx-LL-1a(An) <sup>b</sup>                                                                                                             | 02/06/2019      | 07/06/2019           | 07/06/2019             |
| Fx-M-1a(An) <sup>c</sup>                                                                                                              | 02/06/2019      | 07/06/2019           | 07/06/2019             |
| Collected in “Torre del Vinagre” <sup>a</sup> , Mogón <sup>b</sup> and Albánchez de Mágina <sup>c</sup> ,<br>province of Jaén, Spain. |                 |                      |                        |

Samples (5 g) of wood shavings and powered leaves were extracted following the extraction method A (Section 11.1.1), and the resulting dry extracts were stored at –20 °C until analysis.

#### **13.4.2 HPLC–DAD analysis of olive wood and leaf extracts**

Olive wood and leaf EtOAc extracts were analysed by HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Samples were dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>–1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Separations were carried out using the elution method G (Section 13.3.2).

#### **13.4.3 Quantification of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside in olive wood and leaf extracts by HPLC–DAD**

Quantification of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside in olive wood and leaf EtOAc extracts was achieved making use of an external-standard method, using HPLC peak areas at 280 nm, and following the elution method G (Section 13.3.2).

Solutions (0.1–1 mg mL<sup>-1</sup> in MeOH) of pure (–)-oleuropein and (–)-ligustroside, previously isolated from olive wood (Section 13.3.3) were used to build calibration curves (**Table 13.13**). The concentration of target compounds in the EtOAc extracts was determined comparing the HPLC peak area at 280 nm with calibration curves.

**Table 13.13.** Calibration curves for quantification work on olive wood and leaf extracts.

| Compound         | Calibration curve                         |
|------------------|-------------------------------------------|
| (–)-Oleuropein   | $y = 2825.9x - 19483$ ( $r^2 = 0.9986$ )  |
| (–)-Ligustroside | $y = 1734.5x - 1655.9$ ( $r^2 = 0.9981$ ) |

Samples of wood and leaf EtOAc extracts were prepared in MeOH at a concentration of 5 mg/mL, and 5 µL of each one was injected on HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Concentrations of (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**) was determined as stated above (**Table 13.14 and 13.15**).

**Table 13.14.** Quantification of (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**) in the EtOAc extract of leave and wood of *Olea europaea* L.

| Reference     | Wood                        |                             | Leaf                        |                             |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|               | mg of <b>52</b> /g dry wood | mg of <b>53</b> /g dry wood | mg of <b>52</b> /g dry leaf | mg of <b>53</b> /g dry leaf |
| Oe-CO-1a(Ca)  | 1.99                        | 0.15                        | 24.36                       | N.D.                        |
| Oe-CO-2a(Ka)  | 4.41                        | 0.25                        | 22.75                       | N.D.                        |
| Oe-CO-3a(PB)  | 4.53                        | 0.47                        | 64.91                       | N.D.                        |
| Oe-CO-4a(Pi)  | 5.06                        | 0.51                        | 34.80                       | N.D.                        |
| Oe-CO-5a(Pe)  | 1.51                        | 0.32                        | 25.78                       | N.D.                        |
| Oe-CO-6a(EA)  | 0.72                        | 0.16                        | 22.66                       | N.D.                        |
| Oe-CO-7a(Ce)  | 2.91                        | 0.10                        | 28.72                       | N.D.                        |
| Oe-CO-8a(BI)  | 3.28                        | 0.36                        | 35.71                       | N.D.                        |
| Oe-CO-9a(Pic) | 3.06                        | 0.30                        | 38.70                       | N.D.                        |
| Oe-CO-10a(Al) | 2.63                        | 0.20                        | 38.22                       | N.D.                        |
| Oe-CO-11a(NC) | 3.95                        | 0.58                        | 19.01                       | N.D.                        |
| Oe-VA-1a(Al)  | 4.41                        | 0.70                        | 16.02                       | N.D.                        |
| Oe-LL-4a(Ce)  | 1.27                        | 0.22                        | 24.05                       | N.D.                        |
| Oe-CS-1a (A)  | 6.05                        | 0.91                        | 47.08                       | N.D.                        |
| Oe-M-2a (Cc)  | 2.21                        | 0.72                        | 41.06                       | N.D.                        |
| Oe-M-3b (Cz)  | 5.41                        | N.D                         | 51.01                       | N.D.                        |
| Oe-M-4a (P)   | 6.11                        | N.D                         | 63.27                       | N.D.                        |

N.D. (Not detected).

**Table 13.15.** Quantification of (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**) in wood and leaf EtOAc extracts of *Ligustrum vulgare* L. and *Fraxinus angustifolia* L.

| Reference    | Wood                        |                             | Leaf                        |                             |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|              | mg of <b>52</b> /g dry wood | mg of <b>53</b> /g dry wood | mg of <b>52</b> /g dry leaf | mg of <b>53</b> /g dry leaf |
| Lv-C-1a      | 12.23                       | 0.01                        | 19.01                       | N.D.                        |
| Fx-LL-1a(An) | 4.41                        | 0.25                        | 22.75                       | N.D.                        |
| Fx-M-1a(An)  | 4.53                        | 0.47                        | 64.91                       | N.D.                        |

N.D. (Not detected).

### 13.5 Seasonal variation of (-)-oleuropein and (-)-ligustroside in olive wood and leaf extracts

#### 13.5.1 Collection and extraction of olive wood and leaf samples for seasonal study

Samples of olive leaf and wood were collected from three different olive trees every 2 months during 1 year, located in farming plots in Mogón, Fuensanta de Martos, and Albánchez de Mágina, province of Jaén, Spain. Wood samples consisted in one piece of 1 cm diameter and 60 cm length. Leaf and wood samples were stored in a dry and dark place at room temperature with passive ventilation for two month until extraction (*Table 13.16*).

**Table 13.16.** Collection and processing of olive tree pruning.

| Reference              | Collection date | Extraction date<br>(wood) | Extraction date<br>(leaves) |
|------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|
| Oe-LL-5a <sup>a</sup>  | 27/01/2019      | 07/03/2019                | 08/03/2019                  |
| Oe-SSu-1c <sup>b</sup> | 29/01/2019      | 07/03/2019                | 08/03/2019                  |
| Oe-M-5a <sup>c</sup>   | 29/01/2019      | 07/03/2019                | 08/03/2019                  |
| Oe-LL-5b <sup>a</sup>  | 30/03/2019      | 06/05/2019                | 07/05/2019                  |
| Oe-SSu-1d <sup>b</sup> | 19/03/2019      | 06/05/2019                | 07/05/2019                  |
| Oe-M-5b <sup>c</sup>   | 31/03/2019      | 06/05/2019                | 07/05/2019                  |
| Oe-LL-5c <sup>a</sup>  | 01/06/2019      | 01/07/2019                | 02/07/2019                  |
| Oe-SSu-1e <sup>b</sup> | 30/05/2019      | 01/07/2019                | 02/07/2019                  |
| Oe-M-5c <sup>c</sup>   | 02/06/2019      | 01/07/2019                | 02/07/2019                  |
| Oe-LL-5d <sup>a</sup>  | 20/07/2019      | 13/09/2019                | 16/09/2019                  |
| Oe-SSu-1f <sup>b</sup> | 24/07/2019      | 13/09/2019                | 16/09/2019                  |
| Oe-M-5d <sup>c</sup>   | 22/07/2019      | 13/09/2019                | 16/09/2019                  |
| Oe-LL-5e <sup>a</sup>  | 28/09/2019      | 25/11/2019                | 26/11/2019                  |
| Oe-SSu-1g <sup>b</sup> | 27/09/2019      | 25/11/2019                | 26/11/2019                  |
| Oe-M-5e <sup>c</sup>   | 30/09/2019      | 25/11/2019                | 26/11/2019                  |
| Oe-LL-5f <sup>a</sup>  | 30/11/2019      | 15/01/2020                | 16/01/2020                  |
| Oe-SSu-1h <sup>b</sup> | 03/12/2019      | 15/01/2020                | 16/01/2020                  |
| Oe-M-5f <sup>c</sup>   | 01/12/2019      | 15/01/2020                | 16/01/2020                  |

<sup>a</sup> Samples collected in Mogón, <sup>a</sup> Fuensanta de Martos, <sup>b</sup> Albánchez de Mágina, <sup>c</sup>. Province of Jaén, Spain.

Furthermore, three samples of olive wood with different diameters (1.5–1 cm, 4 cm and 10–13 cm) were collected in February 2020 from a single tree at the farming plot located in Mogón, Jaén province, Spain (**Table 13.17**).

**Table 13.17.** Collection and processing of olive wood with different diameters.

| Reference           | Collection date | Extraction date (wood) |
|---------------------|-----------------|------------------------|
| Oe-LL-5g (1.5–1 cm) | 12/02/2020      | 29/10/2020             |
| Oe-LL-5g (4 cm)     | 12/02/2020      | 29/10/2020             |
| Oe-LL-5g (10–13 cm) | 12/02/2020      | 29/10/2020             |

Samples (5 g) of wood shavings and powered leaves were extracted following the extraction method A (Section 9.2), and the resulting dry extracts were stored at –20 °C until analysis.

### ***13.5.2 HPLC–DAD analysis of olive wood and leaf extracts for seasonal study***

Olive wood and leaf EtOAc extracts were analysed by HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Samples were dissolved in MeOH at 5 mg mL<sup>–1</sup>, and 5 µL were injected in the chromatograph. Separations was achieved using elution method G (Section 13.3.3).

### ***13.5.3 Quantification by HPLC–DAD of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside in olive wood and leaf extracts for seasonal study***

Quantification of (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**) in olive wood and leaf EtOAc extracts for the seasonal study was achieved making use of an external-standard method, using HPLC peak areas at 280 nm, and following the elution method G (Section 13.2.3). Calibrations curves described in section 13.4.3 were used.

All extracts were dissolved in MeOH at a concentration of 5 mg/mL, in duplicate, and 5  $\mu$ L of each one was injected on HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). The amount of (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**) was determined as stated above (**Table 13.18** and **13.19**).

**Table 13.18.** Quantification of (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**) in olive wood and leaf EtOAc extracts for the seasonal study.

| Reference | Wood                        |                             | Leaf                        |                             |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|           | mg of <b>52</b> /g dry wood | mg of <b>53</b> /g dry wood | mg of <b>52</b> /g dry leaf | mg of <b>53</b> /g dry leaf |
| Oe-LL-5a  | 0.82 $\pm$ 0.05             | 0.27 $\pm$ 0.02             | 14.93 $\pm$ 1.73            | N.D.                        |
| Oe-SSu-1c | 2.03 $\pm$ 0.10             | 0.55 $\pm$ 0.04             | 14.09 $\pm$ 0.40            | N.D.                        |
| Oe-M-5a   | 2.06 $\pm$ 0.19             | 0.25 $\pm$ 0.01             | 19.21 $\pm$ 0.87            | N.D.                        |
| Oe-LL-5b  | 6.21 $\pm$ 0.16             | 0.32 $\pm$ 0.01             | 23.12 $\pm$ 0.76            | N.D.                        |
| Oe-SSu-1d | 1.25 $\pm$ 0.10             | 0.16 $\pm$ 0.01             | 42.16 $\pm$ 1.90            | N.D.                        |
| Oe-M-5b   | 2.53 $\pm$ 0.08             | 0.31 $\pm$ 0.02             | 30.54 $\pm$ 0.04            | N.D.                        |
| Oe-LL-5c  | 2.31 $\pm$ 0.03             | 0.12 $\pm$ 0.01             | 19.19 $\pm$ 0.71            | N.D.                        |
| Oe-SSu-1e | 1.19 $\pm$ 0.02             | 0.11 $\pm$ 0.01             | 26.51 $\pm$ 0.28            | N.D.                        |
| Oe-M-5c   | 0.56 $\pm$ 0.03             | 0.04 $\pm$ 0.01             | 7.74 $\pm$ 0.28             | N.D.                        |
| Oe-LL-5d  | 3.74 $\pm$ 0.06             | 0.22 $\pm$ 0.03             | 20.34 $\pm$ 1.20            | N.D.                        |
| Oe-SSu-1f | 1.33 $\pm$ 0.04             | 0.12 $\pm$ 0.01             | 7.73 $\pm$ 0.25             | N.D.                        |
| Oe-M-5d   | 1.15 $\pm$ 0.05             | 0.13 $\pm$ 0.03             | 5.43 $\pm$ 0.24             | N.D.                        |
| Oe-LL-5e  | 3.15 $\pm$ 0.12             | 0.17 $\pm$ 0.01             | 14.52 $\pm$ 0.98            | N.D.                        |
| Oe-SSu-1g | 2.01 $\pm$ 0.06             | 0.13 $\pm$ 0.01             | 5.68 $\pm$ 0.01             | N.D.                        |
| Oe-M-5e   | 2.05 $\pm$ 0.01             | 0.17 $\pm$ 0.02             | 14.75 $\pm$ 0.79            | N.D.                        |
| Oe-LL-5f  | 4.40 $\pm$ 0.20             | 0.25 $\pm$ 0.01             | 34.21 $\pm$ 1.32            | N.D.                        |
| Oe-SSu-1h | 4.45 $\pm$ 0.16             | 0.28 $\pm$ 0.02             | 26.09 $\pm$ 0.76            | N.D.                        |
| Oe-M-5f   | 1.69 $\pm$ 0.11             | 0.26 $\pm$ 0.01             | 29.21 $\pm$ 0.78            | N.D.                        |

Results are expressed as mean (mg compound  $\cdot$  g dry sample<sup>-1</sup>  $\pm$  SD); N.D. (Not detected).

**Table 13.19.** Quantification of of (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**) in olive wood samples with different diameters.

| Reference                                                                      | mg of <b>52</b> /g dry wood | mg of <b>53</b> /g dry wood |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Oe-LL-5g (1.5-1 cm)                                                            | 3.56 ± 0.02                 | 0.01 ± 0.01                 |
| Oe-LL-5g (4 cm)                                                                | 0.02 ± 0.08                 | 0.02 ± 0.01                 |
| Oe-LL-5g (10-13 cm)                                                            | 3.87 ± 0.01                 | 1.81 ± 0.18                 |
| Results are expressed as mean (mg compound · g dry sample <sup>-1</sup> ± SD). |                             |                             |

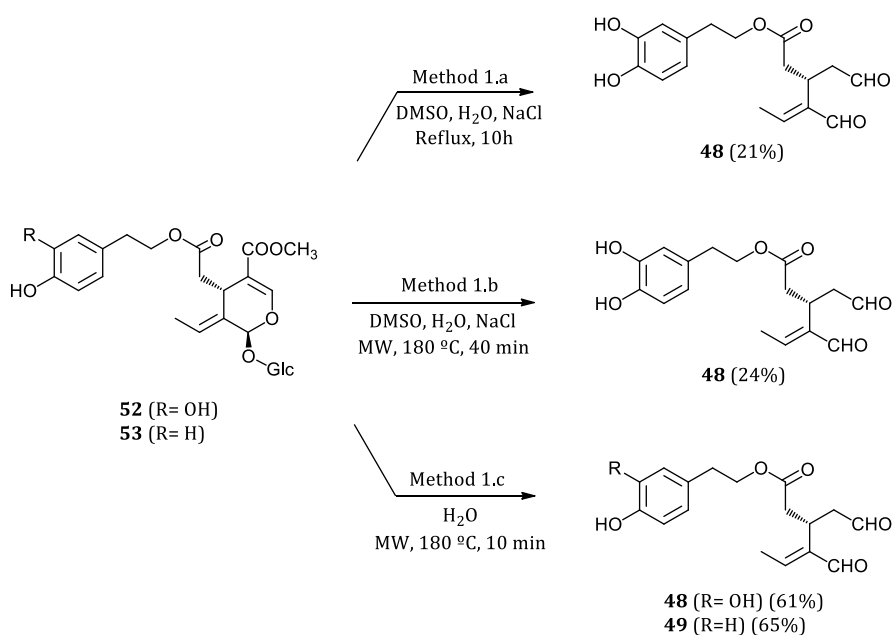




## 14. SYNTHESIS OF OLEACEIN AND OLEOCANTHAL AND THEIR METHYLATED DERIVATIVES

### 14.1 Synthesis of (–)-oleacein and (–)-oleocanthal

To obtain (–)-oleacein and (–)-ligustroside from (–)-oleuropein and (–)-ligustroside, respectively, several experimental procedures were assayed (**Scheme 14.1**).



**Scheme 14.1.** Semisynthesis of (–)-oleacein (**48**) and (–)-oleocanthal (**49**) from (–)-oleuropein (**52**) and (–)-ligustroside (**53**), respectively.

#### Method 1.a

A mixture of (–)-oleuropein (0.185 mmol), NaCl (0.185 mmol, 1 eq.), water (1.85 mmol, 10 eq.) and DMSO (2 mL) was stirred for 10 h at reflux. The resulting reaction crude was cooled to room temperature and then extracted with CHCl<sub>3</sub> (3×10 mL). Organic layers were pooled, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure to give a dark brown oil (60 mg).<sup>527</sup>

### Method 1.b

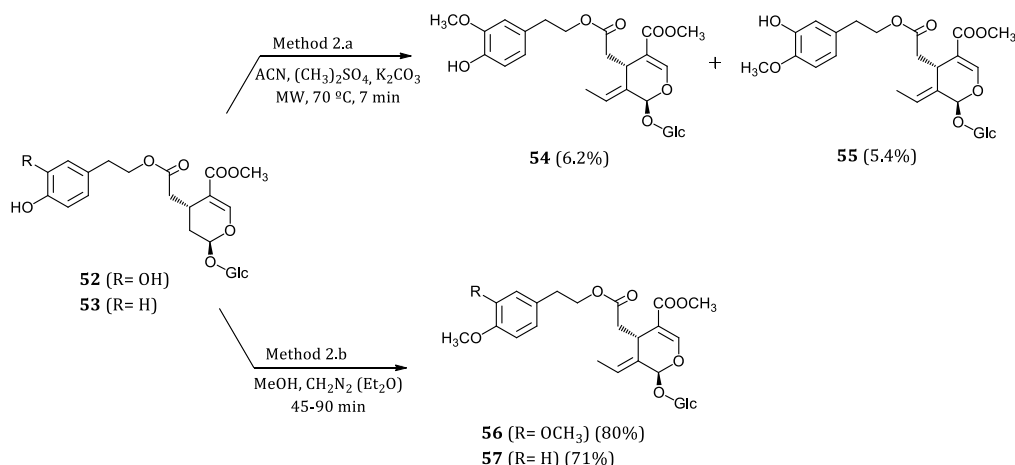
A mixture of (–)-oleuropein (0.093 mmol), NaCl (0.093 mmol, 1 eq.), water (0.93 mmol, 10 eq.) and DMSO (1 mL) was subjected to microwave irradiation (MW) for 40 minutes at 180 °C. The resulting reaction crude was cooled to room temperature and then extracted with CHCl<sub>3</sub> (3×10 mL). Organic layers were pooled, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure to give a brown oil (28 mg).<sup>534</sup>

### Method 1.c

A mixture of the secoiridoid **52** or **53** (0.185 mmol) and 3 mL of water was subjected to microwave irradiation (MW) for 10 minutes at 180 °C. The resulting crude reaction was cooled to room temperature and extracted with CHCl<sub>3</sub> (3×10 mL). Organic layers were pooled, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure to give a dark brown oil. Every mixture obtained was purified by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:1:1:1, v/v/v/v) (Section 10.2.3) yielding pure (–)-oleacein (**48**, 36 mg) or pure (–)-oleocanthal (**49**, 37 mg), respectively

## 14.2 Synthesis of (–)-dimethyl-oleacein and (–)-methyl-oleocanthal

### 14.2.1 Methylation of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside



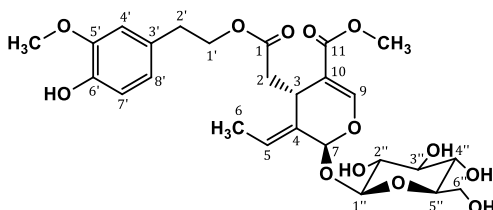
**Scheme 14.2.** Synthesis of the methylated derivatives of (–)-oleuropein and (–)-ligustroside.

#### Method 2.a (Scheme 14.2)

A mixture of (–)-oleuropein (0.16 mmol), powdered K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.43 mmol), Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.3 mmol) and MeCN (5 mL) was put into a glass vial of 10 mL provided with a magnetic bar. The reaction was carried out under microwave radiation at 70 °C for 7 minutes. Then, the reaction crude was extracted with CHCl<sub>3</sub> (3×10 mL). The remaining aqueous layer was extracted again with EtOAc (3×10 mL). Both organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure. The dry chloroform extract (870 mg) was chromatographed by open column chromatography (Section 10.2.2) on silica gel 60 (0.040–0.063 mm). A mixture of DCM:EtOH (9:1, v/v) was used as eluent. Forty fractions (20 mL each) were collected and monitored by TLC (Section 10.2.1) and HPLC–DAD (Instrument A; section 10.2.4). Fractions from 21 to 38 were pooled and evaporated to dryness (G(I), 92 mg). This fraction G(I) (92 mg) together with the crude EtOAc extract (150 mg) were chromatographed by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4). The best

separation was achieved using an isocratic method composed of MeCN:H<sub>2</sub>O:AcOH (19.9:79.9:0.2, v/v/v) at a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. Compounds **54** (52 mg) and **55** (47 mg) were isolated and identified as (-)-5'-O-methyl-oleuropein and (-)-6'-O-methyl-oleuropein, respectively (**Table 14.1** and **14.2**).

### (-)-5'-O-Methyl-oleuropein (**54**)



(-)-5'-O-Methyl-Oleuropein (**54**)

White solid

$[\alpha]_D^{25} -74.1^\circ$  (c 1.5 cg/mL, MeOH)

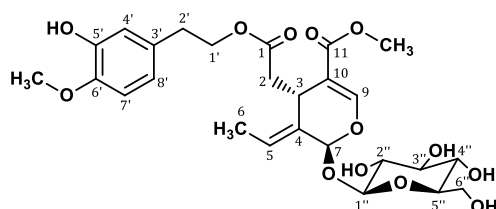
**Retention time:** 32.3 min.

**Table 14.1.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **54**.

| (-)-5'-O-Methyl-oleuropein ( <b>54</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                   |            |                                    |                                                              |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Position                                                | <sup>1</sup> H                                    | COSY       | <sup>13</sup> C, HSQC <sup>a</sup> | HMBC                                                         |
| 1                                                       | -                                                 | -          | (173.17)                           | -                                                            |
| 2a                                                      | 2.42 (dd, $J_{2a,3}= 9.2$ ; $J_{2a,2b}= 14.1$ Hz) | 2.70, 3.96 | 41.28                              | 31.82, 109.37, 130.52, 173.17                                |
| 2b                                                      | 2.70 (dd, $J_{2b,3}= 4.5$ ; $J_{2b,2a}= 14.1$ Hz) | 2.42, 3.96 | 41.28                              | 31.82, 109.37, 130.52, 173.17                                |
| 3                                                       | 3.96 (dd, $J_{3,2b}= 4.5$ ; $J_{3,2a}= 9.2$ Hz)   | 2.42, 2.70 | 31.82                              | 41.28, 95.16, 109.37, 124.82, 130.52, 155.11, 168.62, 173.17 |
| 4                                                       | -                                                 | -          | (130.52)                           | -                                                            |
| 5                                                       | 6.07 (brq, $J_{5,6}= 7.1$ Hz)                     | 1.63, 5.90 | 124.82                             | 13.51, 31.82, 95.16, 130.52                                  |
| 6                                                       | 1.63 (dd, $J_{6,7}= 1.5$ ; $J_{6,5}= 7.1$ Hz)     | 5.90, 6.07 | 13.51                              | 124.82, 130.52                                               |

|                       |                                                                |                        |          |                                  |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------|----------|----------------------------------|
| 7                     | 5.90 (brs)                                                     | 1.63,<br>6.07,<br>7.50 | 95.16    | 100.86, 124.82                   |
| 9                     | 7.50 (s)                                                       | -                      | 155.11   | 31.82, 95.16, 109.37, 168.62     |
| 10                    | -                                                              | -                      | (109.37) | -                                |
| 11                    | -                                                              | -                      | (168.62) | -                                |
| 1'a                   | 4.12 (dt, $J_{1'a,2'}= 6.9$ ;<br>$J_{1'a,1'b}= 10.7$ Hz)       | 2.83,<br>4.24          | 66.84    | 35.59, 130.76, 173.17            |
| 1b'                   | 4.24 (dt, $J_{1'b,2'}= 6.9$ ;<br>$J_{1'b,1'a}= 10.7$ Hz)       | 2.83,<br>4.12          | 66.84    | 35.59, 130.76, 173.17            |
| 2'                    | 2.83 (t, $J_{2',1'}= 6.9$<br>Hz)                               | 4.12,<br>4.24          | 35.59    | 66.84, 113.66, 122.54,<br>130.76 |
| 3'                    | -                                                              | -                      | (130.76) | -                                |
| 4'                    | 6.80 (d, $J_{4',8'}= 2.0$<br>Hz)                               | 6.66                   | 113.66   | 35.59, 122.54, 146.18            |
| 5'                    | -                                                              | -                      | (148.92) | -                                |
| 6'                    | -                                                              | -                      | (146.18) | -                                |
| 7'                    | 6.72 (d, $J_{7',8'}= 8.1$<br>Hz)                               | 6.66                   | 116.26   | 130.76, 148.92                   |
| 8'                    | 6.66 (dd, $J_{8',4'}= 2.0$ ;<br>$J_{8',7'}= 8.1$ Hz)           | 6.72,<br>6.80          | 122.54   | 35.59, 113.66, 146.18            |
| 1''                   | 4.79 (d, $J_{1'',2''}= 7.8$<br>Hz)                             | -                      | 100.86   | 77.92, 95.16                     |
| 2''                   | 3.29-3.44 (m)                                                  | -                      | 74.75    | -                                |
| 3''                   | 3.29-3.44 (m)                                                  | -                      | 77.92    | -                                |
| 4''                   | 3.29-3.44 (m)                                                  | -                      | 71.48    | -                                |
| 5''                   | 3.29-3.44 (m)                                                  | -                      | 78.42    | -                                |
| 6''a                  | 3.66 (dd, $J_{6'',a,5''}= 5.5$ ;<br>$J_{6'',a,6''b}= 12.1$ Hz) | 3.29-<br>3.44,<br>3.88 | 62.75    | 78.42                            |
| 6''b                  | 3.88 (dd, $J_{6'',a,5''}= 1.7$ ;<br>$J_{6'',a,6''b}= 12.1$ Hz) | 3.29-<br>3.44,<br>3.66 | 62.75    | -                                |
| O-CH <sub>3</sub> -5' | 3.84 (s)                                                       | -                      | 56.42    | -                                |
| O-CH <sub>3</sub> -11 | 3.69 (s)                                                       | -                      | 51.89    | 168.66                           |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

**(-)-6'-O-Methyl-oleuropein (55)****(-)-5'-O-Methyl-oleuropein (55)**

White solid

 $[\alpha]_D^{25} -49.4^\circ$  (c 1.1 cg/mL, MeOH)

Retention time: 33.8 min.

**Table 14.2.** NMR data in  $\text{CDCl}_3$  of compound 55.

| <b>(-)-5'-O-Methyl-oleuropein (55) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                                   |                        |                                                     |                                                                    |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Position</b>                                                  | <b><math>^1\text{H}</math></b>                                    | <b>COSY</b>            | <b><math>^{13}\text{C}</math>, HSQC<sup>a</sup></b> | <b>HMBC</b>                                                        |
| 1                                                                | -                                                                 | -                      | (173.17)                                            | -                                                                  |
| 2a                                                               | 2.43 ( <i>dd</i> , $J_{2a,3}= 9.1$ ;<br>$J_{2a,2b}= 14.2$ Hz)     | 2.68,<br>3.95          | 41.23                                               | 31.79, 109.37, 130.49,<br>173.17                                   |
| 2b                                                               | 2.68 ( <i>dd</i> , $J_{2b,3}= 4.7$ ;<br>$J_{2b,2a}= 14.2$ Hz)     | 2.43,<br>3.95          | 41.23                                               | 31.79, 109.37, 130.49,<br>173.17                                   |
| 3                                                                | 3.95 ( <i>dd</i> , $J_{3,2b}= 4.7$ ;<br>$J_{3,2a}= 9.1$ Hz)       | 2.43,<br>2.68          | 31.79                                               | 41.23, 95.21, 109.37, 124.84,<br>130.49, 155.13, 168.66,<br>173.17 |
| 4                                                                | -                                                                 | -                      | (130.49)                                            | -                                                                  |
| 5                                                                | 6.07 ( <i>brq</i> , $J_{5,6}= 7.1$<br>Hz)                         | 1.64,<br>5.90          | 124.84                                              | 13.54, 31.79, 95.21, 130.49                                        |
| 6                                                                | 1.64 ( <i>dd</i> , $J_{6,7}= 1.5$ ;<br>$J_{6,5}= 7.1$ Hz)         | 5.90,<br>6.07          | 13.54                                               | 124.84, 130.49                                                     |
| 7                                                                | 5.90 ( <i>brs</i> )                                               | 1.64,<br>6.07,<br>7.50 | 95.21                                               | 100.88, 124.84                                                     |
| 9                                                                | 7.50 ( <i>s</i> )                                                 | -                      | 155.13                                              | 31.79, 95.21, 109.37, 168.66                                       |
| 10                                                               | -                                                                 | -                      | (109.37)                                            | -                                                                  |
| 11                                                               | -                                                                 | -                      | (168.66)                                            | -                                                                  |
| 1'a                                                              | 4.11 ( <i>dt</i> , $J_{1'a,2'}= 7.0$ ;<br>$J_{1'a,1'b}= 10.7$ Hz) | 2.78,<br>4.21          | 66.72                                               | 35.35, 132.19, 173.17                                              |
| 1b'                                                              | 4.21 ( <i>dt</i> , $J_{1'b,2'}= 7.0$ ;                            | 2.78,                  | 66.72                                               | 35.35, 132.19, 173.17                                              |

|                       |                                                           |                 |          |                               |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------|----------|-------------------------------|
|                       | $J_{1'b,1'a} = 10.7$ Hz)                                  | 4.11            |          |                               |
| 2'                    | 2.78 ( $t, J_{2',1'} = 7.0$ Hz)                           | 4.11, 4.21      | 35.35    | 66.72, 117.00, 121.19, 132.19 |
| 3'                    | -                                                         | -               | (132.19) | -                             |
| 4'                    | 6.69 ( $d, J_{4',8'} = 2.2$ Hz)                           | 6.66            | 117.00   | 35.35, 121.19, 147.49, 147.75 |
| 5'                    | -                                                         | -               | (147.49) | -                             |
| 6'                    | -                                                         | -               | (147.75) | -                             |
| 7'                    | 6.83 ( $d, J_{7',8'} = 8.2$ Hz)                           | 6.66            | 112.99   | 132.19, 147.49, 147.75        |
| 8'                    | 6.66 ( $dd, J_{8',4'} = 2.2; J_{8',7'} = 8.2$ Hz)         | 6.69, 6.83      | 121.19   | 35.35, 117.00, 147.75         |
| 1''                   | 4.80 ( $d, J_{1'',2''} = 7.8$ Hz)                         | -               | 100.88   | 77.92, 95.21                  |
| 2''                   | 3.29-3.44 ( $m$ )                                         | -               | 74.75    | -                             |
| 3''                   | 3.29-3.44 ( $m$ )                                         | -               | 77.92    | -                             |
| 4''                   | 3.29-3.44 ( $m$ )                                         | -               | 71.48    | -                             |
| 5''                   | 3.29-3.44 ( $m$ )                                         | -               | 78.40    | -                             |
| 6''a                  | 3.67 ( $dd, J_{6''a,5''} = 5.5; J_{6''a,6''b} = 11.9$ Hz) | 3.29-3.44, 3.88 | 62.74    | 78.42                         |
| 6''b                  | 3.88 ( $dd, J_{6''b,5''} = 1.6; J_{6''b,6''a} = 11.9$ Hz) | 3.29-3.44, 3.67 | 62.74    | 71.48                         |
| O-CH <sub>3</sub> -6' | 3.85 ( $s$ )                                              | -               | 56.52    | -                             |
| O-CH <sub>3</sub> -11 | 3.71 ( $s$ )                                              | -               | 51.91    | 168.66                        |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

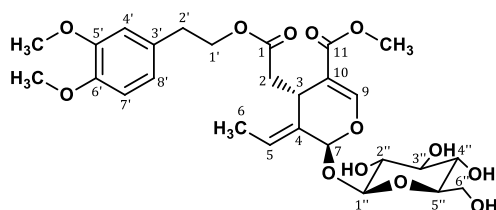
### Method 2.b (Scheme 14.2)

A mixture of the secoiridoid **52** or **53** (2.5 mmol) and MeOH (70 mL) was stirred at room temperature until the total dissolution of the solid. Then, the reaction flask was protected from the light and an ether phase, containing diazomethane (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) (Section 10.1), was added dropwise. After 45-90 minutes, solvent was removed under reduced pressure to give a light yellow solid. The purification was carried out by FCPC (Section 10.2.3) using Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:3:2:3, v/v/v/v) or Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O (2:5:2:5, v/v/v/v) as solvent system to give a white solid of **56** (1.1 g) or **57** (0.96 mg) respectively.<sup>541</sup> A portion of both crude reactions (120 mg) was purified by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4) to give high pure compounds. Isocratic elution method of MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (49.9:49.9:0.2, v/v/v) or



MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (39.9:59.9:0.2, v/v/v) was used to obtained **56** (62 mg) (**Table 14.3**) or **57** (51 mg) (**Table 14.4**), respectively.

**(-)-5', 6'-O-dimethyl-oleuropein (56)**



**(-)-5', 6'-O-dimethyl-oleuropein (56)**

White solid

$[\alpha]_D^{25}$  -152.7° (c 0.9 cg/mL, MeOH).

**ESI-MS:** *m/z* (positive mode): 591 [M+Na]<sup>+</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (positive mode): 429 (100), 413 (27), 411 (13), 397 (99).

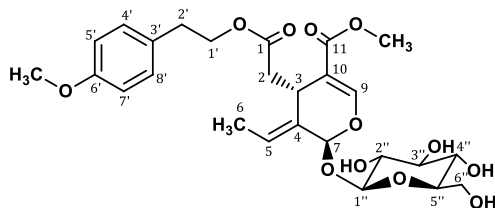
**Table 14.3.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **56**.

| <b>(-)-5',6'-O-dimethyl-oleuropein (56) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                        |             |                       |             |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| <b>Position</b>                                                       | <b><sup>1</sup>H</b>                                   | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C</b> | <b>HMBC</b> |
| 1                                                                     | -                                                      | -           | 171.68                | -           |
| 2a                                                                    | 2.38 (dd, $J_{2a,3}$ = 4.2; $J_{2a,2b}$ = 13.9 Hz)     | -           | 40.42                 | -           |
| 2b                                                                    | 2.76 (dd, $J_{2b,3}$ = 9.1; $J_{2b,2a}$ = 13.9 Hz)     | -           | 40.42                 | -           |
| 3                                                                     | 3.95 (dd, $J_{3,2a}$ = 4.2; $J_{3,2b}$ = 9.1 Hz)       | -           | 30.74                 | -           |
| 4                                                                     | -                                                      | -           | 128.81                | -           |
| 5                                                                     | 6.04 (q, $J_{5,6}$ = 7.0 Hz)                           | -           | 124.49                | -           |
| 6                                                                     | 1.63 (d, $J_{6,5}$ = 6.7 Hz)                           | -           | 13.46                 | -           |
| 7                                                                     | 5.75 (brs)                                             | -           | 94.97                 | -           |
| 9                                                                     | 7.46 (s)                                               | -           | 153.67                | -           |
| 10                                                                    | -                                                      | -           | 108.53                | -           |
| 11                                                                    | -                                                      | -           | 166.87                | -           |
| 1'a                                                                   | 4.10 (dt, $J_{1'a,2'}$ = 7.1; $J_{1'a,1'b}$ = 10.8 Hz) | -           | 65.69                 | -           |
| 1b'                                                                   | 4.21 (dt, $J_{1'b,2'}$ = 7.1; $J_{1'b,1'a}$ = 10.8 Hz) | -           | 65.69                 | -           |

|                               |                                                                   |   |                     |   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---|---------------------|---|
| 2'                            | 2.84 ( <i>t</i> , $J_{2',1}= 7.1$ Hz)                             | - | 34.70               | - |
| 3'                            | -                                                                 | - | 130.24              | - |
| 4'                            | 6.71-6.73 ( <i>m</i> )                                            | - | 112.43              | - |
| 5'                            | -                                                                 | - | 149.01 <sup>a</sup> | - |
| 6'                            | -                                                                 | - | 147.93 <sup>a</sup> | - |
| 7'                            | 6.78 ( <i>d</i> , $J_{7',8'}= 8.8$ Hz)                            | - | 111.54              | - |
| 8'                            | 6.71-6.73 ( <i>m</i> )                                            | - | 121.01              | - |
| 1''                           | 4.81 ( <i>d</i> , $J_{1'',2''}= 7.7$ Hz)                          | - | 100.19              | - |
| 2''                           | 3.36-3.78 ( <i>m</i> )                                            | - | 73.37               | - |
| 3''                           | 3.36-3.78 ( <i>m</i> )                                            | - | 76.33               | - |
| 4''                           | 3.36-3.78 ( <i>m</i> )                                            | - | 70.06               | - |
| 5''                           | 3.36-3.78 ( <i>m</i> )                                            | - | 77.36               | - |
| 6''a                          | 3.36-3.78 ( <i>m</i> )                                            | - | 61.97               | - |
| 6''b                          | 3.92 ( <i>dd</i> , $J_{6''b,5''}= 4.4$ ; $J_{6''b,6''a}= 9.2$ Hz) | - | 61.97               | - |
| <i>O</i> -CH <sub>3</sub> -5' | 3.86 ( <i>s</i> )                                                 | - | 56.05               | - |
| <i>O</i> -CH <sub>3</sub> -6' | 3.83 ( <i>s</i> )                                                 | - | 56.07               | - |
| <i>O</i> -CH <sub>3</sub> -11 | 3.69 ( <i>s</i> )                                                 | - | 51.58               | - |

<sup>a</sup> These signal may be interchanged.

### (-)-6'-*O*-methyl-ligustroside (57)



(-)-6'-*O*-methyl-ligustroside (57)

White solid

$[\alpha]_D^{25} -154.0^\circ$  (*c* 0.7 cg/mL, MeOH)

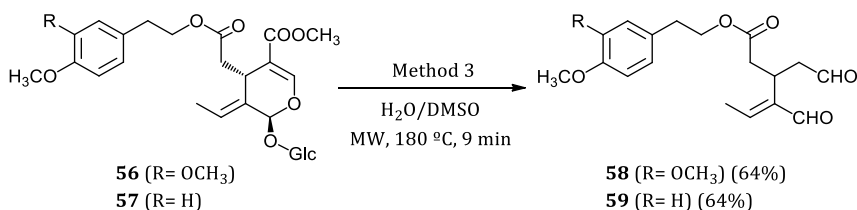
**ESI-MS:** *m/z* (positive mode): 561 [M+Na]<sup>+</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (positive mode): 400 (17), 399 (100), 383 (33), 367 (54).

**Table 14.4.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **57**.

| <b>(-)-6'-O-methyl-ligustroside (57) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                                    |             |                       |             |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| <b>Position</b>                                                    | <b><sup>1</sup>H</b>                                               | <b>COSY</b> | <b><sup>13</sup>C</b> | <b>HMBC</b> |
| 1                                                                  | -                                                                  | -           | 173.14                | -           |
| 2a                                                                 | 2.44 ( <i>dd</i> , $J_{2a,3}$ = 9.2; $J_{2a,2b}$ = 14.2 Hz)        | -           | 41.20                 | -           |
| 2b                                                                 | 2.76 ( <i>dd</i> , $J_{2b,3}$ = 4.5; $J_{2b,2a}$ = 14.2 Hz)        | -           | 41.20                 | -           |
| 3                                                                  | 3.96 ( <i>dd</i> , $J_{3,2b}$ = 4.5; $J_{3,2a}$ = 9.2 Hz)          | -           | 31.81                 | -           |
| 4                                                                  | -                                                                  | -           | 131.28                | -           |
| 5                                                                  | 6.07 ( <i>q</i> , $J_{5,6}$ = 7.0 Hz)                              | -           | 124.84                | -           |
| 6                                                                  | 1.64 ( <i>dd</i> , $J_{6,7}$ = 1.5; $J_{6,5}$ = 7.0)               | -           | 13.53                 | -           |
| 7                                                                  | 5.92 ( <i>brs</i> )                                                | -           | 95.14                 | -           |
| 9                                                                  | 7.51 ( <i>s</i> )                                                  | -           | 155.12                | -           |
| 10                                                                 | -                                                                  | -           | 109.38                | -           |
| 11                                                                 | -                                                                  | -           | 168.62                | -           |
| 1'a                                                                | 4.12 ( <i>dt</i> , $J_{1'a,2'}$ = 6.9; $J_{1'a,1'b}$ = 10.7 Hz)    | -           | 66.75                 | -           |
| 1'b                                                                | 4.25 ( <i>dt</i> , $J_{1'b,2'}$ = 6.9; $J_{1'b,1'a}$ = 10.8 Hz)    | -           | 66.75                 | -           |
| 2'                                                                 | 2.85 ( <i>t</i> , $J_{2',1'}$ = 6.9 Hz)                            | -           | 35.12                 | -           |
| 3'                                                                 | -                                                                  | -           | 130.46                | -           |
| 4'                                                                 | 7.15 ( <i>d</i> , $J_{4',5'}$ = 8.7 Hz)                            | -           | 130.99                | -           |
| 5'                                                                 | 6.85 ( <i>d</i> , $J_{5',4'}$ = 8.7 Hz)                            | -           | 114.97                | -           |
| 6'                                                                 | -                                                                  | -           | 159.86                | -           |
| 7'                                                                 | 6.85 ( <i>d</i> , $J_{7',8'}$ = 8.7 Hz)                            | -           | 114.97                | -           |
| 8'                                                                 | 7.15 ( <i>d</i> , $J_{8',7'}$ = 8.7 Hz)                            | -           | 130.99                | -           |
| 1''                                                                | 4.81 ( <i>d</i> , $J_{1'',2''}$ = 7.7 Hz)                          | -           | 100.19                | -           |
| 2''                                                                | 3.29-3.85 ( <i>m</i> )                                             | -           | 74.78                 | -           |
| 3''                                                                | 3.29-3.85 ( <i>m</i> )                                             | -           | 77.93                 | -           |
| 4''                                                                | 3.29-3.85 ( <i>m</i> )                                             | -           | 71.53                 | -           |
| 5''                                                                | 3.29-3.85 ( <i>m</i> )                                             | -           | 78.46                 | -           |
| 6''a                                                               | 3.92 ( <i>dd</i> , $J_{6''b,5''}$ = 4.4; $J_{6''b,6''a}$ = 9.0 Hz) | -           | 62.79                 | -           |
| 6''b                                                               | 3.29-3.85 ( <i>m</i> )                                             | -           | 62.79                 | -           |
| O-CH <sub>3</sub> -6'                                              | 3.76 ( <i>s</i> )                                                  | -           | 55.68                 | -           |
| O-CH <sub>3</sub> -11                                              | 3.71 ( <i>s</i> )                                                  | -           | 51.88                 | -           |

### 14.2.2 Synthesis of (-)-dimethyl-oleacein and (-)-methyl-oleocanthal

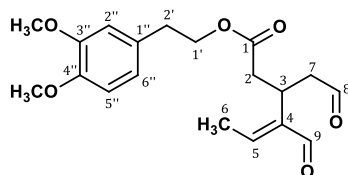


**Scheme 14.3.** Synthetic of (-)-3'',4''-dimethyl-oleacein and (-)-4''-O-methyl-oleocanthal.

#### Method 3 (Scheme 14.3)

A mixture of methyl secoiridoid **56** or **57** (0.3 mmol), H<sub>2</sub>O (5 mL) and DMSO (0.4 mL) was subjected to microwave irradiation (MW) for 9 min at 180 °C. The resulting crude reaction was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 × 30 mL). Organic layers were pooled, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give a dark brown oil. Every mixture obtained was purified by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:1:1:1, v/v/v/v) (Section 10.2.3) to give a yellow oil of **58** (67 mg) or **59** (61 mg). A portion (100 mg) of both crude reactions was purified by semipreparative HPLC (Instrument C; section 10.2.4) to give high pure compounds. Isocratic elution of MeCN:H<sub>2</sub>O:AcOH (29.9:69.9:0.2, v/v/v) was used to obtained **58** (53 mg) (*Table 14.5*) or **59** (50 mg) (*Table 14.6*), respectively.

#### (-)-3'', 4''-O-dimethyl-oleacein (**58**)



(-)-3'', 4''-O-dimethyl-oleacein (**58**)

Yellow oil

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -1.5^{\circ}$  ( $c$  1.1 cg/mL,  $\text{CHCl}_3$ ).

**ESI-MS:**  $m/z$  (positive mode): 371  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**ESI-MS/MS:**  $m/z$  (positive mode): 372 (12), 165 (100), 150 (22).

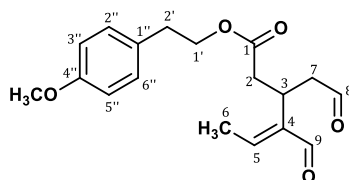
**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (positive mode): experimental: 349.1645  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  calculated: 349.1646 for  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Table 14.5.** NMR data in  $\text{CDCl}_3$  of compound **58**.

| <b>(-)-3'',4''-O-dimethyl-oleacein (58) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                               |                           |                                           |                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Position</b>                                                       | <b><math>^1\text{H}</math></b>                                | <b>COSY</b>               | <b><math>^{13}\text{C}^a</math>, HSQC</b> | <b>HMBC</b>                                     |
| 1                                                                     | -                                                             | -                         | (171.98)                                  | -                                               |
| 2a                                                                    | 2.60 ( <i>dd</i> , $J_{2a,3}= 6.6$ ;<br>$J_{2a,2b}= 16.0$ Hz) | 2.68, 3.56-<br>3.64       | 36.91                                     | 27.30, 46.30, 143.39,<br>171.98                 |
| 2b                                                                    | 2.68 ( <i>dd</i> , $J_{2b,3}= 8.4$ ;<br>$J_{2b,2a}= 16.0$ Hz) | 2.60, 3.56-<br>3.64       | 36.91                                     | 27.30, 46.30, 143.39,<br>171.98                 |
| 3                                                                     | 3.56-3.64 ( <i>m</i> )                                        | 2.60, 2.68,<br>2.73, 2.95 | 27.30                                     | 36.91, 46.30, 143.39,<br>154.26, 195.15, 200.41 |
| 4                                                                     | -                                                             | -                         | (143.39)                                  | -                                               |
| 5                                                                     | 6.61 ( <i>q</i> , $J_{5,6}= 7.0$<br>Hz)                       | 2.06                      | 154.26                                    | 15.31, 27.30, 195.15                            |
| 6                                                                     | 2.06 ( <i>d</i> , $J_{6,5}= 7.0$<br>Hz)                       | 6.61                      | 15.31                                     | 143.39, 154.26                                  |
| 7a                                                                    | 2.73 ( <i>dd</i> , $J_{7a,3}= 5.5$ ;<br>$J_{7a,7b}= 18.3$ Hz) | 2.95, 3.56-<br>3.64       | 46.30                                     | 27.30, 36.91, 143.39,<br>200.41                 |
| 7b                                                                    | 2.95 ( <i>dd</i> , $J_{7b,3}= 8.7$ ;<br>$J_{7b,7a}= 18.3$ Hz) | 2.73, 3.56-<br>3.64       | 46.30                                     | 27.30, 36.91, 143.39,<br>200.41                 |
| 8                                                                     | 9.62 ( <i>brs</i> )                                           | -                         | 200.41                                    | 27.30, 46.30                                    |
| 9                                                                     | 9.22 ( <i>d</i> , $J_{7b,7a}= 1.8$<br>Hz)                     | 3.56-3.64                 | 195.15                                    | 27.30, 143.39                                   |
| 1'                                                                    | 4.15-4.26 ( <i>m</i> )                                        | 2.82                      | 65.16                                     | 34.73, 130.28, 171.98                           |
| 2'                                                                    | 2.82 ( <i>t</i> , $J_{2',1'}= 7.0$<br>Hz)                     | 4.15-4.26                 | 34.73                                     | 65.16, 112.23, 120.95,<br>130.28                |
| 1''                                                                   | -                                                             | -                         | (130.28)                                  | -                                               |
| 2''                                                                   | 6.70-6.72 ( <i>m</i> )                                        | -                         | 120.95                                    | 34.73, 112.23, 147.86                           |
| 3''                                                                   | -                                                             | -                         | (149.00)                                  | -                                               |
| 4''                                                                   | -                                                             | -                         | (147.86)                                  | -                                               |
| 5''                                                                   | 6.78 ( <i>d</i> , $J_{5'',6''}= 7.9$<br>Hz)                   | 6.70-6.72                 | 111.41                                    | 130.28, 149.00                                  |
| 6''                                                                   | 6.70-6.72 ( <i>m</i> )                                        | -                         | 112.23                                    | 34.73, 120.95, 147.86                           |
| O-CH <sub>3</sub> -3''                                                | 3.85 ( <i>s</i> )                                             | -                         | 55.95 <sup>b</sup>                        | 149.00                                          |
| O-CH <sub>3</sub> -4''                                                | 3.84 ( <i>s</i> )                                             | -                         | 56.00 <sup>b</sup>                        | 147.86                                          |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons. <sup>b</sup> These signals may be interchanged.

**(-)-4''-O-methyl-oleocanthal (59)**



**(-)-4''-O-methyl-oleocanthal (59)**

Yellow oil

$[\alpha]_D^{25} -1.7^\circ$  (*c* 1.0 cg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

**ESI-MS:** *m/z* (positive mode): 341 [M+Na]<sup>+</sup>.

**ESI-MS/MS:** *m/z* (positive mode): 342 (18), 283 (18), 135 (100).

**HR-ESI-MS:** *m/z* (positive mode): experimental: 319.1540 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* calculated: 319.1540 for C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub>[M+H]<sup>+</sup>.

**Table 14.6.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **59**.

| <b>(-)-4''-O-methyl-oleocanthal (59) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                                            |                       |                                         |                                              |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>Position</b>                                                    | <b><sup>1</sup>H</b>                                                       | <b>COSY</b>           | <b><sup>13</sup>C<sup>a</sup>, HSQC</b> | <b>HMBC</b>                                  |
| 1                                                                  | -                                                                          | -                     | (172.02)                                | -                                            |
| 2a                                                                 | 2.61 ( <i>dd</i> , $J_{2a,3}=6.7$ ; $J_{2a,2b}=15.9$ Hz)                   | 2.68, 3.57-3.64       | 36.97                                   | 27.36, 46.32, 143.43, 172.02                 |
| 2b                                                                 | 2.68 ( <i>dd</i> , $J_{2b,3}=8.2$ ; $J_{2b,2a}=15.9$ Hz)                   | 2.61, 3.57-3.64       | 36.97                                   | 27.36, 46.32, 143.43, 172.02                 |
| 3                                                                  | 3.57-3.64 ( <i>m</i> )                                                     | -                     | 27.36                                   | 36.97, 46.32, 143.43, 154.32, 195.20, 200.49 |
| 4                                                                  | -                                                                          | -                     | (143.43)                                | -                                            |
| 5                                                                  | 6.62 ( <i>q</i> , $J_{5,6}=7.1$ Hz)                                        | 2.07                  | 154.32                                  | 15.35, 27.36, 195.20                         |
| 6                                                                  | 2.07 ( <i>d</i> , $J_{6,5}=7.1$ Hz)                                        | 6.62                  | 15.35                                   | 143.43, 154.32                               |
| 7a                                                                 | 2.73 ( <i>ddd</i> , $J_{7a,8}=0.9$ ; $J_{7a,3}=5.5$ ; $J_{7a,7b}=18.3$ Hz) | 2.95, 3.57-3.64, 9.63 | 46.32                                   | 27.36, 36.97, 143.43, 200.49                 |
| 7b                                                                 | 2.95 ( <i>ddd</i> , $J_{7b,8}=2.0$ ; $J_{7b,3}=8.7$ ; $J_{7b,7a}=18.3$ Hz) | 2.73, 3.57-3.64, 9.63 | 46.32                                   | 27.36, 36.97, 143.43, 200.49                 |
| 8                                                                  | 9.63 ( <i>t</i> , $J_{8,7a-7b}=1.2$ Hz)                                    | 2.73, 2.95            | 200.49                                  | 27.36, 46.32                                 |
| 9                                                                  | 9.23 ( <i>d</i> , $J_{9,7a-7b}=1.2$ Hz)                                    | 3.57-3.61             | 195.20                                  | 27.36, 143.43                                |
| 1'                                                                 | 4.15-4.25 ( <i>m</i> )                                                     | 2.83                  | 65.20                                   | 34.28, 129.80, 172.02                        |
| 2'                                                                 | 2.83 ( <i>t</i> , $J_{2',1}=7.0$ Hz)                                       | 4.15-4.25             | 34.28                                   | 65.20, 129.95                                |

|                           |                                           |      |          |                               |
|---------------------------|-------------------------------------------|------|----------|-------------------------------|
| 1''                       | -                                         | -    | (129.80) | -                             |
| 2''                       | 7.10 ( <i>brd</i> , $J_{2'',3''}=8.7$ Hz) | 6.83 | 129.95   | 34.28, 114.05, 129.95, 158.47 |
| 3''                       | 6.83 ( <i>brd</i> , $J_{3'',2''}=8.7$ Hz) | 7.10 | 114.05   | 114.05, 129.95, 158.47        |
| 4''                       | -                                         | -    | (158.47) | -                             |
| 5''                       | 6.83 ( <i>brd</i> , $J_{5'',6''}=8.7$ Hz) | 7.10 | 114.05   | 114.05, 129.95, 158.47        |
| 6''                       | 7.10 ( <i>brd</i> , $J_{6'',5''}=8.7$ Hz) | 6.83 | 129.95   | 34.28, 114.05, 129.95, 158.47 |
| <i>O</i> -CH <sub>3</sub> | 3.78 (s)                                  | -    | 55.37    | 158.47                        |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

### 14.3 Synthesis of (-)-oleacein, (-)-oleocanthal and their methylated derivatives in a multigram scale

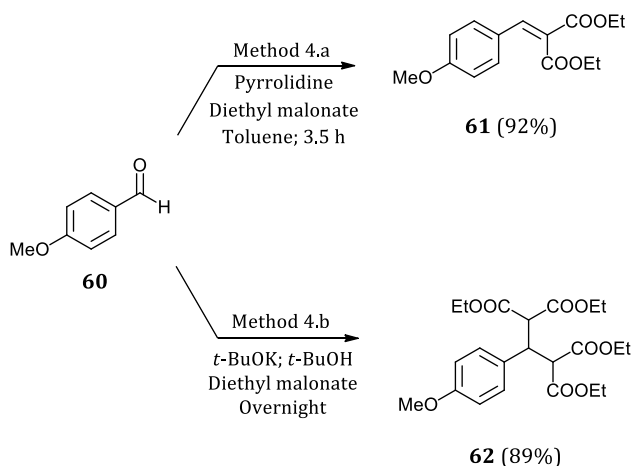
In order to obtain these compounds (**48**, **49** and **58**, **59**) in larger amounts, slight modifications of method 1.c and method 3 were introduced as follows:

A mixture of secoiridoid **52** (or **53**) (0.75 mmol) and H<sub>2</sub>O (25 mL) was subjected to microwave irradiation (MW) for 13 min at 180 °C. The resulting crude reaction was extracted with CHCl<sub>3</sub> (3×30 mL). Organic layers were pooled, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure to give a dark brown oil. This crude reaction was purified by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:1:1:1, v/v/v/v) (Section 10.2.3) to give pure **48** (139 mg) (or pure **49** (144 mg)).

A mixture of methyl secoiridoid (**56** or **57**) (1.3 mmol), H<sub>2</sub>O (23 mL) and DMSO (2 mL) was subjected to microwave irradiation (MW) for 12 min at 180 °C. The resulting crude reaction was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 × 30 mL). Organic layers were pooled, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give a dark brown oil. This crude reaction was purified by FCPC (Hex:EtOAc:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1:1:1:1, v/v/v/v) (Section 10.2.3) to give pure **58** (262 mg) (or pure **59** (260 mg)).

## 15. SYNTHESIS OF STRUCTURAL ANALOGS OF OLEOCANTAL

### 15.1 Reaction between 4-methoxybenzaldehyde and diethyl malonate

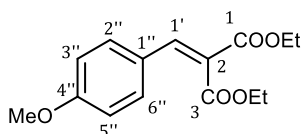


**Scheme 15.1.** Knoevenagel reaction (upper procedure) and Knoevenagel-Michael reaction (lower procedure) between 4-methoxybenzaldehyde and diethyl malonate.

#### Method 4.a (Scheme 15.1)

A mixture of 4-methoxybenzaldehyde (1.46 mmol), diethyl malonate (2.93 mmol), toluene (1.3 mL) and pyrrolidine (0.15 mmol) was stirred for 3.5 h at reflux. The reaction was monitored by GC (Instrument D, section 10.2.5). Then, the mixture is quenched with a solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10% in water) ( $2 \times 10$  mL) and extracted with DCM ( $3 \times 10$  mL). The organic layer was washed with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 10$  mL) and brine ( $2 \times 10$  mL). Finally, the organic phase was dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and the solvent removed under vacuum to give a yellow oil of **61** (381 mg) (Table 15.1).<sup>543</sup>



Diethyl 2-(4-methoxybenzylidene)malonate (**61**)Diethyl 2-(4-methoxybenzylidene)malonate (**61**)

Orange oil

**Table 15.1.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **61**.

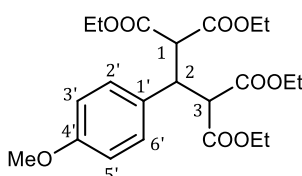
| Diethyl 2-(4-methoxybenzylidene)malonate ( <b>61</b> ) (XXVII) $\delta$ (ppm) |                                                 |      |                 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------|-----------------|------|
| Position                                                                      | <sup>1</sup> H                                  | COSY | <sup>13</sup> C | HMBC |
| 1                                                                             | -                                               | -    | -               | -    |
| 2                                                                             | -                                               | -    | -               | -    |
| 3                                                                             | -                                               | -    | -               | -    |
| 1'                                                                            | 7.66 (s)                                        | -    | -               | -    |
| 1''                                                                           | -                                               | -    | -               | -    |
| 2''                                                                           | 7.42 (d, $J_{3',4'} = 7.1$ Hz)                  | -    | -               | -    |
| 3''                                                                           | 6.68 (d, $J_{4',3'} = 7.1$ Hz)                  | -    | -               | -    |
| 4''                                                                           | -                                               | -    | -               | -    |
| 5''                                                                           | 6.68 (d, $J_{6',7'} = 7.1$ Hz)                  | -    | -               | -    |
| 6''                                                                           | 7.42 (d, $J_{7',6'} = 7.1$ Hz)                  | -    | -               | -    |
| O-CH <sub>3</sub>                                                             | 3.83 (s)                                        | -    | -               | -    |
| O-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                             | 1.31 (t, $J_{CH_3,CH_2} = 7.1$ Hz) <sup>a</sup> | -    | -               | -    |
| O-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                             | 4.29 (q, $J_{CH_2,CH_3} = 7.1$ Hz) <sup>b</sup> | -    | -               | -    |
| O-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                             | 1.32 (t, $J_{CH_3,CH_2} = 7.1$ Hz) <sup>a</sup> | -    | -               | -    |
| O-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                             | 4.35 (q, $J_{CH_2,CH_3} = 7.1$ Hz) <sup>b</sup> | -    | -               | -    |

<sup>a, b</sup> These signals may be interchanged.**Method 4.b**

To a mixture of potassium *tert*-butoxide (*t*-BuOK) (7.35 mmol) and anhydrous *tert*-butanol (14 mL) (section 10.1) was added dropwise diethyl malonate (58.8 mmol) under Ar at 70 °C. After stirring for 10 min, 4-methoxybenzaldehyde (14.7 mmol) was added to the solution at 70 °C and the mixture was stirred overnight. The reaction was monitored by GC (Instrument D, section 10.2.5). Then, the mixture was quenched with

a solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10% in water) ( $2 \times 15$  mL) and extracted with DCM ( $3 \times 20$  mL). The organic layer was washed with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 15$  mL) and brine ( $2 \times 15$  mL). Finally, the organic phase was dry over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and the solvent was removed under reduced pressure.<sup>544</sup> The excess of diethyl malonate was removed under vacuum, and the dry residue chromatographed by open column chromatography (Section 10.2.2) on silica gel 60 (0.040–0.063 mm) using a mixture of *n*-Hex:Et<sub>2</sub>O (7:3, v/v) as eluent to give a yellow oil of pure **62** (2.8 g). (**Table 15.2**).

**Tetraethyl 2-(4-methoxyphenyl)-propane-1,1,3,3-tricarboxylate (**62**)**



Tetraethyl 2-(4-methoxyphenyl)-propane-1,1,3,3-tetracarboxylate (**62**)

Yellow oil

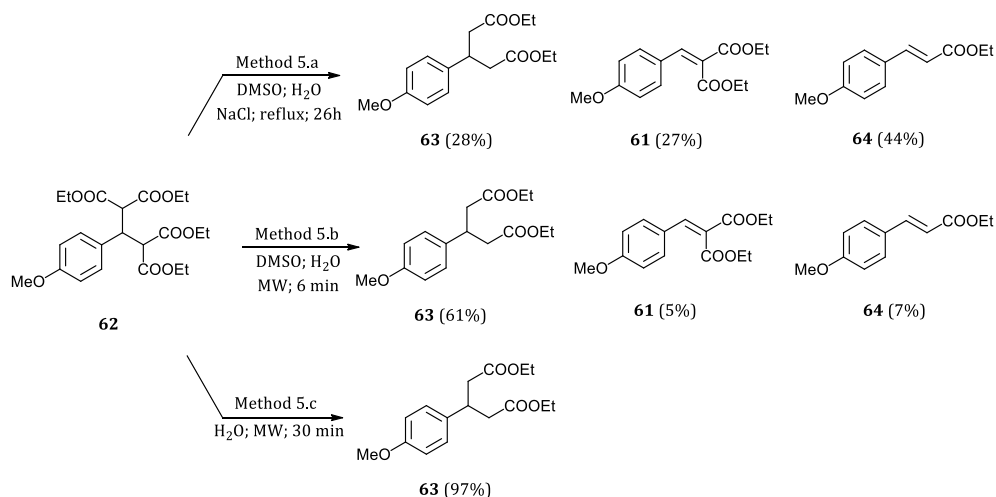
**Table 15.2.** NMR data in  $\text{CDCl}_3$  of compound **62**.

| <b>Tetraethyl 2-(4-methoxyphenyl)-propane-1,1,3,3-tricarboxylate (<b>62</b>) <math>\delta</math> (ppm)</b> |                                                            |             |                                     |                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Position</b>                                                                                            | <b><math>^1\text{H}</math></b>                             | <b>COSY</b> | <b><math>^{13}\text{C}^a</math></b> | <b>HMBC</b>                   |
| 1                                                                                                          | 4.03-4.05 ( <i>m</i> )                                     | 4.15        | 55.50                               | 43.31, 129.38, 168.24, 167.70 |
| 2                                                                                                          | 4.14-4.16 ( <i>m</i> )                                     | 4.04        | 43.31                               | 14.07, 168.24                 |
| 3                                                                                                          | 4.03-4.05 ( <i>m</i> )                                     | 4.15        | 55.50                               | 43.31, 129.38, 168.24, 167.70 |
| 1'                                                                                                         | -                                                          | -           | (129.38)                            | -                             |
| 2'                                                                                                         | 7.25 ( <i>d</i> , $J_{2',3'} = 8.8$ Hz)                    | 6.77        | 130.79                              | 130.79, 159.05                |
| 3'                                                                                                         | 6.77 ( <i>d</i> , $J_{3',2'} = 8.8$ Hz)                    | 7.25        | 113.50                              | 129.38, 159.05                |
| 4'                                                                                                         | -                                                          | -           | (159.05)                            | -                             |
| 5'                                                                                                         | 6.77 ( <i>d</i> , $J_{5',6'} = 8.8$ Hz)                    | 7.25        | 113.50                              | 129.38, 159.05                |
| 6'                                                                                                         | 7.25 ( <i>d</i> , $J_{6',5'} = 8.8$ Hz)                    | 6.77        | 130.79                              | 130.79, 159.05                |
| <i>O</i> -CH <sub>3</sub>                                                                                  | 3.75 ( <i>brs</i> )                                        | -           | 55.28                               | -                             |
| 2 x <i>O</i> -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                                              | 1.04 ( <i>t</i> , $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = 7.1$ Hz) | 3.94        | 13.91                               | 61.41                         |

|                                                   |                                                             |      |       |               |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------|-------|---------------|
| 2 x $O\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_3$ | 3.94 ( $q, J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 7.1 \text{ Hz}$ ) | 1.04 | 61.41 | 13.91, 168.24 |
| 2 x $O\text{-}\text{CH}_2\underline{\text{CH}_3}$ | 1.22 ( $t, J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = 7.1 \text{ Hz}$ ) | 4.11 | 14.07 | 61.75         |
| 2 x $O\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_3$ | 4.10-4.13 ( $m$ )                                           | 1.22 | 61.75 | 14.07, 167.70 |

<sup>a</sup> Values between parenthesis correspond to quaternary carbons.

## 15.2 Krapcho decarboxylation of the tetraester **62**



**Scheme 15.2.** Krapcho decarboxylation of the tetraester **62**.

### Method 5.a (Scheme 15.2)

A mixture of tetraester **62** (0.54 mmol), NaCl (0.54 mmol), H<sub>2</sub>O (5.4 mmol) and DMSO (1.25 mL) was stirred for 26 h at reflux. The reaction was monitored by GC (Instrument D, section 10.2.5). Then, the mixture was extracted with DCM (3×10 mL). The organic phase was dry over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered, and the solvent removed under vacuum to yield a brown oil (172 mg).

### Method 5.b (Scheme 15.2)

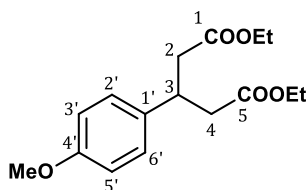
A mixture of tetraester **62** (0.46 mmol), H<sub>2</sub>O (4.5 mL) and DMSO (0.5 mL) was subjected to microwave irradiation for 6 minutes at 180 °C. The reaction was monitored by GC (Instrument D, section 10.2.5). Then, the mixture was extracted with

DCM (3×10 mL). The organic phase was dry over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered, and the solvent was removed under vacuum to yield a yellow oil (108 mg).

#### Method 5.c (Scheme 15.2)

A mixture of tetraester **62** (0.46 mmol) and H<sub>2</sub>O (5 mL) was subjected to microwave irradiation for 30 minutes at 180 °C. The reaction was monitored by GC (Instrument D, section 10.2.5). Then, the mixture was extracted with DCM (3×10 mL). The organic phase was dry over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered, and the solvent was removed under vacuum to yield a yellow oil of **63** (112 mg) (Table 15.3).

#### Diethyl 3-(4-methoxyphenyl)pentanedioate (**63**)



Diethyl 3-(4-methoxyphenyl)pentanedioate (**63**)

Yellow oil

**Table 15.3.** NMR data in CDCl<sub>3</sub> of compound **63**.

| Diethyl 3-(4-methoxyphenyl)pentanedioate ( <b>63</b> ) $\delta$ (ppm) |                                                                       |      |                 |      |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------|-----------------|------|
| Position                                                              | <sup>1</sup> H                                                        | COSY | <sup>13</sup> C | HMBC |
| 1                                                                     | -                                                                     | -    | 171.84          | -    |
| 2a                                                                    | 2.59 ( <i>dd</i> , J <sub>2a,3</sub> = 8.3, J <sub>2a,2b</sub> =15.3) | -    | 41.08           | -    |
| 2b                                                                    | 2.68 ( <i>dd</i> , J <sub>2b,3</sub> = 8.3, J <sub>2b,2a</sub> =15.3) | -    | 41.08           | -    |
| 3                                                                     | 3.56-3.63 ( <i>m</i> )                                                | -    | 37.81           | -    |
| 4a                                                                    | 2.59 ( <i>dd</i> , J <sub>4a,3</sub> = 8.3, J <sub>4a,4b</sub> =15.3) | -    | 41.08           | -    |
| 4b                                                                    | 2.68 ( <i>dd</i> , J <sub>4b,3</sub> = 8.3, J <sub>4b,4a</sub> =15.3) | -    | 41.08           | -    |
| 5                                                                     | -                                                                     | -    | 171.84          | -    |
| 1'                                                                    | -                                                                     | -    | 134.70          | -    |
| 2'                                                                    | 7.14 ( <i>d</i> , J <sub>2',3'</sub> = 8.7)                           | -    | 128.40          | -    |

|                                               |                                                            |   |        |   |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---|--------|---|
| 3'                                            | 6.82 ( <i>d</i> , $J_{3',2'} = 8.7$ )                      | - | 114.05 | - |
| 4'                                            | -                                                          | - | 158.52 | - |
| 5'                                            | 6.82 ( <i>d</i> , $J_{5',6'} = 8.7$ )                      | - | 114.05 | - |
| 6'                                            | 7.14 ( <i>d</i> , $J_{6',5'} = 8.7$ )                      | - | 158.52 | - |
| <i>O</i> -CH <sub>3</sub>                     | 3.78 ( <i>s</i> )                                          | - | 55.34  | - |
| 2 x <i>O</i> -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4.03 ( <i>q</i> , $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 7.2$ Hz) | - | 14.26  | - |
| 2 x <i>O</i> -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 1.13 ( <i>t</i> , $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = 7.2$ Hz) | - | 60.53  | - |

---

### 15.3 Reduction of diester 63

The reduction of diester **63** was attempted by two methods:

#### Method 6.a

To a mixture of diester **63** (0.34 mmol) and anhydrous THF (2.7 mL) (Section 10.1) was added dropwise diisobutylaluminum hydride (DIBAL) (0.94 mmol) under Ar at -78 °C. After stirring the mixture for 6 h at this temperature, anhydrous methanol (0.34 mL) was added. After 5 min, H<sub>2</sub>O (0.68 mL) was added. Then, the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. The crude reaction was washed with a solution of NH<sub>4</sub>Cl (10% in water) (2×10 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (3×10 mL). The organic layer was washed with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (2×10 mL) and brine (2×10 mL). Finally, the organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent removed under reduced pressure to yield a yellow oil (69.2 mg).<sup>545</sup>

#### Method 6.b

To a mixture of diester **63** (0.17 mmol) and anhydrous THF (1 mL) (Section 10.1) was added cautiously lithium aluminum hydride (LiAlH<sub>4</sub>) (0.68 mmol) under Ar at 0 °C. After stirring the mixture for 10 min, it was allowed to warm and left stirring for 24 h. Then, the mixture was quenched with a solution of HCl (10% in water) (2×15 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (3×5 mL). The organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (2×5 mL) and brine (2×5 mL). Finally, the organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent removed under reduced pressure to yield a yellow oil (53.2 mg).<sup>582</sup>

## **16. BIOLOGICAL ACTIVITIES**

### **16.1 Antioxidant activity**

The antioxidant activity of a given sample was spectrophotometrically evaluated using the DPPH radical scavenging assay, with slight modifications respect to the method described by Brand-Williams *et al.*<sup>551</sup> and von Gadow *et al.*<sup>583</sup>

#### **16.1.1 Offline quantitative assay**

Methanolic solutions of dry EtOAc extracts of cherry tree, European plum tree, Japanese plum tree, lichi tree and cranberry extract at different concentrations (100–0.5 µg/mL) were prepared. These methanolic solutions (0.4 mL) were mixed with 0.8 mL of methanolic solution of the stable DPPH radical ( $7.09 \times 10^{-5}$  M, and an absorbance at 515 nm of  $0.80 \pm 0.03$  AU). Solutions were mixed in semi-micro disposable plastic cuvettes (1.2 mL), shaken and kept in the dark at room temperature for 15 minutes. Next, the decreased of absorbance was measured at 515 nm. The solution of DPPH<sup>•</sup> was prepared dissolving 2.9 mg of DPPH radical with 100 mL of MeOH and the absorbance was adjusted to  $0.800 \pm 0.030$  ( $\lambda = 515$  nm). The exact concentration of DPPH radical in the solution was calculated by interpolation in a calibration curve ( $y = 0.0976x - 0.012$ ,  $R^2 = 0.9998$ ). Blank was prepared with 0.8 mL of DPPH radical solution and 0.4 mL of MeOH. Samples were measured in triplicate.

#### **16.1.2 Online qualitative assay**

Online assay of antioxidant activity was carried out in an equipment constituted by instrument A (Section 10.2.4) combined with a post-column reaction system. After HPLC separation ( $0.7 \text{ mL min}^{-1}$ ), eluted compounds were splitted with a six-ports switching *Waters Selector Valve* and mixed with a methanolic DPPH<sup>•</sup> solution ( $7.09 \times 10^{-5}$  M). Radical solution was supplied by a *Waters Reagent Manager* pump at  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ . Reaction between eluates and DPPH<sup>•</sup> was achieved in a  $3.5 \times 0.25$  mm i.d.

PEEK (polyetheretherketone) reaction coil. The decreased in absorbance was measured at 515 nm in the Waters 2996 DAD (**Figure 16.1**). Samples of EtOAc extracts of cherry wood ('Starking'), European plum wood ('De la Rosa'), Japanese plum wood ('Showtime'), lichi wood ('Mauritius'), and cranberry were injected at a concentration of 40  $\mu\text{g/mL}$ .

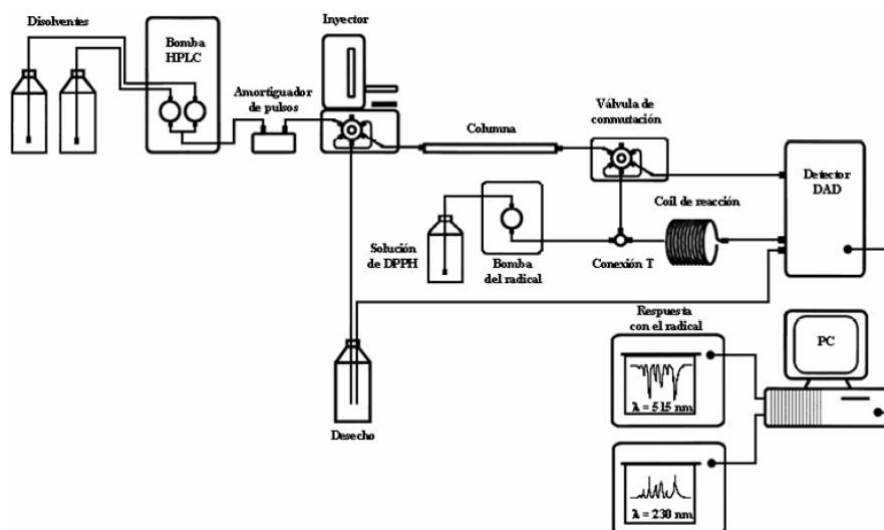


**Figure 16.1.** HPLC–DAD–DPPH system used to detect antioxidant compounds in complex mixtures.

## 16.2 Inhibition of LDHA activity

Enzymatic activity on recombinant human LDHA was determined in the presence of pyruvate as substrate and  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form ( $\beta$ -NADH), as cofactor, both in saturated conditions in potassium phosphate buffer, pH 7.4.<sup>570,584,585</sup> The enzymatic assay was performed on 96-well microplates and the decrease in the  $\beta$ -NADH absorbance (340 nm) was measured in a *Synergy HT* Multi-Detector Microplate Reader (BioTeK Instrument, Inc.) for 10 min at 28 °C. All measurements were made in triplicate.

Solutions of LDHA (0.0125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 3.75 units/mL),  $\beta$ -NADH (0.375 mM) and pyruvate (2.66 mM) were prepared in potassium phosphate buffer (100 mM) immediately before measurement.

To determine the percentage of inhibition of LDHA at a single dose of stock solutions of ethyl acetate extracts, these were prepared by dissolving the extracts in DMSO at a concentration of 2.88 mg/mL (28.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in well). Stock solutions of pure compounds were prepared in DMSO at 5 mM (to determine the percentage of inhibition of LDHA at a single dose, 50  $\mu\text{M}$  in well) and at 20 mM (to determine the  $\text{IC}_{50}$  values). For the  $\text{IC}_{50}$  assay, eight 1:3 serial dilutions in phosphate buffer were obtained from the original one at 20 mM (final concentrations in the range of 0.09–200  $\mu\text{M}$ ).

In each well, the final volume was set to 200  $\mu\text{L}$  and the final concentrations were 100 mM potassium phosphate buffer; 0.041 units/mL LDHA; 155  $\mu\text{M}$   $\beta$ -NADH; 1mM pyruvate. Controls for the establishment of the 0% and 100% enzymatic activity were introduced in the assay. In the case of the 0% control, phosphate buffer was added instead of pyruvate, whilst for the 100% control, DMSO without inhibitor was added. The compound GSK was used as a positive control at 1  $\mu\text{M}$  in well. The concentration of DMSO was kept at 1% (v/v) in all wells, control ones included.

In order to correct possible interferences of the inhibitor absorbance, the assay plates were incubated at 28 °C for 10 minutes and a baseline reading was conducted at 340 nm. Then, pyruvate was added to the assay plates and these plates were read at 340 nm for 10 minutes every 60 seconds. A suitable linear timeframe was selected to calculate the slope of each concentration.

### **16.3 Antimicrobial activity**

The antimicrobial activity of pure compounds **1**, **4**, **5**, **12**, **15** and **17**, isolated from cherry tree wood (cultivar ‘Starking’), and **20–26**, isolated from European plum tree wood (cultivar ‘De la Rosa’) was measured. For that, strains from the Spanish Type Culture Collection (CECT) and the Culture Collection of the University of Göteborg (CCUG), and strains previously isolated in Drs. Gálvez and Ortega’s laboratory from



organic foods and showing high tolerance to biocides and resistance to antibiotics, were used.<sup>586</sup>

#### 16.4 Antitumoral activity

The antitumor activity of (–)-oleocanthal (**49**), isolated from olive oil, was measured on breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231, and non-tumoral cell MCF10A, according to the protocol reported by Diez-Bello *et al.*<sup>578</sup>

In addition, the apoptotic effect of (–)-oleocanthal (**49**), isolated from olive oil, was measured on cancer cell lines MDA-MB-231, MCF7, G361, HT144, HCT 116, HeLa, A549, MIA PaCa-2, 293T, Caco-2, JEG-3, NCI-H460, Jurkat, CEM, Raji and K562, according to the protocol reported by Pastorio.<sup>579</sup>

#### 16.5 Antiinflammatory activity

The anti-inflammatory effect of monoaldehydic form of ligustroside aglycone (**51**) and (–)-oleocanthal (**49**), isolated from olive oil, and (–)-methyl-oleocanthal (**59**), synthetized from (–)-methyl-ligustroside, was evaluated in LPS-stimulated murine peritoneal macrophages, according to the protocol reported by Castejón *et al.*<sup>587</sup> Macrophager were isolated as previously described Montoya *et al.*<sup>588</sup>

#### 16.6 Antiangiogenic activity

The antiangiogenic activity of (–)-oleacein (**48**) and (–)-oleocanthal (**49**), isolated from olive oil, was measured on endothelial cells line.

CONCLUSIONES

**PRIMERA.** Se ha estudiado la composición química de la parte leñosa de la poda de siete variedades distintas de cerezo (*Prunus avium* L.): ‘Garrafal Napoleón’, ‘Picota’, ‘Burlat’, ‘Starking’, ‘Summit’, ‘Monzón’ y ‘Lapins’. El análisis por HPLC–DAD de los extractos de acetato de etilo ha permitido seleccionar el de la variedad ‘Starking’ como más adecuado para proceder al aislamiento de componentes. El fraccionamiento sucesivo de este extracto ha conducido al aislamiento de ácido benzoico (**3**), un flavan-3-ol (**1**), tres flavanones (**2**, **4** y **5**), siete flavanonas (**6**, **7**, **8**, **10**, **12**, **14** y **15**) y dos flavonas (**16** y **17**). Además, se han identificado tentativamente por HPLC–DAD/ESI–MS otros tres componentes. La incorporación de la técnica de cromatografía de partición centrífuga rápida (FCPC) al protocolo de purificación de componentes ha supuesto una mejora interesante respecto de la metodología convencional. Los compuestos (–)-catequina (**1**), (–)-taxifolina (**4**) y (+)-dihidrowogonina (**12**) se han aislado por primera vez en *Prunus avium* L.

**SEGUNDA.** La cuantificación individual por HPLC de todos los flavonoides identificados en los extractos de acetato de etilo de las muestras de madera de cerezo estudiadas, haciendo uso del método de calibración externa, ha permitido concluir que las variedades ‘Starking’ y ‘Garrafal Napoleón’ presentan la concentración total más alta en este tipo de compuestos, por lo que serían las más interesantes para llevar a cabo en el futuro un hipotético aprovechamiento de este recurso natural. La subfamilia de las flavanonas es la de mayor peso en todas las variedades, salvo en ‘Burlat’, en la que predomina el flavan-3-ol **1**. Las variedades ‘Burlat’, ‘Starking’, ‘Summit’ (de Torres) y ‘Lapins’ contienen principalmente el componente **1**, mientras que ‘Garrafal Napoleón’, ‘Picota’, ‘Summit’ (de Alcalá) y ‘Monzón’ contienen como mayoritario el compuesto **10**. (–)-Catequina (**1**) y (–)-taxifolina (**4**) no tienen una distribución amplia en la naturaleza y son el primer y segundo componentes en ‘Burlat’ y ‘Garrafal Napoleón’, respectivamente.

**TERCERA.** Se ha estudiado la composición química de la parte leñosa de la poda de cuatro variedades distintas de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.): ‘Reina Claudia Verde’, ‘Claudia de Tolosa’, ‘Standley’ y ‘De la Rosa’. El análisis por HPLC–DAD de los extractos de acetato de etilo ha permitido seleccionar el de la variedad ‘De la Rosa’

como más interesante para proceder al aislamiento de componentes. El fraccionamiento sucesivo de este extracto, con la ayuda de la técnica de FCPC, ha permitido aislar siete compuestos, seis de los cuales pertenecen a la familia de las proantocianidinas diméricas (Tipo A), concretamente a la subfamilia de las procianidinas (**21** y **22**), y el resto a la de las propelargonidinas (**23–26**). Además, se han identificado tentativamente otros dos (**18** y **19**) a partir de su patrón de fragmentación observado en el análisis por HPLC–DAD/ESI–MS y comparando su tiempo de retención con el de patrones comerciales. El glucósido fenólico (–)-anfenona (**20**) y las proantocianidinas **21–26** se han aislado por primera vez en *Prunus domestica* L.

**CUARTA.** La cuantificación individual por HPLC de los compuestos aislados e identificados en los extractos de acetato de etilo de ciruelo europeo de todas las maderas estudiadas, haciendo uso del método de calibración externa, ha dado como resultado que la variedad ‘De la Rosa’ presenta el valor más elevado de concentración total en proantocianidinas, destacando por encima de todas las variedades, y por ello, resultando la más interesante como fuente natural de estos compuestos. En todas las variedades predominan las proantocianidinas frente a los flavan-3-oles y, dentro del primer grupo, son más abundantes las procianidinas (**21** y **22**) que las propelargonidinas (**23–26**), en general. El componente principal en ‘Reina Claudia Verde’ es (–)-anfenona (**20**), en ‘Claudia de Tolosa’ es (+)-catequina (**18**), y en ‘De la Rosa’ y ‘Standley’ es (–)-*ent*-epicatequina-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-catequina (**21**), una procianidina poco abundante en la naturaleza.

**QUINTA.** Se ha estudiado la composición química de la parte leñosa de la poda de seis variedades distintas de ciruelo japonés (*Prunus salicina* L.): ‘Songold’, ‘Angeleno’, ‘Fortune’, ‘Red Beaut’, ‘Souvenir’ y ‘Showtime’. El trabajo de purificación de componentes realizado previamente sobre ciruelo europeo ha permitido identificar, por HPLC–DAD y HPLC–DAD/ESI–MS, ocho compuestos (**18**, **19**, **21–26**) en los extractos de acetato de etilo de estas maderas. La cuantificación individual por HPLC de componentes ha permitido deducir que la variedad ‘Showtime’ es la que presentaba mayor concentración de compuestos fenólicos, tanto flavan-3-oles (**18** y **19**) como

proantocianidinas (**21–26**). La procianidina **22** es el componente principal en ‘Angeleno’ (cultivo ecológico), ‘Fortune’ y ‘Showtime’, mientras que la propelargonidina **24** es mayoritaria en ‘Angeleno’ (recogidas en Sevilla y Córdoba), ‘Red Beaut’ y ‘Souvenir’. La procianidina **21** es mayoritaria sólo en la variedad ‘Songold’. En ciruelo japonés no se ha identificado (–)-anfenona (**20**), la cual sí estaba presente en madera de ciruelo europeo.

**SEXTA.** Se ha estudiado la composición química de la parte leñosa de la poda de dos variedades del cultivo tropical de lichi (*Litchi chinensis* Sonn.): ‘Bengal’ y ‘Mauritius’. El análisis por HPLC–DAD de los extractos de acetato de etilo ha permitido seleccionar el de la variedad ‘Mauritius’ como más interesante para continuar con el trabajo de aislamiento de componentes. El fraccionamiento sucesivo de este extracto, con la ayuda de la técnica de FCPC, ha permitido aislar un flavan-3-ol (**29**), dos procianidinas diméricas tipo A (**32** y **33**) y una procianidina trimérica (**30**), además de identificar tentativamente por HPLC–DAD/ESI–MS dos procianidinas diméricas, una con unión tipo A (**31**) y otra con unión tipo B (**28**), y una tetramérica con una unión tipo A y dos de tipo B (**27**). El análisis por HPLC–DAD/ESI–MS de una agrupación obtenida en el fraccionamiento del extracto permitió proponer tentativamente la estructura de seis proantocianidinas minoritarias, cinco de ellas triméricas con diferente unión interflavonoide (**34–38**), y otra dimérica tipo A (**39**). La posición relativa de los monómeros que conforman estas proantocianidinas pudo determinarse mediante el estudio detallado de los modelos de fragmentación observados en sus respectivos espectros de masas. Las moléculas aisladas (**29**, **30**, **32** y **33**) ya habían sido descritas en otras partes de este árbol tropical, aunque se han obtenido por primera vez a partir de la madera en esta Tesis Doctoral.

**SÉPTIMA.** La cuantificación individual por HPLC de los compuestos mayoritarios identificados en el extracto de acetato de etilo de lichi de las dos variedades estudiadas, haciendo uso del método de calibración externa, demostró que la concentración de cinamtanina B-1 (**30**), una procianidina trimérica tipo A de interés comercial, era muy superior al resto de moléculas, encontrándose en mayor cantidad en la variedad ‘Bengal’ (1.45 mg/g madera seca) que en ‘Mauritius’ (0.95 mg/g madera seca).

Teniendo en cuenta que la cinamtanina B-1 (**30**) que actualmente proporciona el grupo de investigación FQM-182 (del que forman parte el autor y directores de esta Tesis) a las empresas suizas que la comercializan, se aísla de la madera de laurel, en la que se encuentra en una concentración de 1.30 mg/g madera seca, podría decirse que la madera de lichi 'Bengal' es una nueva fuente natural de este compuesto de interés biomédico.

**OCTAVA.** A partir de un extracto hidroalcohólico comercial de arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) ha sido posible obtener una fracción rica en procianidinas diméricas tipo A, con la ayuda de la técnica FCPC. La composición química de esa fracción fue analizada por HPLC-DAD/ESI-MS, lo que permitió identificar seis procianidinas diméricas tipo A, entre las que se encontraban dos que ya habían sido aisladas en ciruelo europeo (**21** y **22**), una en lichi (**32**) y la procianidina A-1 (**40**), además de los flavan-3-oles catequina (**18**) y epicatequina (**19**). Tras la cuantificación individual por HPLC de componentes, haciendo uso del método de calibración externa, se concluyó, por un lado, que la concentración en procianidinas era muy superior a la de flavan-3-oles y, por otro, que las moléculas **21** y **40** eran la que se encontraban en mayor concentración. Esta fracción constituía el 0.53% en peso del extracto comercial y es un buen punto de partida para seguir explorando las potenciales aplicaciones de estas moléculas tan interesantes desde un punto de vista biológico.

**NOVENA.** Se han identificado y cuantificado triterpenoides pentacíclicos (ácidos maslínico, oleanólico y betulínico; eritrodiol y uvaol) en fruto, hoja, tallo y raíz de olivo de las variedades 'Picual', 'Frantoio' y 'Koroneiki', cultivadas en idénticas condiciones medioambientales y agronómicas, y recogidas en dos meses consecutivos (octubre y noviembre). En fruto se detectaron únicamente los ácidos maslínico y oleanólico, y su concentración fue inferior a la observada en hoja. La hoja presentó la concentración más elevada de estos compuestos, identificando, además, los alcoholes triterpénicos eritrodiol y uvaol, aunque en menor concentración que los compuestos anteriores. En tallo, como ocurría en hoja, también se han identificado estos cuatro triterpenoides, aunque su composición varía considerablemente de un mes a otro. Las muestras de raíz

presentaron la concentración más baja en estos compuestos, lo que obligó a hacer cuantificación por HPLC–DAD/ESI–MS. En este órgano fue en el único en el que se detectó el ácido betulínico, junto con los ácidos maslínico y oleanólico.

**DÉCIMA.** La técnica de FCPC, junto con la de HPLC semipreparativa, han permitido aislar de forma eficiente a partir de aceite de oliva los fenoles (–)-oleaceína (**48**), (–)-oleocantal (**49**) y las formas monoaldehídicas de los aglicones de oleuropeína (**50**) y ligustrósido (**51**). Estos compuestos son especialmente lábiles en contacto con fases estacionarias sólidas, por lo que el empleo de la cromatografía en contracorriente fue irrenunciable para abordar su purificación. La selección de **48** y **49** para ser evaluados posteriormente en un modelo de inflamación *in vivo* de Lupus eritematoso sistémico, hizo necesaria la obtención de estos compuestos en cantidades multigramo, lo que motivó la búsqueda de aceites de oliva especialmente ricos en estos componentes. Por tal motivo se analizaron muestras de aceite de oliva de diferentes categorías comerciales y variedades con el fin de encontrar una fuente natural adecuada a partir de la que obtener estos compuestos más fácilmente. El aceite con mayor presencia de oleocantal contenía ca. 115 mg (por Kg de aceite), y el de mayor contenido en oleaceína, en torno a 155 mg/Kg, por lo que se necesitaría procesar una cantidad muy de aceite de oliva para alcanzar el objetivo.

**UNDÉCIMA.** Descartada la opción de obtener (–)-oleaceína (**48**) y (–)-oleocantal (**49**) en cantidad multigramo a partir de aceite de oliva, se planteó su semisíntesis a partir de los secoiridoides (–)-oleuropeína (**52**) y (–)-ligustrósido (**53**), respectivamente, tomando como base el único trabajo de conversión de **52** en **48** publicado hasta la fecha (en la que se inició este bloque de trabajo en la Tesis), con un rendimiento de reacción del 21.8%. Para ello, era necesario encontrar previamente una fuente adecuada de los secoiridoides de partida **52** y **53**, por lo que se midieron sus concentraciones en madera y hoja de una selección variedades de olivo y de otras especies de la familia de las oleáceas (fresno y aligustre), encontrando que la hoja de olivo y la madera de olivo podrían ser las mejores fuentes de **52** y **53**, respectivamente. Más en concreto, la hoja de olivo ‘Picual’ contiene más de 60 mg de **52** por gramo de hoja, y la madera de olivo ‘Arbequina’ contiene en torno a 1 mg de **53** por gramo de madera. La hoja de ninguna

de las muestras estudiadas contenía **53**, mientras que todas las maderas contenían ambos secoiridoides, salvo alguna excepción, si bien en todas las muestras de madera predominaba **52** frente a **53**.

**DUODÉCIMA.** Se midió la concentración de los secoiridoides (–)-oleuropeína (**52**) y (–)-ligustrósido (**53**) en muestras de hoja y madera de tres especímenes de olivo de la variedad ‘Picual’ situados en fincas agrícolas distintas, cada dos meses y durante un año. A pesar de que la variación estacional de **52** y **53** de cada árbol tenía sus particularidades, se concluyó que la mejor época de recogida de hoja y madera de los tres olivos seleccionados, en la que se acumulaban las mayores cantidades de **52** y **53**, podría ser el inicio de la primavera, coincidiendo con la época de poda del olivo. Se determinó también la concentración de **52** y **53** en piezas de madera de olivo de diferente grosor recogidas en época de poda, habiendo encontrado que el contenido en **52** y **53** crece con el diámetro de la rama, sobre todo más claramente para **53**.

**DECIMOTERCERA.** Se ha desarrollado un método semisintético de (–)-oleaceína (**48**) y (–)-oleocantal (**49**) con buenos rendimientos (61% y 65%, respectivamente) a partir de los secoiridoides (–)-oleuropeína (**52**) y (–)-ligustrósido (**53**), aislados de madera de olivo. La reacción se llevó a cabo en un reactor microondas a 180 °C durante unos minutos, empleando exclusivamente agua como disolvente. Se llevó a cabo el seguimiento de la reacción por HPLC–DAD, cuantificando la desaparición de los productos de partida (**52** y **53**) y la aparición de los productos finales (**48** y **49**), observando que el tiempo óptimo de reacción era de 10 minutos (en el equipo de microondas utilizado y en esas condiciones concretas), lo que permitió mejorar considerablemente el procedimiento. Los resultados obtenidos son los mejores hasta la fecha, de entre los publicados.

**DECIMOCUARTA.** Teniendo en cuenta que se necesitaban del orden de 2 g de (–)-oleaceína (**48**) y 2 g de (–)-oleocantal (**49**) para que pudiera ponerse en marcha un modelo de inflamación *in vivo* de Lupus eritematoso sistémico (en la Universidad de Sevilla), se hizo necesario estudiar el cambio de escala de las síntesis de **48** y **49** previamente optimizadas. Tras las pruebas efectuadas, se consiguió hacer reaccionar



cuatro veces más de producto de partida, sin que se viera afectado el tiempo de reacción, cuyo óptimo pasó de 10 a 13 minutos, ni los rendimientos de reacción (58% y 63%, respectivamente), que sólo fueron ligeramente inferiores a los observados a pequeña escala.

**DECIMOQUINTA.** Se llevó a cabo la síntesis de los derivados *O*-metilados de oleuropeína y ligustrósido a partir de (–)-oleuropeína (**52**) y (–)-ligustrósido (**53**), empleando los agentes metilantes sulfato de dimetilo y diazometano. Con el primero de ellos, en medio básico y en un reactor microondas (7 minutos a 70 °C), sólo se obtuvieron los derivados monometilados de oleuropeína (**54** y **55**) y con bajos rendimientos (6.2% y 5.4%). El ligustrósido no reaccionó en estas condiciones. Por el contrario, la reacción de **52** y **53** con diazometano a temperatura ambiente permitió la obtención de (–)-5',6'-*O*-dimetil-oleuropeína (**56**) y (–)-6'-*O*-metil-ligustrósido (**57**) con buenos rendimientos (80% y 71%, respectivamente).

**DECIMOSEXTA.** La misma metodología sintética desarrollada para la obtención de (–)-oleaceína (**48**) y (–)-oleocantal (**49**) a partir de **52** y **53** (conclusión nº 13) se aplicó en la síntesis de sus derivados metilados (**58** y **59**) a partir de (–)-5',6'-*O*-dimetil-oleuropeína (**56**) y (–)-6'-*O*-metil-ligustrósido (**57**). En este caso fue necesario adicionar al medio acuoso de reacción una pequeña cantidad de DMSO para favorecer la reacción de descarboxilación de Krapcho, de tal modo que se obtuvieron (–)-3'',4''-*O*-dimetil-oleaceína (**58**) y (–)-4''-*O*-metil-oleocantal (**59**) con buenos rendimientos de reacción (64% en ambos casos), similares a los descritos para **48** y **49**. Ambos compuestos se han sintetizado por primera vez.

**DECIMOSÉPTIMA.** Teniendo en cuenta que se necesitaban del orden de 2 g de (–)-dimetil-oleaceína (**58**) y 2 g de (–)-metil-oleocantal (**59**) para el ensayo mencionado en la conclusión nº 14, se hizo necesario estudiar el cambio de escala de las síntesis de **58** y **59** previamente optimizadas. Tras las pruebas efectuadas, se consiguió hacer reaccionar cinco veces más de productos de partida, sin que se viera afectado el tiempo de reacción, cuyo óptimo pasó de 9 a 12 minutos, ni los rendimientos de

reacción (58% y 63%, respectivamente), que sólo fueron ligeramente inferiores a los observados a pequeña escala.

**DECIMOCTAVA.** Dentro de los intentos de obtención de un primer análogo estructural de oleocantal/oleaceína, de estructura simplificada, pero manteniendo los dos grupos aldehído en disposición relativa 1,5 (molécula objetivo **I**), se hizo reaccionar 4-metoxibenzaldehído y malonato de dietilo en medio básico de *terc*-butóxido de potasio, obteniéndose el compuesto de adición al aldehído de dos moléculas de malonato de dietilo (el tetraéster **62**), con un rendimiento del 93%. La reacción de descarboxilación de Krapcho del compuesto **62**, para obtener el diéster **63**, se ha ensayado por tres métodos diferentes, obteniéndose el mejor rendimiento en **63** (97%) cuando la reacción se hizo en medio acuoso a 180 °C en un reactor microondas durante 30 minutos. Por último, los intentos de conversión directa del diéster **63** en el dialdehído objetivo **I**, con DIBAL, no transcurrieron con éxito, como tampoco el tratamiento de **63** con  $\text{LiAlH}_4$ , siendo necesario dedicar más tiempo para encontrar las condiciones experimentales adecuadas para cumplir con este objetivo.

**DECIMONOVENA.** Los extractos y productos naturales obtenidos en esta Tesis a partir de seis fuentes vegetales (cerezo, ciruelo europeo, ciruelo japonés, lichi, arándano rojo americano y olivo), así como algunos de los compuestos obtenidos mediante síntesis, se han evaluado por su potencial actividad antioxidante, inhibidora de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA), antimicrobiana, antibiopelícula, antitumoral, antiinflamatoria y antiangiogénica. De los veinticinco extractos evaluados por su actividad antioxidante, tres de ellos (el extracto de arándano rojo americano y los extractos de las dos variedades de lichi) presentaron actividades superiores ( $\text{EC}_{50}$  de 4.8 a 7.4  $\mu\text{g/mL}$ ) a las del extracto de romero comercial ( $\text{EC}_{50} = 27.6 \mu\text{g/mL}$ ), y el extracto de ciruelo europeo 'De la Rosa' presentó una actividad muy similar ( $\text{EC}_{50} = 28.9 \mu\text{g/mL}$ ). El extracto de arándano también resultó ser el más activo como inhibidor de la enzima LDHA, con un valor de porcentaje de inhibición doble al valor obtenido para el compuesto de referencia, procianidina A-2 (79.1% y 37.5%, respectivamente). Por su parte, todas las proantocianidinas aisladas del extracto de ciruelo europeo (**21–26**) presentaron mayor actividad como inhibidores de la enzima ( $\text{EC}_{50}$  de 3.2 a

43.0  $\mu\text{M}$ ) que el compuesto de referencia ( $\text{EC}_{50} = 54.2 \mu\text{M}$ ). En cuanto a la actividad antimicrobiana y antibiopelícula, los mejores resultados se obtuvieron para el compuesto **17**, aislado de cerezo, por su capacidad, tanto de inhibir como de disgregar la biopelícula formada por la cepa multiresistente *Enterobacter* sp. UJA37p. Por último, los compuestos aislados del aceite de oliva, (-)-oleaceína (**48**) y (-)-oleocantal (**49**), impiden la formación de vasos sanguíneos por células endoteliales (actividad antiangiogénica), y **49**, además, posee actividad antitumoral en células cancerígenas de tejido hematopoyético y líneas celulares de cáncer de mama. Por otro lado, el compuesto **49**, junto con la forma monoaldehídica del aglicón de ligustrósido (**51**) y el compuesto sintético (-)-metil-oleocantal (**59**), han demostrado propiedades antiinflamatorias en ensayos con macrófagos peritoneales murinos.



# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Harvey, A. L. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13* (19–20), 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>.
- (2) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- (3) Zhang, Q. W.; Lin, L. G.; Ye, W. C. Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Med. (United Kingdom)* **2018**, *13* (1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
- (4) Brandão, P. F.; Duarte, A. C.; Duarte, R. M. B. O. Comprehensive Multidimensional Liquid Chromatography for Advancing Environmental and Natural Products Research. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *116*, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.016>.
- (5) Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; Orhan, I. E.; Banach, M.; Rollinger, J. M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.; Bauer, R.; Bayer, E. A.; Majeed, M.; Bishayee, A.; Bochkov, V.; Bonn, G. K.; Braid, N.; Bucar, F.; Cifuentes, A.; D'Onofrio, G.; Bodkin, M.; Diederich, M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Efferth, T.; El Bairi, K.; Arkells, N.; Fan, T. P.; Fiebich, B. L.; Freissmuth, M.; Georgiev, M. I.; Gibbons, S.; Godfrey, K. M.; Gruber, C. W.; Heer, J.; Huber, L. A.; Ibanez, E.; Kijjoo, A.; Kiss, A. K.; Lu, A.; Macias, F. A.; Miller, M. J. S.; Mocan, A.; Müller, R.; Nicoletti, F.; Perry, G.; Pittalà, V.; Rastrelli, L.; Ristow, M.; Russo, G. L.; Silva, A. S.; Schuster, D.; Sheridan, H.; Skalicka-Woźniak, K.; Skaltsounis, L.; Sobarzo-Sánchez, E.; Bredt, D. S.; Stuppner, H.; Sureda, A.; Tzvetkov, N. T.; Vacca, R. A.; Aggarwal, B. B.; Battino, M.; Giampieri, F.; Wink, M.; Wolfender, J. L.; Xiao, J.; Yeung, A. W. K.; Lizard, G.; Popp, M. A.; Heinrich, M.; Berindan-Neagoe, I.; Stadler, M.; Daglia, M.; Verpoorte, R.; Supuran, C. T. Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
- (6) Boufridi, A.; Quinn, R. J. Harnessing the Properties of Natural Products. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *58*, 451–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-105029>.
- (7) Gyawali, R.; Ibrahim, S. A. Natural Products as Antimicrobial Agents. *Food Control* **2014**, *46*, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>.
- (8) Campêlo, M. C. S.; Medeiros, J. M. S.; Silva, J. B. A. Natural Products in Food Preservation. *Int. Food Res. J.* **2019**, *26* (1), 41–46.
- (9) Castejón, M. L.; Montoya, T.; Alarcón-de-la-lastra, C.; Sánchez-hidalgo, M. Potential Protective Role Exerted by Secoiridoids from *Olea europaea* L. In Cancer, Cardiovascular, Neurodegenerative, Aging-Related, and Immunoinflammatory Diseases. *Antioxidants* **2020**, *9* (2). <https://doi.org/10.3390/antiox9020149>.
- (10) Lourenço, S. C.; Moldão-Martins, M.; Alves, V. D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules* **2019**, *24* (22), 14–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>.
- (11) Altemimi, A.; Lakhssassi, N.; Baharlouei, A.; Watson, D. G.; Lightfoot, D. A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants* **2017**, *6* (4). <https://doi.org/10.3390/plants6040042>.
- (12) Patra, J. K.; Das, G.; Lee, S.; Kang, S. S.; Shin, H. S. Selected Commercial Plants: A Review of Extraction and Isolation of Bioactive Compounds and Their Pharmacological Market Value. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *82* (September), 89–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.10.001>.
- (13) Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Manuel Domínguez, J.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Núñez, M. J.; Carlos Parajó, J. Natural Antioxidants from Residual Sources. *Food Chem.* **2001**, *72*

- (2), 145–171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5).
- (14) Shirahigue, L. D.; Ceccato-Antonini, S. R. Agro-Industrial Wastes as Sources of Bioactive Compounds for Food and Fermentation Industries. *Cienc. Rural* **2020**, *50* (4). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190857>.
- (15) Mirabella, N.; Castellani, V.; Sala, S. Current Options for the Valorization of Food Manufacturing Waste: A Review. *J. Clean. Prod.* **2014**, *65*, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>.
- (16) Sagar, N. A.; Pareek, S.; Sharma, S.; Yahia, E. M.; Lobo, M. G. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17* (3), 512–531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>.
- (17) Arun, K. B.; Madhavan, A.; Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A.; R, R.; Sirohi, R. Remodeling Agro-Industrial and Food Wastes into Value-Added Bioactives and Biopolymers. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *154* (January), 112621. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112621>.
- (18) Pérez-Bonilla, M.; Salido, S.; van Beek, T. A.; Linares-Palomino, P. J.; Altarejos, J.; Nogueras, M.; Sánchez, A. Isolation and Identification of Radical Scavengers in Olive Tree (*Olea europaea*) Wood. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112* (1–2), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.055>.
- (19) Pérez-Bonilla, M.; Salido, S.; van Beek, T. A.; Waard, P. de; Linares-Palomino, P. J.; Sánchez, A.; Altarejos, J. Isolation of Antioxidative Secoiridoids from Olive Wood (*Olea europaea* L.) Guided by on-Line HPLC-DAD-Radical Scavenging Detection. *Food Chem.* **2011**, *124* (1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.099>.
- (20) Pérez-Bonilla, M.; Salido, S.; Van Beek, T. A.; Altarejos, J. Radical-Scavenging Compounds from Olive Tree (*Olea europaea* L.) Wood. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (1), 144–151. <https://doi.org/10.1021/jf403998t>.
- (21) Salido, S.; Pérez-Bonilla, M.; Adams, R. P.; Altarejos, J. Phenolic Components and Antioxidant Activity of Wood Extracts from 10 Main Spanish Olive Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (29), 6493–6500. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02979>.
- (22) Altarejos, J.; Salido, S.; Pérez-Bonilla, M.; Linares-Palomino, P. J.; van Beek, T. A.; Nogueras, M.; Sánchez, A. Preliminary Assay on the Radical Scavenging Activity of Olive Wood Extracts. *Fitoterapia* **2005**, *76* (3–4), 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.02.002>.
- (23) Zbidi, H.; Salido, S.; Altarejos, J.; Perez-Bonilla, M.; Bartegi, A.; Rosado, J. A.; Salido, G. M. Olive Tree Wood Phenolic Compounds with Human Platelet Antiaggregant Properties. *Blood Cells, Mol. Dis.* **2009**, *42* (3), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.01.001>.
- (24) Perez-Bonilla, M.; Salido, S.; Sanchez, A.; van Beek, T. A.; Altarejos, J. Effect of Extraction Conditions on the Antioxidant Activity of Olive Wood Extracts. *Int. J. Food Sci.* **2013**, *719593/1-719593/13*, 14 pp. <https://doi.org/10.1155/2013/719593>.
- (25) Salim, V.; Yu, F.; Altarejos, J.; De Luca, V. Virus-Induced Gene Silencing Identifies Catharanthus Roseus 7-Deoxyloganic Acid-7-Hydroxylase, a Step in Iridoid and Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis. *Plant J.* **2013**, *76* (5), 754–765. <https://doi.org/10.1111/tpj.12330>.
- (26) Perez-Bonilla, M.; Salido, S.; Linares-Palomino, P. J.; Nogueras, M.; Sanchez, A.; Altarejos, J. Procedimiento de Extracción de Madera de Olivo y Extractos Enriquecidos En Productos de Interés Alimentario. ES2386860, 2011.

- (27) Amor, N. Ben; Bouaziz, A.; Romera-Castillo, C.; Salido, S.; Linares-Palomino, P. J.; Bartegi, A.; Salido, G. M.; Rosado, J. A. Characterization of the Intracellular Mechanisms Involved in the Antiaggregant Properties of Cinnamtannin B-1 from Bay Wood in Human Platelets. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (16), 3937–3944. <https://doi.org/10.1021/jm070508d>.
- (28) Bouaziz, A.; Salido, S.; Linares-Palomino, P. J.; Sanchez, A.; Altarejos, J.; Bartegi, A.; Salido, G. M.; Rosado, J. A. Cinnamtannin B-1 from Bay Wood Reduces Abnormal Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis and Platelet Hyperaggregability in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *457* (2), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.10.020>.
- (29) Bouaziz, A.; Romera-Castillo, C.; Salido, S.; Linares-Palomino, P. J.; Altarejos, J.; Bartegi, A.; Rosado, J. A.; Salido, G. M. Cinnamtannin B-1 from Bay Wood Exhibits Antiapoptotic Effects in Human Platelets. *Apoptosis* **2007**, *12* (3), 489–498. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0014-z>.
- (30) Alejo-Armijo, A.; Glibota, N.; Frías, M. P.; Altarejos, J.; Gálvez, A.; Ortega-Morente, E.; Salido, S. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Procyanidins Extracted from Laurel Wood against a Selection of Foodborne Microorganisms. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52* (3), 679–686. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13321>.
- (31) Alejo-Armijo, A.; Tello-Abolafia, A.; Salido, S.; Altarejos, J. Phenolic Compounds in Laurel Wood: A New Source of Proanthocyanidins. *J. Wood Chem. Technol.* **2019**, *39* (6), 436–453. <https://doi.org/10.1080/02773813.2019.1636825>.
- (32) Alejo-Armijo, A.; Altarejos, J.; Salido, S. Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus Nobilis*). *Nat. Prod. Commun.* **2017**, *12* (5), 743–757. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200519>.
- (33) Alejo-Armijo, A.; Ortega-Vidal, J.; Salido, S.; Altarejos, J. Recovery and Seasonal Variation of Cinnamtannin B-1 from Laurel (*Laurus Nobilis* L.) Pruning Wood Wastes. (*Enviado a J. Sci. Food Agric.* **2021**).
- (34) Poonam, V.; Raunak, Kumar, G.; Reddy L., C. S.; Jain, R.; Sharma, S. K.; Prasad, A. K.; Parmar, V. S. Chemical Constituents of the Genus *Prunus* and Their Medicinal Properties. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (25), 3758–3824. <https://doi.org/10.2174/092986711803414386>.
- (35) Ibrahim, S. R. M.; Mohamed, G. A. Litchi Chinensis: Medicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *174*, 492–513. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.054>.
- (36) Blumberg, J. B.; Camesano, T. A.; Cassidy, A.; Kris-Etherton, P.; Howell, A.; Manach, C.; Ostertag, L. M.; Sies, H.; Skulas-Ray, A.; Vita, J. A. Cranberries and Their Bioactive Constituents in Human Health. *Adv. Nutr.* **2013**, *4* (6), 618–632. <https://doi.org/10.3945/an.113.004473>.
- (37) Bojczuk, M.; Żyżelewicz, D.; Hodurek, P. Centrifugal Partition Chromatography – A Review of Recent Applications and Some Classic References. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40* (7), 1597–1609. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601221>.
- (38) Murayama, W.; Kobayashi, T.; Kosuge, Y.; Yano, H.; Nunogaki, Y.; Nunogaki, K. A New Centrifugal Counter-Current Chromatograph and Its Application. *J. Chromatogr. A* **1982**, *239* (C), 643–649. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)82022-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)82022-1).
- (39) Ghante, M. H.; Jamkhande, P. G. Role of Pentacyclic Triterpenoids in Chemoprevention and Anticancer Treatment: An Overview on Targets and Underling Mechanisms. *J. Pharmacopuncture* **2019**, *22* (2), 55–67. <https://doi.org/10.3831/KPI.201.22.007>.



- (40) Furtado, N. A. J. C.; Pirson, L.; Edelberg, H.; Miranda, L. M.; Loira-Pastoriza, C.; Preat, V.; Larondelle, Y.; André, C. M. Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of in Vitro and in Vivo Studies. *Molecules* **2017**, *22* (3), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules22030400>.
- (41) Appeldoorn, M. M.; Sanders, M.; Vincken, J. P.; Cheynier, V.; Le Guernevé, C.; Hollman, P. C. H.; Gruppen, H. Efficient Isolation of Major Procyanidin A-Type Dimers from Peanut Skins and B-Type Dimers from Grape Seeds. *Food Chem.* **2009**, *117* (4), 713–720. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.047>.
- (42) Ravishankar, D.; Rajora, A. K.; Greco, F.; Osborn, H. M. I. Flavonoids as Prospective Compounds for Anti-Cancer Therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45* (12), 2821–2831. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004>.
- (43) Prior, R. L.; Gu, L. Occurrence and Biological Significance of Proanthocyanidins in the American Diet. *Phytochemistry* **2005**, *66* (18 SPEC. ISS.), 2264–2280. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.025>.
- (44) Lotha, R.; Sivasubramanian, A. Flavonoids Nutraceuticals in Prevention and Treatment of Cancer: A Review. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2018**, *11* (1), 42–47. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i1.23410>.
- (45) García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Rostagno, M. A.; Martínez, J. A. Flavonoids as Anti-Inflammatory Agents: Implications in Cancer and Cardiovascular Disease. *Inflamm. Res.* **2009**, *58* (9), 537–552. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0037-3>.
- (46) Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38* (2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>.
- (47) Kawai, M.; Hirano, T.; Higa, S.; Arimitsu, J.; Maruta, M.; Kuwahara, Y.; Ohkawara, T.; Hagihara, K.; Yamadori, T.; Shima, Y.; Ogata, A.; Kawase, I.; Tanaka, T. Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances. *Allergol. Int.* **2007**, *56* (2), 113–123. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-06-135>.
- (48) Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H. Comparative Analysis of the Effects of Flavonoids on Proliferation, Cytotoxicity, and Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines. *Eur. J. Nutr.* **1999**, *38* (3), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s003940050054>.
- (49) Beutler, J. A.; Hamel, E.; Vlietinck, A. J.; Haemers, A.; Rajan, P.; Roitman, J. N.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R. Structure-Activity Requirements for Flavone Cytotoxicity and Binding to Tubulin. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (13), 2333–2338. <https://doi.org/10.1021/jm970842h>.
- (50) Mirossay, L.; Varinská, L.; Mojžiš, J. Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010027>.
- (51) Abotaleb, M.; Samuel, S. M.; Varghese, E.; Varghese, S.; Kubatka, P.; Liskova, A.; Büsselberg, D. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11* (1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>.
- (52) Bladé, C.; Aragonès, G.; Arola-Arnal, A.; Muguerza, B.; Bravo, F. I.; Salvadó, M. J.; Arola, L.; Suárez, M. Proanthocyanidins in Health and Disease. *BioFactors* **2016**, *42* (1), 5–12. <https://doi.org/10.1002/biof.1249>.
- (53) Rauf, A.; Imran, M.; Abu-Izneid, T.; Iahtisham-Ul-Haq; Patel, S.; Pan, X.; Naz, S.; Sanches Silva, A.; Saeed, F.; Rasul Suleria, H. A. Proanthocyanidins: A Comprehensive Review. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *116* (May). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108999>.
- (54) Fine, A. M. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: Applications Oligomeric

- Proanthocyanidins. *Altern. Med. Rev.* **2000**, 5 (2), 144–151.
- (55) Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, 37 (9–10), 937–942. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00079-4).
- (56) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79 (5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- (57) Guven, H.; Arici, A.; Simsek, O. Flavonoids in Our Foods: A Short Review. *J. Basic Clin. Heal. Sci.* **2019**, No. January. <https://doi.org/10.30621/jbachs.2019.555>.
- (58) Proestos, C.; Varzakas, T. Aromatic Plants: Antioxidant Capacity and Polyphenol Characterisation. *Foods* **2017**, 6 (4), 28. <https://doi.org/10.3390/foods6040028>.
- (59) Chandrasekara, A.; Shahidi, F. Herbal Beverages: Bioactive Compounds and Their Role in Disease Risk Reduction - A Review. *J. Tradit. Complement. Med.* **2018**, 8 (4), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006>.
- (60) Mathivha, P. L.; Msagati, T. A. M.; Thibane, V. S.; Mudau, F. N. Phytochemical Analysis of Herbal Teas and Their Potential Health, and Food Safety Benefits: A Review. In *Herbal Medicine in India: Indigenous Knowledge, Practice, Innovation and its Value*; Springer Singapore, 2019; pp 281–301. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7248-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7248-3_20).
- (61) Rzeppa, S.; Von Bargen, C.; Bittner, K.; Humpf, H. U. Analysis of Flavan-3-Ols and Procyanidins in Food Samples by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (RP-HPLC-ESI-MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (19), 10594–10603. <https://doi.org/10.1021/jf202697j>.
- (62) Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Mlcek, J.; Jurikova, T.; Sochor, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16 (10), 24673–24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>.
- (63) Bittner, K.; Rzeppa, S.; Humpf, H. U. Distribution and Quantification of Flavan-3-Ols and Procyanidins with Low Degree of Polymerization in Nuts, Cereals, and Legumes. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (38), 9148–9154. <https://doi.org/10.1021/jf4024728>.
- (64) Kammerer, D. R.; Kammerer, J.; Valet, R.; Carle, R. Recovery of Polyphenols from the By-Products of Plant Food Processing and Application as Valuable Food Ingredients. *Food Res. Int.* **2014**, 65 (PA), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.012>.
- (65) Yang, X.; Kang, S. M.; Jeon, B. T.; Kim, Y. D.; Ha, J. H.; Kim, Y. T.; Jeon, Y. J. Isolation and Identification of an Antioxidant Flavonoid Compound from Citrus-Processing by-Product. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, 91 (10), 1925–1927. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4402>.
- (66) Ben-Othman, S.; Jõudu, I.; Bhat, R. Bioactives from Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules* **2020**, 25 (3), 1–34. <https://doi.org/10.3390/molecules25030510>.
- (67) Acquadro, S.; Appleton, S.; Marengo, A.; Bicchi, C.; Sgorbini, B.; Mandrone, M.; Gai, F.; Peiretti, P. G.; Cagliero, C.; Rubiolo, P. Grapevine Green Pruning Residues as a Promising and Sustainable Source of Bioactive Phenolic Compounds. *Molecules* **2020**, 25 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030464>.
- (68) Henriques, J.; Ribeiro, M. J.; Falé, P. L.; Pacheco, R.; Ascensão, L.; Florêncio, M. H.; Serralheiro, M. L. M. Valorization of Kiwifruit Production: Leaves of the Pruning Branches of *Actinidia Deliciosa* as a Promising Source of Polyphenols. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, 243 (8), 1343–1353. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2845-y>.

- (69) Izco, J.; Barreno, E.; Brugués, M.; Costa, M.; Devesa, J. .; Fernández-González, F.; Gallardo, T.; Llimona, X.; Prada, C.; Talavera, S.; Valdés, B. *Botánica*; McGraw-Hill. Interamericana: Madrid, 2004.
- (70) Poonam, V.; Raunak; Kumar, G.; S. Reddy L., C.; Jain, R.; K. Sharma, S.; K. Prasad, A.; S. Parmar, V. Chemical Constituents of the Genus *Prunus* and Their Medicinal Properties. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (25), 3758–3824. <https://doi.org/10.2174/092986711803414386>.
- (71) Blanca, G.; Díez de la Guardia-Guerrero, C. Flora Vascular de Andalucía Oriental. Tomo 3. In *Flora Vascular de Andalucía Oriental. Tomo 3*; Blanca, G., Cabezudo, B., Cueto, M., Fernández-López, C., Morales-Torres, C., Eds.; Sevilla, 2009; p 44.
- (72) Ferretti, G.; Bacchetti, T.; Belleggia, A.; Neri, D. Cherry Antioxidants: From Farm to Table. *Molecules* **2010**, *15* (10), 6993–7005. <https://doi.org/10.3390/molecules15106993>.
- (73) Santos-Lema, W. . Forzado de La Producción de Ciruelo (*Prunus salicina* L.). Trabajo Teórico-Práctico Previo a La Obtención Del Título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Católica de Cuenca, 2007.
- (74) Tutin, T. . *Flora Europea, Volumen 2*; University Press: Cambridge, 1968.
- (75) Blanca-López, G.; Díaz de la Guardia-Guerrero, C. Amygdaloideae. In *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*; Castroviejo, C., Ed.; Real Jardín Botánico, CSIC: Madrid, 1997; pp 444–466.
- (76) Faostat. Dirección de estadística <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. (accessed Sep 24, 2020).
- (77) ESYRCE. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. *Encuesta Sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos*; 2019.
- (78) McCune, L. M.; Kubota, C.; Stendell-Hollis, N. R.; Thomson, C. A. Cherries and Health: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408390903001719>.
- (79) Kelley, D. S.; Adkins, Y.; Laugero, K. D. A Review of the Health Benefits of Cherries. *Nutrients* **2018**, *10* (3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/nu10030368>.
- (80) Noratto, G.; Layosa, M. A.; Lage, N. N.; Atienza, L.; Ivanov, I.; Mertens-Talcott, S. U.; Chew, B. P. Antitumor Potential of Dark Sweet Cherry Sweet (*Prunus avium*) Phenolics in Suppressing Xenograft Tumor Growth of MDA-MB-453 Breast Cancer Cells. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *84*, 108437. <https://doi.org/10.1016/j.jnubio.2020.108437>.
- (81) Garrido, M.; Rodríguez, A. .; Barriga, C.; Paredes, S. . Cherry-Enriched Diets Improve Sleep from Young to Elderly Populations. In *Handbook of nutrition, diet and sleep. Human Health Handbooks*; Preedy, V. ., Patel, V. ., Le, L. ., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, 2013; pp 427–439.
- (82) Garrido, M.; Espino, J.; González-Gómez, D.; Lozano, M.; Barriga, C.; Paredes, S. D.; Rodríguez, A. B. The Consumption of a Jerte Valley Cherry Product in Humans Enhances Mood, and Increases 5-Hydroxyindoleacetic Acid but Reduces Cortisol Levels in Urine. *Exp. Gerontol.* **2012**, *47* (8), 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.05.003>.
- (83) Blanca-López, G.; Díaz de la Guardia-Guerrero, C. Amygdaloideae. In *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*; Castroviejo, C., Ed.; Real Jardín Botánico, CSIC: Madrid, 1997; pp 444–466.
- (84) Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Different Woods

- Used in Cooperage. *Food Chem.* **2011**, 129 (4), 1584–1590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.013>.
- (85) Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, Á. M.; Fernández De Simón, B.; Hernández, T.; Estrella, I. Phenolic Compounds in Cherry (*Prunus avium*) Heartwood with a View to Their Use in Cooperage. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58 (8), 4907–4914. <https://doi.org/10.1021/jf100236v>.
- (86) Kayano, S. I.; Kikuzaki, H.; Yamada, N. F.; Aoki, A.; Kasamatsu, K.; Yamasaki, Y.; Ikami, T.; Suzuki, T.; Mitani, T.; Nakatani, N. Antioxidant Properties of Prunes (*Prunus domestica* L.) and Their Constituents. *BioFactors* **2004**, 21 (1–4), 309–313. <https://doi.org/10.1002/biof.552210160>.
- (87) Wallace, T. C. Dried Plums, Prunes and Bone Health: A Comprehensive Review. *Nutrients* **2017**, 9 (4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu9040401>.
- (88) Igwe, E. O.; Charlton, K. E. A Systematic Review on the Health Effects of Plums (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*). *Phyther. Res.* **2016**, 30 (5), 701–731. <https://doi.org/10.1002/ptr.5581>.
- (89) Jarvis, N.; O'Bryan, C. A.; Ricke, S. C.; Crandall, P. G. The Functionality of Plum Ingredients in Meat Products: A Review. *Meat Sci.* **2015**, 102, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.12.002>.
- (90) Kosar, S.; Mahmood, A.; Ifzal, R.; Malik, A.; Baloch, F. Prudomestisides A and B, New Flavonoidal Glucosides from *Prunus domestica* and Their Antioxidant Activity. *J. Chem. Soc. Pakistan* **2013**, 35 (1), 169–174.
- (91) Sun, S. Y.; Jiang, W. G.; Zhao, Y. P. Characterization of the Aroma-Active Compounds in Five Sweet Cherry Cultivars Grown in Yantai (China). *Flavour Fragr. J.* **2010**, 25 (4), 206–213. <https://doi.org/10.1002/ffj.1994>.
- (92) Wen, Y. Q.; He, F.; Zhu, B. Q.; Lan, Y. Bin; Pan, Q. H.; Li, C. Y.; Reeves, M. J.; Wang, J. Free and Glycosidically Bound Aroma Compounds in Cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **2014**, 152, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.092>.
- (93) Vavoura, M. V.; Badeka, A. V.; Kontakos, S.; Kontominas, M. G. Characterization of Four Popular Sweet Cherry Cultivars Grown in Greece by Volatile Compound and Physicochemical Data Analysis and Sensory Evaluation. *Molecules* **2015**, 20 (2), 1922–1940. <https://doi.org/10.3390/molecules20021922>.
- (94) Legua, P.; Domenech, A.; Martínez, J. J.; Sánchez-Rodríguez, L.; Hernández, F.; Carbonell-Barrachina, A. A.; Melgarejo, P. Bioactive and Volatile Compounds in Sweet Cherry Cultivars. *J. Food Nutr. Res.* **2017**, 5 (11), 844–851. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-11-8>.
- (95) Papapetros, S.; Louppis, A.; Kosma, I.; Kontakos, S.; Badeka, A.; Papastefanou, C.; Kontominas, M. G. Physicochemical, Spectroscopic and Chromatographic Analyses in Combination with Chemometrics for the Discrimination of Four Sweet Cherry Cultivars Grown in Northern Greece. *Foods* **2019**, 8 (10). <https://doi.org/10.3390/foods8100442>.
- (96) Krammer, G.; Winterhalter, P.; Schwab, M.; Schreier, P. Glycosidically Bound Aroma Compounds in the Fruits of *Prunus* Species: Apricot (p. *Armeniaca*, l.), Peach (p. *Persica*, l.), Yellow Plum (p. *Domestica*, l. Ssp. *Syriaca*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39 (4), 778–781. <https://doi.org/10.1021/jf00004a032>.
- (97) Horvat, R. J.; Chapman, G. W.; Senter, S. D.; Norton, J. D.; Okie, W. R.; Robertson, J. A. Comparison of the Volatile Compounds from Several Commercial Plum Cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 60 (1), 21–23. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600105>.

- (98) Pino, J. A.; Quijano, C. E. Study of the Volatile Compounds from Plum (*Prunus domestica* L. Cv. Horvin) and Estimation of Their Contribution to the Fruit Aroma. *Food Sci. Technol.* **2012**, 32 (1), 76–83. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000006>.
- (99) Gómez, E.; Ledbetter, C. A.; Hartsell, P. L. Volatile Compounds in Apricot, Plum, and Their Interspecific Hybrids. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41 (10), 1669–1676. <https://doi.org/10.1021/jf00034a029>.
- (100) Taiti, C.; Pandolfi, C.; Caparrotta, S.; Dei, M.; Giordani, E.; Mancuso, S.; Nencetti, V. Fruit Aroma and Sensorial Characteristics of Traditional and Innovative Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Cultivars Grown in Italy. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, 245 (12), 2655–2668. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03377-y>.
- (101) Cuevas, F. J.; Moreno-Rojas, J. M.; Arroyo, F.; Daza, A.; Ruiz-Moreno, M. J. Effect of Management (Organic vs Conventional) on Volatile Profiles of Six Plum Cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). A Chemometric Approach for Varietal Classification and Determination of Potential Markers. *Food Chem.* **2016**, 199, 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.049>.
- (102) Rapparini, F.; Baraldi, R.; Facini, O. Seasonal Variation of Monoterpene Emission from *Malus Domestica* and *Prunus avium*. *Phytochemistry* **2001**, 57 (5), 681–687. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00124-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00124-8).
- (103) El-Sayed, A. M.; Sporle, A.; Colhoun, K.; Furlong, J.; White, R.; Suckling, D. M. Scents in Orchards: Floral Volatiles of Four Stone Fruit Crops and Their Attractiveness to Pollinators. *Chemoecology* **2018**, 28 (2), 39–49. <https://doi.org/10.1007/s00049-018-0254-8>.
- (104) Kiralan, M.; Kayahan, M.; Kiralan, S. S.; Ramadan, M. F. Effect of Thermal and Photo Oxidation on the Stability of Cold-Pressed Plum and Apricot Kernel Oils. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, 244 (1), 31–42. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2932-0>.
- (105) Lenchyk, L. V. Determination of Content of Flavonoids, Hydroxycinnamic Acids and Volatile Compounds in Plum Leaves. *Int. J. Adv. PHARMACY, Biol. Chem.* **2016**, 5 (2), 131–136.
- (106) Taiti, C.; Costa, C.; Guidi Nissim, W.; Bibbiani, S.; Azzarello, E.; Masi, E.; Pandolfi, C.; Pallottino, F.; Menesatti, P.; Mancuso, S. Assessing VOC Emission by Different Wood Cores Using the PTR-ToF-MS Technology. *Wood Sci. Technol.* **2017**, 51 (2), 273–295. <https://doi.org/10.1007/s00226-016-0866-5>.
- (107) Alarcón, M.; Díaz-Maroto, M. C.; Pérez-Coello, M. S.; Alañón, M. E. Isolation of Natural Flavoring Compounds from Cooperage Woods by Pressurized Hot Water Extraction (PHWE). *Holzforschung* **2019**, 73 (3), 295–303. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0112>.
- (108) Culleré, L.; Fernández de Simón, B.; Cadahía, E.; Ferreira, V.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J. Characterization by Gas Chromatography-Olfactometry of the Most Odor-Active Compounds in Extracts Prepared from Acacia, Chestnut, Cherry, Ash and Oak Woods. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, 53 (1), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.010>.
- (109) De Rosso, M.; Cancian, D.; Panighel, A.; Dalla Vedova, A.; Flamini, R. Chemical Compounds Released from Five Different Woods Used to Make Barrels for Aging Wines and Spirits: Volatile Compounds and Polyphenols. *Wood Sci. Technol.* **2009**, 43 (5–6), 375–385. <https://doi.org/10.1007/s00226-008-0211-8>.
- (110) Aires, A.; Dias, C.; Carvalho, R.; Saavedra, M. J. Analysis of Glycosylated Flavonoids Extracted from Sweet-Cherry Stems, as Antibacterial Agents against Pathogenic *Escherichia Coli* Isolates. *Acta Biochim. Pol.* **2017**, 64 (2), 265–271.

[https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1374](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1374).

- (111) Hasegawa, M. Flavonoids of Various *Prunus* Species. VI. The Flavonoids in the Wood of *Prunus Aequinoctialis*, *P. Nipponica*, *P. Maximowiczii* and *P. Avium*. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79 (7), 1738–1740. <https://doi.org/10.1021/ja01564a056>.
- (112) Khalid, S. A.; Gellért, M.; Szendrei, K.; Duddeck, H. Prunetin 5-O- $\beta$ -d-Glucopyranoside, an Isoflavone from the Peduncle of *Prunus avium* and *P. Cerasus*. *Phytochemistry* **1989**, 28 (5), 1560–1561. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97795-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97795-1).
- (113) Vinciguerra, V.; Luna, M.; Bistoni, A.; Zollo, F. Variation in the Composition of the Heartwood Flavonoids of *Prunus avium* by On-Column Capillary Gas Chromatography. *Phytochem. Anal.* **2003**, 14 (6), 371–377. <https://doi.org/10.1002/pca.730>.
- (114) Chopin, J.; Pacheco, H. Isolation and determination of the structure of a new hydroxyflavanone from the cherry-tree heartwood (*Prunus avium*). *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **1958**, 40 (11), 1593–1601.
- (115) Mentzer, C.; Pacheco, H.; Ville, A. Indeterminate chemistry of wood extracts. IV. New flavone derivatives from the heart of the wild cherry tree (*Prunus avium*). *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **1954**, 36 (8), 1137–1150.
- (116) Répási, J.; Frank, L. Analytic and biological standardization of *Prunus avium* extracts. *Acta Pharm. Hung.* **1992**, 62 (4), 172–181.
- (117) Nagarajan, G. R.; Parmar, V. S. Chemical Examination of the Heartwood of *Prunus domestica*. *Planta Med.* **1977**, 31, 146–150.
- (118) Gellert, M. Szendrei, K. Dinya, Z. Repasi, J. Characteristic Constituents of the Cherry Peduncle Extract Novicardin: HPLC Fingerprint. *Stud. Org. Chem.* **1986**, 23, 279–286.
- (119) E. Wollenweber, P. Lebreton, M. C. Flavonoids in Budexcretions of *Prunus* and *Rhamnus* Species. *Naturforsch. B* **1972**, 27, 567–570.
- (120) McNulty, J.; Nair, J. J.; Bollareddy, E.; Keskar, K.; Thorat, A.; Crankshaw, D. J.; Holloway, A. C.; Khan, G.; Wright, G. D.; Ejim, L. Isolation of Flavonoids from the Heartwood and Resin of *Prunus avium* and Some Preliminary Biological Investigations. *Phytochemistry* **2009**, 70 (17–18), 2040–2046. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.018>.
- (121) Yu, K. S.; R. F. Carlson. Paper Chromatographic Determination of Phenolic Compounds Occurring in the Leaf, Stem Bark and Root Bark of *Prunus avium* and *P. Mahaleb*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1975**, 100, 536–541.
- (122) Chopin, J.; Darius, M.; Pacheco, H.; Mentzer, C. The Structure of a New Flavone Derivative Isolated from the Heartwood of Wild Cherry (*Prunus avium*). *Compt. rend.* **1956**, 243, 712–714.
- (123) Treutter, D.; Galensa, R.; Feucht, W.; Schmid, P. P. S. Flavanone Glucosides in Callus and Phloem of *Prunus avium*: Identification and Stimulation of Their Synthesis. *Physiol. Plant.* **1985**, 65 (1), 95–101. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb02366.x>.
- (124) Chopin, J.; Molho, D.; Pacheco, H.; Mentzer, C.; Grenier, G. Structure of a New Flavone Derivative Isolated from Cherry Wood (*Prunus avium*). *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1957**, 192–220.
- (125) Chinnici, F.; Natali, N.; Bellachioma, A.; Versari, A.; Riponi, C. Changes in Phenolic Composition of Red Wines Aged in Cherry Wood. *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, 60 (2), 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.029>.
- (126) Kim, S. N.; Kim, M. R.; Cho, S. M.; Kim, S. Y.; Kim, J. B.; Cho, Y. S. Antioxidant Activities and

- Determination of Phenolic Compounds Isolated from Oriental Plums (Soldam, Oishiwase and Formosa). *Nutr. Res. Pract.* **2012**, 6 (4), 277–285. <https://doi.org/10.4162/nrp.2012.6.4.277>.
- (127) Parmar, V. S.; Vardhan, A.; Nagarajan, G. R.; Jain, R. Dihydroflavonols from *Prunus domestica*. *Phytochemistry* **1992**, 31 (6), 2185–2186.
- (128) Tohno, H.; Horii, C.; Fuse, T.; Okonogi, A.; Yomoda, S. Evaluation of Estrogen Receptor  $\beta$  Binding of Pruni Cortex and Its Constituents. *Yakugaku Zasshi* **2010**, 130 (7), 989–997. <https://doi.org/10.1248/yakushi.130.989>.
- (129) Henning, W.; Herrmann, K. Flavonol Glycosides of Plums of the Species *Prunus domestica* L. and *Prunus salicina* Lindley. 12. Phenolic Contents of Fruits. *Zeitschrift fuer Leb. und -forsch.* **1980**, 171 (2), 111–118. <https://doi.org/10.1007/BF01140750>.
- (130) Williams, B. L.; Wender, S. H. Isolation and Identification of Quercitin and Some Quercitin Glycosides from Plums (*Prunus salicina*). *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 4363–4364. <https://doi.org/10.1021/ja01113a529>.
- (131) Nagarajan, G. R.; Seshadri, T. R. Flavonoid Components of the Heartwood of *Prunus domestica*. *Phytochem.* **1964**, 3 (4), 477–484. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88024-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88024-3).
- (132) Nagarajan, G. R.; Seshadri, T. R. Minor Flavonoid Components of the Heartwood of *Prunus domestica*. *Curr. Sci.* **1966**, 35 (16), 409–410.
- (133) Geibel, M.; Gross, D. C.; Mo, Y.-Y.; Bonsall, R. F.; Geiger, H. Identification of Flavonol Glycosides from *Prunus avium* Leaves Which Induce the Production of Syringomycin by *Pseudomonas Syringae* Pv. *Syringae*. *Acta Hort.* **1994**, 381 (International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, Vol. 2), 662–666. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.381.93>.
- (134) Henning, W.; Herrmann, K. Flavonol Tetraglycosides from the Leaves of *Prunus Cerasus* and *P. Avium*. *Phytochem.* **1980**, 19 (12), 2727–2729. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83951-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83951-5).
- (135) Nunes, C.; Guyot, S.; Marnet, N.; Barros, A. S.; Saraiva, J. A.; Renard, C. M. G. C.; Coimbra, M. A. Characterization of Plum Procyanidins by Thiolytic Depolymerization. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (13), 5188–5196. <https://doi.org/10.1021/jf8006135>.
- (136) Slimestad, R.; Vangdal, E.; Brede, C. Analysis of Phenolic Compounds in Six Norwegian Plum Cultivars (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (23), 11370–11375. <https://doi.org/10.1021/jf902054x>.
- (137) Tomás-Barberán, F. A.; Gil, M. I.; Cremin, P.; Waterhouse, A. L.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. A. HPLC - DAD - ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (10), 4748–4760. <https://doi.org/10.1021/jf0104681>.
- (138) Lebreton, P.; Wollenweber, E.; Southwick, L.; Mabry, T. J. 3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-Methoxyflavone, or 6-Methoxykaempferol, a New Natural Product Extracted from *Prunus avium* Var Juliana. *Comptes Rendus des Seances l'Academie des Sci. Ser. C Sci. Chim.* **1971**, 272 (17), 1529–1532.
- (139) Cronenberger, L. The Isolation of Rutoside from the Leaves of Wild Cherry (*Prunus avium*) and the Presence of This Flavonic Heteroside in Leaves of Apricot (*Prunus Armeniaca*), Plum (*Prunus domestica*), and Wild Plum (*Prunus Spinosa*). *Compt.rend.* **1959**, 249, 2423–2424.
- (140) Kelebek, H.; Selli, S. Evaluation of Chemical Constituents and Antioxidant Activity of

- Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, 46 (12), 2530–2537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02777.x>.
- (141) Pacheco, H.; Cronenberger, L.; Mentzer, C. Flavone Compounds of Extracts of Wood. V. Water-Soluble Substances of Heartwood of *Prunus avium*. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **1957**, 39, 439–444.
- (142) Pacheco, H. The Presence of Heterosides of Flavanonols in the Sap Wood of Species of *Prunus*. *Compt. rend.* **1959**, 248, 2636–2637.
- (143) Kosar, S.; Fatima, I.; Mahmood, A.; Ahmed, R.; Malik, A.; Talib, S.; Chouhdary, M. I. Purunusides A-C,  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Homoisoflavone Glucosides from *Prunus domestica*. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, 32 (12), 1705–1710. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-2207-9>.
- (144) Hillis, W. E.; Swain, T. Phenolic Constituents of *Prunus domestica*. III. Identification of the Major Constituents in the Tissues of Victoria Plum. *J. Sci. Food Agric.* **1959**, 10, 533–537. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740101006>.
- (145) Chaovanalikit, A.; Wrolstad, R. E. Anthocyanin and Polyphenolic Composition of Fresh and Processed Cherries. *J. Food Sci.* **2003**, 69 (1), FCT73–FCT83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17859.x>.
- (146) Mubarak, A.; Swinny, E. E.; Ching, S. Y. L.; Jacob, S. R.; Lacey, K.; Hodgson, J. M.; Croft, K. D.; Considine, M. J. Polyphenol Composition of Plum Selections in Relation to Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (41), 10256–10262. <https://doi.org/10.1021/jf302903k>.
- (147) Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L. Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (25), 7513–7521. <https://doi.org/10.1021/jf034815d>.
- (148) Li, K. C.; Wagenknecht, A. C. The Anthocyanin Pigments of Sour Cherries. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 979–980. <https://doi.org/10.1021/ja01586a029>.
- (149) Takeda, K.; Sano, S. Anthocyanins in the Purple-Black Fruits of *Prunus Jamasakura* Sieb. *Tokyo Gakuhei Daigaku Kiyo, Dai-4-bumon: Sugaku, Shizen Kagaku* **1978**, 30, 251–254.
- (150) Čechovská, L.; Cejpek, K.; Konečný, M.; Velíšek, J. On the Role of 2,3-Dihydro-3,5-Dihydroxy-6-Methyl-(4H)-Pyran-4-One in Antioxidant Capacity of Prunes. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, 233 (3), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1527-4>.
- (151) Usenik, V.; Štampar, F.; Veberič, R. Anthocyanins and Fruit Colour in Plums (*Prunus domestica* L.) during Ripening. *Food Chem.* **2009**, 114 (2), 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.083>.
- (152) Tsuji, M.; Harakawa, M.; Komiyama, Y. Main Anthocyanin Pigments in Plum Fruit (*Prunus salicina*) Variety “Sordum”. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **1981**, 28 (10), 517–521.
- (153) Ito, S.; Matsuo, T.; Noguchi, K.; Kodama, K. The Qualities of Subtropical Fruits. III. Anthocyanin Pigment of Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Cv. Karari. *Kagoshima Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku* **1982**, No. 32, 35–42.
- (154) Crupi, P.; Genghi, R.; Antonacci, D. In-Time and in-Space Tandem Mass Spectrometry to Determine the Metabolic Profiling of Flavonoids in a Typical Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivar from Southern Italy. *J. Mass Spectrom.* **2014**, 49 (10), 1025–1034. <https://doi.org/10.1002/jms.3423>.
- (155) González-Gómez, D.; Lozano, M.; Fernández-León, M. F.; Bernalte, M. J.; Ayuso, M. C.;



- Rodríguez, A. B. Sweet Cherry Phytochemicals: Identification and Characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in Six Sweet-Cherry Cultivars Grown in Valle Del Jerte (Spain). *J. Food Compos. Anal.* **2010**, 23 (6), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.02.008>.
- (156) Draetta, I. S.; Iaderoza, M.; Baldini, V. L. S.; Francis, F. J. Anthocyanins from Plums (*Prunus salicina* L.). *Cienc. e Tecnol. Aliment. (Campinas, Brazil)* **1985**, 5 (1), 31–38.
- (157) Jaiswal, R.; Karako, H.; Ru, S.; Goldner, K.; Neumu, M.; Treutter, D.; Kuhnert, N. Identification of Phenolic Compounds in Plum Fruits (*Prunus*). *Am. Chem. Soc.* **2013**, 61 (10), 1220–1231.
- (158) Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Zhang, Z.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L. Liquid Chromatographic/Electrospray Ionization Mass Spectrometric Studies of Proanthocyanidins in Foods. *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38 (12), 1272–1280. <https://doi.org/10.1002/jms.541>.
- (159) Ahmed, R.; Mahmood, A.; Rashid, F.; Ahmad, Z.; Nadir, M.; Naseer, Z.; Kosar, S. Chemical Constituents of Seed (Kernel) of *Prunus domestica* and Their Insecticidal and Antifungal Activities. *J. Saudi Chem. Soc.* **2007**, 11 (1), 121–129.
- (160) Kayano, S. I.; Kikuzaki, H.; Fukutsuka, N.; Mitani, T.; Nakatani, N. Antioxidant Activity of Prune (*Prunus domestica* L.) Constituents and a New Synergist. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (13), 3708–3712. <https://doi.org/10.1021/jf0200164>.
- (161) Kayano, S.; Kikuzaki, H.; Ikami, T.; Suzuki, T.; Mitani, T.; Nakatani, N. A New Bipyrrole and Some Phenolic Constituents in Prunes (*Prunus domestica* L.) and Their Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68 (4), 942–944. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.942>.
- (162) Brieskorn, C. H.; Betz, R. Procyanidin Polymers Crucial to the Structure of the Almond Seedcoat. *Zeitschrift fuer Leb. und -forsch.* **1988**, 187 (4), 347–353.
- (163) Nakatani, N.; Kayano, S. I.; Kikuzaki, H.; Sumino, K.; Katagiri, K.; Mitani, T. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (11), 5512–5516. <https://doi.org/10.1021/jf000422s>.
- (164) Kayano, S.; Kikuzaki, H.; Mitani, T.; Nakatani, N. Conformational Isomers of 3-O-Caffeoylquinic Acid Isolated from Prunes (*Prunus domestica* L.) and Their Antioxidant Activity. *ITE Lett. Batter. New Technol. Med.* **2003**, 4 (4), 478–484.
- (165) Jaiswal, R.; Karaköse, H.; Rühmann, S.; Goldner, K.; Neumüller, M.; Treutter, D.; Kuhnert, N. Identification of Phenolic Compounds in Plum Fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Characterization of Varieties by Quantitative Phenolic Fingerprints. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (49), 12020–12031. <https://doi.org/10.1021/jf402288j>.
- (166) Manzano Durán, R.; Sánchez, J. E. F.; Velardo-Micharet, B.; Gómez, M. J. R. Multivariate Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction for the Determination of Phenolic Compounds in Plums (*Prunus salicina* Lindl.) by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Instrum. Sci. Technol.* **2020**, 48 (2), 113–127. <https://doi.org/10.1080/10739149.2019.1662438>.
- (167) Venter, A.; Joubert, E.; De Beer, D. Characterisation of Phenolic Compounds in South African Plum Fruits (*Prunus salicina* Lindl.) Using HPLC Coupled with Diode-Array, Fluorescence, Mass Spectrometry and on-Line Antioxidant Detection. *Molecules* **2013**, 18 (5), 5072–5090. <https://doi.org/10.3390/molecules18055072>.
- (168) Bouayed, J.; Rammal, H.; Dicko, A.; Younos, C.; Soulimani, R. Chlorogenic Acid, a

- Polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with Coupled Anxiolytic and Antioxidant Effects. *J. Neurol. Sci.* **2007**, 262 (1–2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.06.028>.
- (169) Treutter, D.; Wang, D.; Farag, M. A.; Baires, G. D. A.; Rühmann, S.; Neumüller, M. Diversity of Phenolic Profiles in the Fruit Skin of *Prunus domestica* Plums and Related Species. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (48), 12011–12019. <https://doi.org/10.1021/jf303644f>.
- (170) Kikuzaki, H.; Kayano, S. I.; Fukutsuka, N.; Aoki, A.; Kasamatsu, K.; Yamasaki, Y.; Mitani, T.; Nakatani, N. Absciscic Acid Related Compounds and Lignans in Prunes (*Prunus domestica* L.) and Their Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (2), 344–349. <https://doi.org/10.1021/jf034954v>.
- (171) Krammer, G.; Winterhalter, P.; Schwab, M.; Schreier, P. Glycosidically Bound Aroma Compounds in the Fruits of Prunus Species: Apricot (*P. Armeniaca* L.), Peach (*P. Persica* L.), Yellow Plum (*P. Domestica*, L. Ssp. *Syriaca*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39 (4), 778–781. <https://doi.org/10.1021/jf00004a032>.
- (172) Jiménez-Escrig, A.; Santos-Hidalgo, A. B.; Saura-Calixto, F. Common Sources and Estimated Intake of Plant Sterols in the Spanish Diet. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (9), 3462–3471. <https://doi.org/10.1021/jf053188k>.
- (173) Markley, K. S.; Sando, C. E. Wax-like Constituents of the Cuticle of the Cherry, *Prunus avium* L. *J. Biol. Chem.* **1937**, 119, 641–645.
- (174) Mulabagal, V.; Lang, G. A.; Dewitt, D. L.; Dalavoy, S. S.; Nair, M. G. Anthocyanin Content, Lipid Peroxidation and Cyclooxygenase Enzyme Inhibitory Activities of Sweet and Sour Cherries. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (4), 1239–1246. <https://doi.org/10.1021/jf8032039>.
- (175) Bernardo-Gil, G.; Oneto, C.; Antunes, P.; Rodrigues, M. F.; Empis, J. M. Extraction of Lipids from Cherry Seed Oil Using Supercritical Carbon Dioxide. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 212 (2), 170–174. <https://doi.org/10.1007/s002170000228>.
- (176) Piironen, V.; Toivo, J.; Puupponen-Pimiä, R.; Lampi, A. M. Plant Sterols in Vegetables, Fruits and Berries. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, 83 (4), 330–337. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1316>.
- (177) Stosic, D.; Gorunovic, M.; Miric, M. Unsaponifiable Fatty Oils from Certain Species of *Prunus* L., Amygdalaceae. *Pharmazie* **1985**, 40 (7), 505–506.
- (178) Dias, M. G.; Camões, M. F. G. F. C.; Oliveira, L. Carotenoids in Traditional Portuguese Fruits and Vegetables. *Food Chem.* **2009**, 113 (3), 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.002>.
- (179) Biehler, E.; Alkerwi, A.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Guillaume, M.; Lair, M. L.; Bohn, T. Contribution of Violaxanthin, Neoxanthin, Phytoene and Phytofluene to Total Carotenoid Intake: Assessment in Luxembourg. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, 25 (1), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.07.005>.
- (180) Al-Ahmary, K. M. The Carotenoids of Some Food Stuffs in Saudi Arabia. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, 61 (8), 823–828. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.488638>.
- (181) Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. A. Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (17), 4976–4982. <https://doi.org/10.1021/jf020136b>.
- (182) Yan, H.; Pengfei, W.; Brennan, H.; Ping, Q.; Bingxiang, L.; Feiyan, Z.; Hongbo, C.; Haijiang, C. Diversity of Carotenoid Composition, Sequestering Structures and Gene Transcription in Mature Fruits of Four *Prunus* Species. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, 151 (February),

- 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.015>.
- (183) Górnaś, P.; Rudzińska, M.; Raczyk, M.; Mišina, I.; Soliven, A.; Laacis, G.; Seglina, D. Impact of Species and Variety on Concentrations of Minor Lipophilic Bioactive Compounds in Oils Recovered from Plum Kernels. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (4), 898–905. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05330>.
- (184) Kayano, S. I.; Kikuzaki, H.; Hashimoto, S.; Kasamatsu, K.; Ikami, T.; Nakatani, N. Glucosyl Terpenates from the Dried Fruits of *Prunus domestica* L. *Phytochem. Lett.* **2014**, *8* (1), 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.03.006>.
- (185) Nagarajan, G. R.; Parmar, V. S. Phloracetophenone Derivatives in *Prunus domestica*. *Phytochem.* **1977**, *16* (5), 614–615. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(77\)80035-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)80035-6).
- (186) Group, T. A. P.; Chase, M. W.; Christenhusz, M. J. M.; Fay, M. F.; Byng, J. W.; Judd, W. S.; Soltis, D. E.; Mabberley, D. J.; Sennikov, A. N.; Soltis, P. S.; Stevens, P. F. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* **2016**, *181* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.
- (187) Xu, X.; Xie, H.; Wang, Y.; Wei, X. A-Type Proanthocyanidins from Lychee Seeds and Their Antioxidant and Antiviral Activities. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (22), 11667–11672. <https://doi.org/10.1021/jf1033202>.
- (188) Emanuele, S.; Lauricella, M.; Calvaruso, G.; D’Anne, A.; Giuliano, M. *Litchi chinensis* as a Functional Food and a Source of Antitumor Compounds: An Overview and a Description of Biochemical Pathways. *Nutrients* **2017**, *9* (9). <https://doi.org/10.3390/nu9090992>.
- (189) Torres-Becerril, M.; Morales-Trejo, F.; Arvizu-Barrón, E.; Ojeda-Enciso, L. A.; Zaldívar-Cruz, J. M.; Armida-Alcudia, L. Situación Actual Del Cultivo de Litchi En Municipios Productores de Veracruz y Oaxaca, México. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* **2019**, *10* (3), 563–574. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1457>.
- (190) Kilari, E. K.; Putta, S. Biological and Phytopharmacological Descriptions of *Litchi Chinensis*. *Pharmacogn. Rev.* **2016**, *10* (19), 60–65. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.176548>.
- (191) Zhao, L.; Wang, K.; Wang, K.; Zhu, J.; Hu, Z. Nutrient Components, Health Benefits, and Safety of Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.): A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19* (4), 2139–2163. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12590>.
- (192) Garcia Rivas, I. Hojas Divulgativas: Cultivo del litchi en la Costa Mediterranea. Junta de Andalucía 1990.
- (193) Ogasawara, J.; Kitadate, K.; Nishioka, H.; Fujii, H.; Sakurai, T.; Kizaki, T.; Izawa, T.; Ishida, H.; Ohno, H. Oligonol, a New Lychee Fruit-Derived Low-Molecular Form of Polyphenol, Enhances Lipolysis in Primary Rat Adipocytes through Activation of the ERK1/2 Pathway. *Phyther. Res.* **2009**, *23* (11), 1626–1633. <https://doi.org/10.1002/ptr.2846>.
- (194) Nishihira, J.; Sato-Ueshima, M.; Kitadate, K.; Wakame, K.; Fujii, H. Amelioration of Abdominal Obesity by Low-Molecular-Weight Polyphenol (Oligonol) from Lychee. *J. Funct. Foods* **2009**, *1* (4), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.09.002>.
- (195) Zhang, X. H.; Yokoo, H.; Nishioka, H.; Fujii, H.; Matsuda, N.; Hayashi, T.; Hattori, Y. Beneficial Effect of the Oligomerized Polyphenol Oligonol on High Glucose-Induced Changes in ENOS Phosphorylation and Dephosphorylation in Endothelial Cells. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159* (4), 928–938. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00594.x>.
- (196) Chen, X.; Wu, Q.; Chen, Z.; Li, T.; Zhang, Z.; Gao, H.; Yun, Z.; Jiang, Y. Changes in Pericarp Metabolite Profiling of Four Litchi Cultivars during Browning. *Food Res. Int.* **2019**, *120*

- (January), 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.046>.
- (197) Feng, S.; Huang, M.; Crane, J. H.; Wang, Y. Characterization of Key Aroma-Active Compounds in Lychee (*Litchi Chinensis* Sonn.). *J. Food Drug Anal.* **2018**, *26* (2), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.013>.
- (198) Phanchaisri, C.; Chaikham, P. Changes in Lychee (*Litchi Chinensis* Sonn.) Texture and Volatile Compounds Due to Ultra-High Pressure Processing. *Int. Food Res. J.* **2017**, *24* (3), 1220–1226.
- (199) Wu, Y.; Pan, Q.; Qu, W.; Duan, C. Comparison of Volatile Profiles of Nine Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Cultivars from Southern China. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (20), 9676–9681. <https://doi.org/10.1021/jf902144c>.
- (200) Wang, Y. J.; Zhao, D. X.; Gao, J. L.; Peng, Z. Q. Volatile Components of *Litchi Chinensis* Sonn. Leaf Oil Extracts Obtained by Simultaneous Distillation Extraction. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **2013**, *16* (2), 161–165. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.794048>.
- (201) Rawat, P.; Azad, A.; Kumar, A.; Singh, T. D.; Pal, M. A Comparative Study of Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Litchi Chinensis* Growing in Different Geographical Areas of India. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **2018**, *20* (6), 1627–1632. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1417061>.
- (202) Wen, L.; Wu, D.; Jiang, Y.; Prasad, K. N.; Lin, S.; Jiang, G.; He, J.; Zhao, M.; Luo, W.; Yang, B. Identification of Flavonoids in Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Leaf and Evaluation of Anticancer Activities. *J. Funct. Foods* **2014**, *6* (1), 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.022>.
- (203) Ren, S.; Xu, D.; Pan, Z.; Gao, Y.; Jiang, Z.; Gao, Q. Two Flavanone Compounds from Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Seeds, One Previously Unreported, and Appraisal of Their  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities. *Food Chem.* **2011**, *127* (4), 1760–1763. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.054>.
- (204) Wang, L.; Lou, G.; Ma, Z.; Liu, X. Chemical Constituents with Antioxidant Activities from Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Seeds. *Food Chem.* **2011**, *126* (3), 1081–1087. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.133>.
- (205) Xu, X.; Xie, H.; Hao, J.; Jiang, Y.; Wei, X. Flavonoid Glycosides from the Seeds of *Litchi Chinensis*. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (4), 1205–1209. <https://doi.org/10.1021/jf104387y>.
- (206) Ren, S.; Xu, D. duo; Gao, Y.; Ma, Y. ting; Gao, Q. pin. Flavonoids from Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Seeds and Their Inhibitory Activities on  $\alpha$ -Glucosidase. *Chem. Res. Chinese Univ.* **2013**, *29* (4), 682–685. <https://doi.org/10.1007/s40242-013-3030-x>.
- (207) Jiang, G.; Lin, S.; Wen, L.; Jiang, Y.; Zhao, M.; Chen, F.; Prasad, K. N.; Duan, X.; Yang, B. Identification of a Novel Phenolic Compound in Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Pericarp and Bioactivity Evaluation. *Food Chem.* **2013**, *136* (2), 563–568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.089>.
- (208) Su, D.; Ti, H.; Zhang, R.; Zhang, M.; Wei, Z.; Deng, Y.; Guo, J. Structural Elucidation and Cellular Antioxidant Activity Evaluation of Major Antioxidant Phenolics in Lychee Pulp. *Food Chem.* **2014**, *158*, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.134>.
- (209) Zhang, R.; Zeng, Q.; Deng, Y.; Zhang, M.; Wei, Z.; Zhang, Y.; Tang, X. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Litchi Pulp of Different Cultivars Cultivated in Southern China. *Food Chem.* **2013**, *136* (3–4), 1169–1176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.085>.
- (210) Zhou, H. C.; Lin, Y. M.; Li, Y. Y.; Li, M.; Wei, S. D.; Chai, W. M.; Tam, N. F. yee. Antioxidant

- Properties of Polymeric Proanthocyanidins from Fruit Stones and Pericarps of *Litchi Chinensis* Sonn. *Food Res. Int.* **2011**, 44 (2), 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.016>.
- (211) Sun, J.; Jiang, Y.; Shi, J.; Wei, X.; Xue, S. J.; Shi, J.; Yi, C. Antioxidant Activities and Contents of Polyphenol Oxidase Substrates from Pericarp Tissues of Litchi Fruit. *Food Chem.* **2010**, 119 (2), 753–757. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.025>.
- (212) Zhao, M.; Yang, B.; Wang, J.; Liu, Y.; Yu, L.; Jiang, Y. Immunomodulatory and Anticancer Activities of Flavonoids Extracted from Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Pericarp. *Int. Immunopharmacol.* **2007**, 7 (2), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.09.003>.
- (213) Sun, J.; Jiang, Y.; Wei, X.; Shi, J.; You, Y.; Liu, H.; Kakuda, Y.; Zhao, M. Identification of (-)-Epicatechin as the Direct Substrate for Polyphenol Oxidase Isolated from Litchi Pericarp. *Food Res. Int.* **2006**, 39 (8), 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.05.001>.
- (214) Yang, D. J.; Chang, Y. Z.; Chen, Y. C.; Liu, S. C.; Hsu, C. H.; Lin, J. T. Antioxidant Effect and Active Components of Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Flower. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, 50 (9), 3056–3061. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.011>.
- (215) Nagendra Prasad, K.; Yang, B.; Yang, S.; Chen, Y.; Zhao, M.; Ashraf, M.; Jiang, Y. Identification of Phenolic Compounds and Appraisal of Antioxidant and Antityrosinase Activities from Litchi (*Litchi Sinensis* Sonn.) Seeds. *Food Chem.* **2009**, 116 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.079>.
- (216) Li, W.; Liang, H.; Zhang, M. W.; Zhang, R. F.; Deng, Y. Y.; Wei, Z. C.; Zhang, Y.; Tang, X. J. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Fruit Pericarp from Different Commercially Available Cultivars. *Molecules* **2012**, 17 (12), 14954–14967. <https://doi.org/10.3390/molecules171214954>.
- (217) Liu, L.; Xie, B.; Cao, S.; Yang, E.; Xu, X.; Guo, S. A-Type Procyanidins from *Litchi Chinensis* Pericarp with Antioxidant Activity. *Food Chem.* **2007**, 105 (4), 1446–1451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.022>.
- (218) Le Roux, E.; Doco, T.; Sarni-Manchado, P.; Lozano, Y.; Cheynier, V. A-Type Proanthocyanidins from Pericarp of *Litchi Chinensis*. *Phytochemistry* **1998**, 48 (7), 1251–1258. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01070-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01070-4).
- (219) Castellain, R. C. L.; Gesser, M.; Tonini, F.; Schulte, R. V.; Demessiano, K. Z.; Wolff, F. R.; Delle-Monache, F.; Netz, D. J. A.; Cechinel-Filho, V.; de Freitas, R. A. I.; de Souza, M. M.; Meyre-Silva, C. Chemical Composition, Antioxidant and Antinociceptive Properties of *Litchi Chinensis* Leaves. *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, 66 (12), 1796–1807. <https://doi.org/10.1111/jphp.12309>.
- (220) Wen, L.; You, L.; Yang, X.; Yang, J.; Chen, F.; Jiang, Y.; Yang, B. Identification of Phenolics in Litchi and Evaluation of Anticancer Cell Proliferation Activity and Intracellular Antioxidant Activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 84, 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.023>.
- (221) Lv, Q.; Luo, F.; Zhao, X.; Liu, Y.; Hu, G.; Sun, C.; Li, X.; Chen, K. Identification of Proanthocyanidins from Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and Their Antioxidant Activity. *PLoS One* **2015**, 10 (3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120480>.
- (222) Chang, Y. Y.; Yang, D. J.; Chiu, C. H.; Lin, Y. L.; Chen, J. W.; Chen, Y. C. Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects of Polyphenol-Rich Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.)-Flower-Water-Extract on Livers of High-Fat-Diet Fed Hamsters. *J. Funct. Foods* **2013**, 5 (1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.002>.

- (223) Man, S.; Ma, J.; Wang, C.; Li, Y.; Gao, W.; Lu, F. Chemical Composition and Hypoglycaemic Effect of Polyphenol Extracts from *Litchi Chinensis* Seeds. *J. Funct. Foods* **2016**, *22*, 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.032>.
- (224) Malik, I.; Ahmad, V. U.; Anjum, S.; Basha, F. Z. A Pentacyclic Triterpene from *Litchi Chinensis*. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5* (4), 529–530.
- (225) Wen, L.; He, J.; Wu, D.; Jiang, Y.; Prasad, K. N.; Zhao, M.; Lin, S.; Jiang, G.; Luo, W.; Yang, B. Identification of Sesquillignans in Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Leaf and Their Anticancer Activities. *J. Funct. Foods* **2014**, *8* (1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.017>.
- (226) Vilar-Pérez, L. Ericaceae. In *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*; Castroviejo, C., Ed.; Real Jardín Botánico, CSIC: Madrid, 1997.
- (227) Fernández-Alzueta, A. Aplicaciones Fitoterapéuticas Del Arándano Rojo. Prevención de Las Infecciones Del Tracto Urinario. *Elsevier, offarm* **2008**, *27* (9), 71–78.
- (228) Aiton, W. *Vaccinium Macrocarpon*. *Flora North Am.* **2011**, 1–8.
- (229) Kour, K.; Bakshi, P.; Sharma, R. M. Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon* Ait. L). In *Cultivate Minor Temperate Fruits Scientifically*; Jaya Publishing House, New Delhi: New Delhi, 2019; pp 128–181.
- (230) Cranberry Highlights United States Cranberry Production Down Significantly [www.nass.usda.gov](http://www.nass.usda.gov) (accessed Apr 27, 2021).
- (231) Cunningham, D.; Vannozzi, S.; Turk, R.; Roderick, R. Constituyentes Fitoquímicos Del Arándano Americano (*Vaccinium Macrocarpon*) y Sus Beneficios Para La Salud. *Rev. fitoter* **2005**, *5* (1), 5–16.
- (232) Côté, J.; Caillet, S.; Doyon, G.; Sylvain, J. F.; Lacroix, M. Bioactive Compounds in Cranberries and Their Biological Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50* (7), 666–679. <https://doi.org/10.1080/10408390903044107>.
- (233) Zhu, J.; Chen, F.; Wang, L.; Niu, Y.; Chen, H.; Wang, H.; Xiao, Z. Characterization of the Key Aroma Volatile Compounds in Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon* Ait.) Using Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) and Odor Activity Value (OAV). *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (24), 4990–4999. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01150>.
- (234) Diaconeasa, Z.; Iuhas, C. I.; Ayvaz, H.; Rugină, D.; Stanilă, A.; Dulf, F.; Bunea, A.; Socaci, S. A.; Socaciu, C.; Pintea, A. Phytochemical Characterization of Commercial Processed Blueberry, Blackberry, Blackcurrant, Cranberry, and Raspberry and Their Antioxidant Activity. *Antioxidants* **2019**, *8* (11). <https://doi.org/10.3390/antiox8110540>.
- (235) Croteau, R. J.; Fagerson, I. S. Major Volatile Components of the Juice of American Cranberry. *J. Food Sci.* **1968**, *33* (4), 386–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb03635.x>.
- (236) Pappas, E.; Schaich, K. M. Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49* (9), 741–781. <https://doi.org/10.1080/10408390802145377>.
- (237) Mikulic-Petkovsek, M.; Slatnar, A.; Stampar, F.; Veberic, R. HPLC-MS n Identification and Quantification of Flavonol Glycosides in 28 Wild and Cultivated Berry Species. *Food Chem.* **2012**, *135* (4), 2138–2146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.115>.
- (238) Häkkinen, S.; Heinonen, M.; Kärenlampi, S.; Mykkänen, H.; Ruuskanen, J.; Törrönen, R. Screening of Selected Flavonoids and Phenolic Acids in 19 Berries. *Food Res. Int.* **1999**, *32* (5), 345–353. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00095-2).

- (239) Zheng, W.; Wang, S. Y. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (2), 502–509. <https://doi.org/10.1021/jf020728u>.
- (240) Lin, L. Z.; Harnly, J. M. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (4), 1084–1096. <https://doi.org/10.1021/jf062431s>.
- (241) Neto, C. C. Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of in Vitro Anticancer Studies. *J. Nutr.* **2007**, *137* (1). <https://doi.org/10.1093/jn/137.1.186s>.
- (242) Wu, X.; Wu, X.; Xue, L.; Tata, A.; Song, M.; Song, M.; Neto, C. C.; Xiao, H. Bioactive Components of Polyphenol-Rich and Non-Polyphenol-Rich Cranberry Fruit Extracts and Their Chemopreventive Effects on Colitis-Associated Colon Cancer. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (25), 6845–6853. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02604>.
- (243) Chen, H.; Zuo, Y. Identification of Flavonol Glycosides in American Cranberry Fruit. *Food Chem.* **2007**, *101* (4), 1357–1364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.041>.
- (244) Singh, A. P.; Wilson, T.; Kalk, A. J.; Cheong, J.; Vorsa, N. Isolation of Specific Cranberry Flavonoids for Biological Activity Assessment. *Food Chem.* **2009**, *116* (4), 963–968. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.062>.
- (245) Harnly, J. M.; Doherty, R. F.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Bhagwat, S.; Gebhardt, S. Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (26), 9966–9977. <https://doi.org/10.1021/jf061478a>.
- (246) Prior, R. L.; Lazarus, S. A.; Cao, G.; Muccitelli, H.; Hammerstone, J. F. Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium* Spp.) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (3), 1270–1276. <https://doi.org/10.1021/jf001211q>.
- (247) Wu, X.; Prior, R. L. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (7), 2589–2599. <https://doi.org/10.1021/jf048068b>.
- (248) Feliciano, R. P.; Krueger, C. G.; Shanmuganayagam, D.; Vestling, M. M.; Reed, J. D. Deconvolution of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Isotope Patterns to Determine Ratios of A-Type to B-Type Interflavan Bonds in Cranberry Proanthocyanidins. *Food Chem.* **2012**, *135* (3), 1485–1493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.102>.
- (249) Foo, L. Y.; Lu, Y.; Howell, A. B.; Vorsa, N. A-Type Proanthocyanidin Trimers from Cranberry That Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated *Escherichia Coli*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (9), 1225–1228. <https://doi.org/10.1021/np000128u>.
- (250) Pérez, J. A.; Hernández, J. M.; Trujillo, J. M.; López, H. Iridoids and Secoiridoids from Oleaceae. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2005**, *32* (PART L), 303–363. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80059-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80059-6).
- (251) Huang, Y. L.; Oppong, M. B.; Guo, Y.; Wang, L. Z.; Fang, S. M.; Deng, Y. R.; Gao, X. M. The Oleaceae Family: A Source of Secoiridoids with Multiple Biological Activities. *Fitoterapia* **2019**, *136* (March), 104155. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.04.010>.
- (252) Fabiani, R. Anti-Cancer Properties of Olive Oil Secoiridoid Phenols: A Systematic Review of: In Vivo Studies. *Food Funct.* **2016**, *7* (10), 4145–4159. <https://doi.org/10.1039/c6fo00958a>.
- (253) Suh, K. J.; Suh, W. S.; Subedi, L.; Kim, S. Y.; Choi, S. U.; Lee, K. R. Secoiridoid Glucosides

- from the Twigs of *Syringa Oblata* Var. *Dilatata* and Their Neuroprotective and Cytotoxic Activities. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, 65 (4), 359–364. <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00804>.
- (254) Zhang, Y.; Liu, L.; Gao, J.; Wu, C.; Han, L.; Liu, E.; Shi, P.; Gao, X.; Wang, T. New Secoiridoids from the Fruits of *Ligustrum Lucidum* Ait with Triglyceride Accumulation Inhibitory Effects. *Fitoterapia* **2013**, 91, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.08.022>.
- (255) Frankel, E.; Bakhouch, A.; Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Literature Review on Production Process to Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (22), 5179–5188. <https://doi.org/10.1021/jf400806z>.
- (256) Camacho Andrés, C.; Quintanar Sánchez, A.; Talavera Lozano, S. Oleaceae. In *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*; Castroviejo, S., Ed.; Real Jardín Botánico, CSIC: Madrid, 1997; pp 134–135.
- (257) Gómez-Mercado, F. Flora Vascular de Andalucía Oriental. Tomo 3. In *Flora Vascular de Andalucía Oriental. Tomo 3*; Blanca, G., Cabezudo, B., Cueto, M., Fernández-López, C., Morales-Torres, C., Eds.; Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía: Sevilla, 2009; pp 355–356.
- (258) Lipshchitz, N.; Gophna, R.; Hartman, M.; Biger, G. The Beginning of Olive (*Olea europaea*) Cultivation in the Old World: A Reassessment. *J. Archaeol. Sci.* **1991**, 18 (4), 441–453. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90037-P](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90037-P).
- (259) Galili, E.; Stanley, D. J.; Sharvit, J.; Weinstein-Evron, M. Evidence for Earliest Olive-Oil Production in Submerged Settlements off the Carmel Coast, Israel. *J. Archaeol. Sci.* **1997**, 24 (12), 1141–1150. <https://doi.org/10.1006/jasc.1997.0193>.
- (260) Hashmi, M. A.; Khan, A.; Hanif, M.; Farooq, U.; Perveen, S. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/541591>.
- (261) Besnard, G.; Baradat, P.; Bervillé, A. Genetic Relationships in the Olive (*Olea europaea* L.) Reflect Multilocal Selection of Cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, 102 (2–3), 251–258. <https://doi.org/10.1007/s001220051642>.
- (262) Vilar Hernández, J.; Pereira, J. E. *La Olivicultura Internacional. Difusión Histórica, Análisis Estratégico y Visión Descriptiva*, Primera ed.; Fundación Caja Rural de Jaén: Jaén, 2018.
- (263) Ilarioni, L.; Proietti, P. Olive Tree Cultivars. *Extra-Virgin Olive Oil Handb.* **2014**, 59–67. <https://doi.org/10.1002/9781118460412.ch5>.
- (264) Navero, D. ; Cimato, A.; Fiorino, A.; Fiorino, P.; Romero, L. ; Touzani, A.; Castañeda, C.; Serafini, F.; Navas, I. . *Catálogo Mundial de Variedades de Olivo*, Primera ed.; Consejo Oleícola Internacional: Madrid, 2000.
- (265) Brahmi, F.; Flamini, G.; Issaoui, M.; Dhibi, M.; Dabbou, S.; Mastouri, M.; Hammami, M. Chemical Composition and Biological Activities of Volatile Fractions from Three Tunisian Cultivars of Olive Leaves. *Med. Chem. Res.* **2012**, 21 (10), 2863–2872. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9817-8>.
- (266) Campeol, E.; Flamini, G.; Chericoni, S.; Catalano, S.; Cremonini, R. Volatile Compounds from Three Cultivars of *Olea europaea* from Italy. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (11), 5409–5411. <https://doi.org/10.1021/jf010455n>.
- (267) Campeol, E.; Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I.; Cremonini, R.; Ceccarini, L. Volatile Fractions from Three Cultivars of *Olea europaea* L. Collected in Two Different Seasons. *J.*



- Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (7), 1994–1999. <https://doi.org/10.1021/jf026025u>.
- (268) Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I. Volatiles from Leaves, Fruits, and Virgin Oil from *Olea europaea* Cv. Olivastra Seggianese from Italy. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (5), 1382–1386. <https://doi.org/10.1021/jf020854y>.
- (269) Konož, E.; Abbasi, A.; Moazeni, R. S.; Parastar, H.; Jalali-Heravi, M. Chemometrics-Assisted Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Volatile Components of Olive Leaf Oil. *J. Iran. Chem. Soc.* **2013**, 10 (1), 169–179. <https://doi.org/10.1007/s13738-012-0138-8>.
- (270) Mukesi, M.; Iweriebor, B. C.; Obi, L. C.; Nwodo, U. U.; Moyo, S. R.; Okoh, A. I. The Activity of Commercial Antimicrobials, and Essential Oils and Ethanolic Extracts of *Olea europaea* on Streptococcus Agalactiae Isolated from Pregnant Women. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, 19 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2445-4>.
- (271) Brahmi, F.; Dabbou, S.; Flamini, G.; Edziri, H.; Mastouri, M.; Hammami, M. Fatty Acid Composition and Biological Activities of Volatiles from Fruits of Two Tunisian Olive Cultivars. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, 46 (6), 1316–1322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02616.x>.
- (272) Makowska-Wąs, J.; Galanty, A.; Gdula-Argasińska, J.; Tyszcza-Czochara, M.; Szewczyk, A.; Nunes, R.; Carvalho, I. S.; Michalik, M.; Paško, P. Identification of Predominant Phytochemical Compounds and Cytotoxic Activity of Wild Olive Leaves (*Olea europaea* L. Ssp. Sylvestris) Harvested in South Portugal. *Chem. Biodivers.* **2017**, 14 (3), 1–10. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600331>.
- (273) Malheiro, R.; Casal, S.; Cunha, S. C.; Baptista, P.; Pereira, J. A. Identification of Leaf Volatiles from Olive (*Olea europaea*) and Their Possible Role in the Ovipositional Preferences of Olive Fly, Bactrocera Oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Phytochemistry* **2016**, 121, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.10.005>.
- (274) Altarejos, J.; Nogueras, M.; Sánchez, A. Destilación Por Arrastre Con Vapor de Agua de Madera de Olivo. In *MA-10; VIII Simposium Científico-Técnico de Expoliva*: Jaén, 1997.
- (275) Brahmi, F.; Bergaoui, A.; Hammami, S.; Chria, J.; Braham, M.; Mighri, Z. Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Effects of Volatile Fractions from *Olea europaea* Var. Chemlali Growing in Tunisia. *Tunis. J. Med. Plants Nat. Prod.* **2011**, 6, 1–8.
- (276) Özcan, M. M.; Findik, S.; Aljuhaimi, F.; Ghafoor, K.; Babiker, E. F. E.; Adiamo, O. Q. The Effect of Harvest Time and Varieties on Total Phenolics, Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of Olive Fruit and Leaves. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, 56 (5), 2373–2385. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03650-8>.
- (277) Romero, C.; Garcia, P.; Brenes, M.; García, A.; Garrido, A. Phenolic Compounds in Natural Black Spanish Olive Varieties. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 215 (6), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0619-6>.
- (278) Abaza, L.; Taamalli, A.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Zarrouk, M.; Youssef, N. Ben. Changes in Phenolic Composition in Olive Tree Parts According to Development Stage. *Food Res. Int.* **2017**, 100, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.002>.
- (279) Peres, F.; Martins, L. L.; Mourato, M.; Vitorino, C.; Antunes, P.; Ferreira-Dias, S. Phenolic Compounds of “Galega Vulgar” and “Cobrançosa” Olive Oils along Early Ripening Stages. *Food Chem.* **2016**, 211, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.022>.
- (280) Bouaziz, M.; Chamkha, M.; Sayadi, S. Comparative Study on Phenolic Content and Antioxidant Activity during Maturation of the Olive Cultivar Chemlali from Tunisia. *J.*

- Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (17), 5476–5481. <https://doi.org/10.1021/jf0497004>.
- (281) Ben Mohamed, M.; Guasmi, F.; Ben Ali, S.; Radhouani, F.; Faghim, J.; Triki, T.; Kammoun, N. G.; Baffi, C.; Lucini, L.; Benincasa, C. The LC-MS/MS Characterization of Phenolic Compounds in Leaves Allows Classifying Olive Cultivars Grown in South Tunisia. *Biochem. Syst. Ecol.* **2018**, *78* (April), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.04.005>.
- (282) Ammar, S.; Contreras, M. del M.; Gargouri, B.; Segura-Carretero, A.; Bouaziz, M. RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Based Metabolic Profiling of the Potential *Olea europaea* by-Product “Wood” and Its Comparison with Leaf Counterpart. *Phytochem. Anal.* **2017**, *28* (3), 217–229. <https://doi.org/10.1002/pca.2664>.
- (283) Caballero, A. S.; Romero-García, J. M.; Castro, E.; Cardona, C. A. Supercritical Fluid Extraction for Enhancing Polyphenolic Compounds Production from Olive Waste Extracts. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2020**, *95* (2), 356–362. <https://doi.org/10.1002/jctb.5907>.
- (284) Ryan, D.; Prenzler, P. D.; Lavee, S.; Antolovich, M.; Robards, K. Quantitative Changes in Phenolic Content during Physiological Development of the Olive (*Olea europaea*) Cultivar Hardy’s Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (9), 2532–2538. <https://doi.org/10.1021/jf0261351>.
- (285) Romero, C.; Brenes, M.; García, P.; Garrido, A. Hydroxytyrosol 4-β-D-Glucoside, an Important Phenolic Compound in Olive Fruits and Derived Products. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (13), 3835–3839. <https://doi.org/10.1021/jf011485t>.
- (286) Quirantes-Piné, R.; Lozano-Sánchez, J.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. HPLC-ESI-QTOF-MS as a Powerful Analytical Tool for Characterising Phenolic Compounds in Olive-Leaf Extracts. *Phytochem. Anal.* **2013**, *24* (3), 213–223. <https://doi.org/10.1002/pca.2401>.
- (287) Ortega-García, F.; Peragón, J. Phenol Metabolism in the Leaves of the Olive Tree (*Olea europaea* L.) Cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (23), 12440–12448. <https://doi.org/10.1021/jf102827m>.
- (288) Brahmi, F.; Mechri, B.; Dhibi, M.; Hammami, M. Variations in Phenolic Compounds and Antiradical Scavenging Activity of *Olea europaea* Leaves and Fruits Extracts Collected in Two Different Seasons. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.042>.
- (289) Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Macchioni, A.; Montedoro, G. F. Phenolic Compounds of Olive Fruit: One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Nuzhenide and Its Distribution in the Constitutive Parts of Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (1), 12–18. <https://doi.org/10.1021/jf9806210>.
- (290) Taamalli, A.; Abaza, L.; Arráez Román, D.; Segura Carretero, A.; Fernández Gutiérrez, A.; Zarrouk, M.; Ben Youssef, N. Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-TOF/IT/MS in Buds and Open Flowers of “chemlali” Olive Cultivar. *Phytochem. Anal.* **2013**, *24* (5), 504–512. <https://doi.org/10.1002/pca.2450>.
- (291) Angelis, A.; Mavros, P.; Nikolaou, P. E.; Mitakou, S.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, L. Phytochemical Analysis of Olive Flowers’ Hydroalcoholic Extract and in Vitro Evaluation of Tyrosinase, Elastase and Collagenase Inhibition Activity. *Fitoterapia* **2020**, *143* (April). <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104602>.
- (292) Cecchi, L.; Migliorini, M.; Cherubini, C.; Giusti, M.; Zanoni, B.; Innocenti, M.; Mulinacci, N. Phenolic Profiles, Oil Amount and Sugar Content during Olive Ripening of Three Typical Tuscan Cultivars to Detect the Best Harvesting Time for Oil Production. *Food Res. Int.* **2013**, *54* (2), 1876–1884. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.033>.

- (293) Sivakumar, G.; Briccoli Bati, C.; Uccella, N. HPLC-MS Screening of the Antioxidant Profile of Italian Olive Cultivars. *Chem. Nat. Compd.* **2005**, *41* (5), 588–591. <https://doi.org/10.1007/s10600-005-0214-8>.
- (294) Ryan, D.; Antolovich, M.; Herlt, T.; Prenzler, P. D.; Lavee, S.; Robards, K. Identification of Phenolic Compounds in Tissues of the Novel Olive Cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (23), 6716–6724. <https://doi.org/10.1021/jf025736p>.
- (295) Savarese, M.; De Marco, E.; Sacchi, R. Characterization of Phenolic Extracts from Olives (*Olea europaea* Cv. Pisciotana) by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2007**, *105* (2), 761–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.037>.
- (296) Michel, T.; Khlif, I.; Kanakis, P.; Termentzi, A.; Allouche, N.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, A. L. UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS Based Metabolic Profiling and Characterization of Different *Olea europaea* Organs of Koroneiki and Chetoui Varieties. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 424–439. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.12.020>.
- (297) Japón-Luján, R.; Luque De Castro, M. D. Small Branches of Olive Tree: A Source of Biophenols Complementary to Olive Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (11), 4584–4588. <https://doi.org/10.1021/jf070215t>.
- (298) Dagdelen, A.; Tümen, G.; Özcan, M. M.; Dündar, E. Phenolics Profiles of Olive Fruits (*Olea europaea* L.) and Oils from Ayvalik, Domat and Gemlik Varieties at Different Ripening Stages. *Food Chem.* **2013**, *136* (1), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.046>.
- (299) Ranalli, A.; Contento, S.; Lucera, L.; Di Febo, M.; Marchegiani, D.; Di Fonzo, V. Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (2), 434–440. <https://doi.org/10.1021/jf051647b>.
- (300) Agalias, A.; Melliou, E.; Magiatis, P.; Mitaku, S.; Gikas, E.; Tsarbopoulos, A. Quantitation of Oleuropein and Related Metabolites in Decoctions of *Olea europaea* Leaves from Ten Greek Cultivated Varieties by HPLC with Diode Array Detection (HPLC-DAD). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28* (10), 1557–1571. <https://doi.org/10.1081/JLC-200058355>.
- (301) Rovellini, P.; Cortesi, N. Identification of Three Intermediate Compounds in the Biosynthesis of Secoiridoids as Oleoside-Type in Different Anatomic Parts of *Olea europaea* L. by HPLC-Electrospray-Mass Spectrometry. *Riv. Ital. Delle Sostanze Grasse* **1998**, *75*, 543–550.
- (302) Talhaoui, N.; Gómez-Caravaca, A. M.; León, L.; De La Rosa, R.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Pattern of Variation of Fruit Traits and Phenol Content in Olive Fruits from Six Different Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (48), 10466–10476. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04315>.
- (303) Tóth, G.; Alberti, Á.; Sólyomváry, A.; Barabás, C.; Boldizsár, I.; Noszál, B. Phenolic Profiling of Various Olive Bark-Types and Leaves: HPLC-ESI/MS Study. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *67*, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.077>.
- (304) Melliou, E.; Zweigenbaum, J. A.; Mitchell, A. E. Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography Triple-Quadrupole Tandem Mass Spectrometry Quantitation of Polyphenols and Secoiridoids in California-Style Black Ripe Olives and Dry Salt-Cured Olives. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (9), 2400–2405. <https://doi.org/10.1021/jf506367e>.
- (305) Gutierrez-Rosales, F.; Romero, M. P.; Casanovas, M.; Motilva, M. J.; Mínguez-Mosquera, M. I. Metabolites Involved in Oleuropein Accumulation and Degradation in Fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (24), 12924–12933. <https://doi.org/10.1021/jf103083u>.

- (306) Kumral, A.; Korukluoglu, M.; Romero, C.; de Castro, A.; Ruiz-Barba, J. L.; Brenes, M. Phenolic Inhibitors Involved in the Natural Fermentation of Gemlik Cultivar Black Olives. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, 236 (1), 101–107. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1859-8>.
- (307) Medina, E.; Romero, C.; García, P.; Brenes, M. Characterization of Bioactive Compounds in Commercial Olive Leaf Extracts, and Olive Leaves and Their Infusions. *Food Funct.* **2019**, 10 (8), 4716–4724. <https://doi.org/10.1039/c9fo00698b>.
- (308) Karioti, A.; Chatzopoulou, A.; Bilia, A. R.; Liakopoulos, G.; Stavrianakou, S.; Skaltsa, H. Novel Secoiridoid Glucosides in *Olea europaea* Leaves Suffering from Boron Deficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70 (8), 1898–1903. <https://doi.org/10.1271/bbb.60059>.
- (309) Cardoso, S. M.; Guyot, S.; Marnet, N.; Lopes-da-Silva, J. A.; Renard, C. M. G. C.; Coimbra, M. A. Characterisation of Phenolic Extracts from Olive Pulp and Olive Pomace by Electrospray Mass Spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, 85 (1), 21–32. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1925>.
- (310) Jerman Klen, T.; Golc Wondra, A.; Vrhovšek, U.; Sivilotti, P.; Vodopivec, B. M. Olive Fruit Phenols Transfer, Transformation, and Partition Trail during Laboratory-Scale Olive Oil Processing. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63 (18), 4570–4579. <https://doi.org/10.1021/jf506353z>.
- (311) Nicoli, F.; Negro, C.; Vergine, M.; Aprile, A.; Nutricati, E.; Sabella, E.; Miceli, A.; Luvisi, A.; De Bellis, L. Evaluation of Phytochemical and Antioxidant Properties of 15 Italian *Olea europaea* L. Cultivar Leaves. *Molecules* **2019**, 24 (10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101998>.
- (312) Romero, C.; Medina, E.; Mateo, M. A.; Brenes, M. Quantification of Bioactive Compounds in Picual and Arbequina Olive Leaves and Fruit. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, 97 (6), 1725–1732. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7920>.
- (313) Beyerman, H. C.; Dijck, L. A. van; Levisalles, J.; Melera, A.; Veer, W. L. C. The Structure of Elenolide. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1961**, No. 10, 1812–1820.
- (314) Rigane, G.; Salem, R. Ben; Sayadi, S.; Bouaziz, M. Phenolic Composition, Isolation, and Structure of a New Deoxyloganic Acid Derivative from Dhokar and Gemri-Dhokar Olive Cultivars. *J. Food Sci.* **2011**, 76 (7), 965–973. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02290.x>.
- (315) Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K. M.; Gilani, A. H.; Saari, N. *Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (Olea europaea L.)-A Review*; 2012; Vol. 13. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>.
- (316) Ortega-García, F.; Peragón, J. HPLC Analysis of Oleuropein, Hydroxytyrosol, and Tyrosol in Stems and Roots of *Olea europaea* L. Cv. Picual during Ripening. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, 90 (13), 2295–2300. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4085>.
- (317) Brahmi, F.; Mechri, B.; Flamini, G.; Dhibi, M.; Hammami, M. Antioxidant Activities of the Volatile Oils and Methanol Extracts from Olive Stems. *Acta Physiol. Plant.* **2013**, 35 (4), 1061–1070. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1144-2>.
- (318) Romero-Segura, C.; Sanz, C.; Perez, A. G. Purification and Characterization of an Olive Fruit  $\beta$ -Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (17), 7983–7988. <https://doi.org/10.1021/jf901293c>.
- (319) Gariboldi, P.; Jommi, G.; Verotta, L. Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry* **1986**, 25 (4), 865–869. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)80018-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(86)80018-8).

- (320) Grewal, R.; Reutzel, M.; Dilberger, B.; Hein, H.; Zotzel, J.; Marx, S.; Tretzel, J.; Sarafeddin, A.; Fuchs, C.; Eckert, G. P. Purified Oleocanthal and Ligstroside Protect against Mitochondrial Dysfunction in Models of Early Alzheimer's Disease and Brain Ageing. *Exp. Neurol.* **2020**, *328* (October 2019), 113248. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113248>.
- (321) Romani, A.; Mulas, S.; Heimler, D. Polyphenols and Secoiridoids in Raw Material (*Olea europaea* L. Leaves) and Commercial Food Supplements. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243* (3), 429–435. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2756-3>.
- (322) Medfai, W.; Contreras, M. D. M.; Lama-Muñoz, A.; Mhamdi, R.; Oueslati, I.; Castro, E. How Cultivar and Extraction Conditions Affect Antioxidants Type and Extractability for Olive Leaves Valorization. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (13), 5107–5118. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07175>.
- (323) Maestri, D.; Barrionuevo, D.; Bodoira, R.; Zafra, A.; Jiménez-López, J.; Alché, J. de D. Nutritional Profile and Nutraceutical Components of Olive (*Olea europaea* L.) Seeds. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56* (9), 4359–4370. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03904-5>.
- (324) Kuwajima, H.; Uemura, T.; Takaishi, K.; Inoue, K.; Inouye, H. A Secoiridoid Glucoside From *Olea europaea*. *Phytochemistry* **1988**, *27* (6), 1757–1759.
- (325) Savournin, C.; Baghdikian, B.; Elias, R.; Dargouth-Kesraoui, F.; Boukef, K.; Balansard, G. Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (2), 618–621. <https://doi.org/10.1021/jf000596+>.
- (326) Ragazzi, E.; Veronese, G. Presence of Demethyloleuropeine in Olives of Various Cultivars. *Ann. di Chim. (Rome, Italy)* **1973**, *63* (1–2), 21–27.
- (327) Esti, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (1), 32–35. <https://doi.org/10.1021/jf970391+>.
- (328) Gentile, L.; Uccella, N. A. Selected Bioactives from Callus Cultures of Olives (*Olea europaea* L. Var. Coratina) by LC-MS. *Food Res. Int.* **2014**, *55*, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.046>.
- (329) Karioti, A.; Giocaliere, E.; Guccione, C.; Pieraccini, G.; Gallo, E.; Vannacci, A.; Bilia, A. R. Combined HPLC-DAD-MS, HPLC-MSn and NMR Spectroscopy for Quality Control of Plant Extracts: The Case of a Commercial Blend Sold as Dietary Supplement. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *88*, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.040>.
- (330) Bianco, A.; Chiacchio, M. A.; Grassi, G.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Romeo, R. Phenolic Components of Olea Europea: Isolation of New Tyrosol and Hydroxytyrosol Derivatives. *Food Chem.* **2006**, *95* (4), 562–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.033>.
- (331) Hansen, K.; Adersen, A.; Christensen, S. B.; Jensen, S. R.; Nyman, U.; Smitt, U. W. Isolation of an Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* **1996**, *2* (4), 319–325. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80076-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80076-6).
- (332) Maestro-Durán, R. León-Cabello, R. . Glucósidos Fenólicos Amargos de Las Semillas Del Olivo (*Olea europaea* L.). *Grasas Y Aceites* **1994**, *45* (5), 332–335. <https://doi.org/10.3989/egeogr.2001.i245.267>.
- (333) Di Donna, L.; Mazzotti, F.; Napoli, A.; Salerno, R.; Sajjad, A.; Sindona, G. Secondary Metabolism of Olive Secoiridoids. New Microcomponents Detected in Drupes by Electrospray Ionization and High-Resolution Tandem Mass Spectrometry. *Rapid*

- Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21* (3), 273–278. <https://doi.org/10.1002/rcm.2830>.
- (334) Bouaziz, M.; Grayer, R. J.; Simmonds, M. S. J.; Damak, M.; Sayadi, S. Identification and Antioxidant Potential of Flavonoids and Low Molecular Weight Phenols in Olive Cultivar Chemlali Growing in Tunisia. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (2), 236–241. <https://doi.org/10.1021/jf048859d>.
- (335) Wang, B.; Qu, J.; Luo, S.; Feng, S.; Li, T.; Yuan, M.; Huang, Y.; Liao, J.; Yang, R.; Ding, C. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from Olive (*Olea europaea*) Leaves, and Evaluation of Their Antioxidant and Anticancer Activities. *Molecules* **2018**, *23* (10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102513>.
- (336) Bouaziz, M.; Sayadi, S. Isolation and Evaluation of Antioxidants from Leaves of a Tunisian Cultivar Olive Tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107* (7–8), 497–504. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200501166>.
- (337) Baldi, A.; Romani, A.; Tatti, S.; Mulinacci, N.; Vincieri, F. F. HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds Present in Olea Europea L.(Cv. Leccino. *Colloq. - Inst. Natl. la Rech. Agron.* **1995**, *69* (Polyphenols 94), 269–270.
- (338) Japón-Luján, R.; Luque-Rodríguez, J. M.; Luque De Castro, M. D. Dynamic Ultrasound-Assisted Extraction of Oleuropein and Related Biophenols from Olive Leaves. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1108* (1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.106>.
- (339) Benavente-García, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuño, A.; Del Río, J. A. Antioxidant Activity of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chem.* **2000**, *68* (4), 457–462. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6).
- (340) Pieroni, A.; Heimler, D.; Pieters, L.; van Poel, B.; Vlietinck, A. J. In Vitro Anti-Complementary Activity of Flavonoids from Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *Pharmazie* **1996**, *51* (10), 765–768.
- (341) Báidez, A. G.; Gómez, P.; Del Río, J. A.; Ortuño, A. Antifungal Capacity of Major Phenolic Compounds of *Olea europaea* L. against Phytophthora Megasperma Drechsler and Cylindrocarpum Destructans (Zinssm.) Scholten. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2006**, *69* (4–6), 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.05.001>.
- (342) Pereira, A. P.; Ferreira, I. C. F. R.; Marcelino, F.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J. A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* **2007**, *12* (5), 1153–1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>.
- (343) Malik, N. S. A.; Bradford, J. M. Changes in Oleuropein Levels during Differentiation and Development of Floral Buds in “Arbequina” Olives. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2006**, *110* (3), 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.016>.
- (344) Soussi, R.; Hfaiedh, N.; Sakly, M.; Ben Rhouma, K. The Aqueous Extract of: *Olea europaea* Leaves Protects from Haematotoxicity and Kidney Damage Induced by Diclofenac in Swiss Albino Mice. *RSC Adv.* **2019**, *9* (40), 23352–23361. <https://doi.org/10.1039/c9ra01670h>.
- (345) Akbaş, Ü. G.; Uslu, N.; Juhaime, F. Al; Özcan, M. M.; Ghafoor, K.; Babiker, E. E.; Jamiu, F. G.; Hussain, S. The Effect of Drying on Phenolic Compound, Antioxidant Activity, and Mineral Contents of Leaves of Different Olive Varieties. *J. Food Process. Preserv.* **2018**, *42* (5), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13606>.
- (346) de Laurentis, N.; Stefanizzi, L.; Milillo, M. A.; Tantillo, G. Flavonoids from Leaves of *Olea europaea* L. Cultivars. *Ann. Pharm. Fr.* **1998**, *56* (6), 268–273.
- (347) De Laurentis, N.; Crescenzo, G.; Lai, O. R.; Milillo, M. A. Investigation on the Extraction and

- Concentration of Oleuropein and Flavonoids in Olea Europea Based Products. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1997**, 7 (1), 27–30.
- (348) Nishibe, S.; Tsukamoto, H.; Agata, I.; Hisada, S.; Shima, K.; Takemoto, T. Isolation of Phenolic Compounds from Stems of *Olea europaea*. *Shoyakugaku Zasshi* **1981**, 35 (3), 251–254.
- (349) Zhang, Y.; Wen, M.; Zhou, P.; Tian, M.; Zhou, J.; Zhang, L. Analysis of Chemical Composition in Chinese Olive Leaf Tea by UHPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS and GC-MS and Its Lipid-Lowering Effects on the Obese Mice Induced by High-Fat Diet. *Food Res. Int.* **2020**, 128 (November 2019), 108785. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108785>.
- (350) Meirinhos, J.; Silva, B. M.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A.; Dias, A.; Andrade, P. B.; Ferreres, F. Analysis and Quantification of Flavonoidic Compounds from Portuguese Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Cultivars. *Nat. Prod. Res.* **2005**, 19 (2), 189–195. <https://doi.org/10.1080/14786410410001704886>.
- (351) Aprile, A.; Negro, C.; Sabella, E.; Luvisi, A.; Nicoli, F.; Nutricati, E.; Vergine, M.; Miceli, A.; Blando, F.; De Bellis, L. Antioxidant Activity and Anthocyanin Contents in Olives (CV Cellina Di Nardò) during Ripening and after Fermentation. *Antioxidants* **2019**, 8 (5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox8050138>.
- (352) Yorulmaz, A.; Erinc, H.; Tekin, A. Changes in Olive and Olive Oil Characteristics during Maturation. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, 90 (5), 647–658. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2210-7>.
- (353) Gómez-Rico, A.; Fregapane, G.; Salvador, M. D. Effect of Cultivar and Ripening on Minor Components in Spanish Olive Fruits and Their Corresponding Virgin Olive Oils. *Food Res. Int.* **2008**, 41 (4), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.02.003>.
- (354) Romani, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F. F.; Cimato, A. Polyphenolic Content in Five Tuscany Cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (3), 964–967. <https://doi.org/10.1021/jf980264t>.
- (355) Fabbri, A.; Galaverna, G.; Ganino, T. Polyphenol Composition of Olive Leaves with Regard to Cultivar, Time of Collection and Shoot Type. *Acta Hort.* **2008**, 791 PART 2, 459–464. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.791.69>.
- (356) Reglamento (CE) No 1019/2002 de La Comisión de 13 de Junio de 2002 Sobre Las Normas de Comercialización Del Aceite de Oliva LA. **2002**, 27–31.
- (357) Conde, C.; Delrot, S.; Gerós, H. Physiological, Biochemical and Molecular Changes Occurring during Olive Development and Ripening. *J. Plant Physiol.* **2008**, 165 (15), 1545–1562. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.018>.
- (358) Giuliani, A.; Cerretani, L.; Cichelli, A. Chlorophylls in Olive and in Olive Oil: Chemistry and Occurrences. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, 51 (7), 678–690. <https://doi.org/10.1080/10408391003768199>.
- (359) Schwingshackl, L.; Hoffmann, G. Monounsaturated Fatty Acids, Olive Oil and Health Status: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Lipids Health Dis.* **2014**, 13 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-154>.
- (360) Terés, S.; Barceló-Coblijn, G.; Benet, M.; Álvarez, R.; Bressani, R.; Halver, J. E.; Escribá, P. V. Oleic Acid Content Is Responsible for the Reduction in Blood Pressure Induced by Olive Oil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (37), 13811–13816. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807500105>.
- (361) Cheng, P.; Wang, J.; Shao, W. Monounsaturated Fatty Acid Intake and Stroke Risk: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **2016**, 25 (6), 1326–

1334. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.02.017>.
- (362) Parkinson, L.; Cicerale, S. The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules* **2016**, *21* (12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules21121734>.
- (363) Marcelino, G.; Hiane, P. A.; Freitas, K. de C.; Santana, L. F.; Pott, A.; Donadon, J. R.; Guimarães, R. de C. A. Effects of Olive Oil and Its Minor Components on Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota. *Nutrients* **2019**, *11* (8), 4–6. <https://doi.org/10.3390/nu11081826>.
- (364) López-Biedma, A.; Sánchez-Quesada, C.; Delgado-Rodríguez, M.; Gaforio, J. J. The Biological Activities of Natural Lignans from Olives and Virgin Olive Oils: A Review. *J. Funct. Foods* **2016**, *26*, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.005>.
- (365) Sánchez-Quesada, C.; López-Biedma, A.; Warleta, F.; Campos, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J. Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (50), 12173–12182. <https://doi.org/10.1021/jf403154e>.
- (366) Ronco, A. L.; De Stéfani, E. Squalene: A Multi-Task Link in the Crossroads of Cancer and Aging. *Funct. Foods Heal. Dis.* **2013**, *3* (12), 462. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v3i12.30>.
- (367) Fedeli, E. Lipids of Olives. *Prog. Chem. Fats Other Lipids* **1977**, *15* (1), 57–74. [https://doi.org/10.1016/0079-6832\(77\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0079-6832(77)90007-6).
- (368) Kiritsakis, A. K. Flavor Components of Olive Oil - A Review. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75* (6), 673–681. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0205-6>.
- (369) Blekas, G.; Guth, H. Evaluation and Quantification of Potent Odorants of Greek Virgin Olive Oils. *Dev. Food Sci.* **1995**, *37* (C), 419–427. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80169-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80169-X).
- (370) Aparicio, R.; Morales, M. T. Characterization of Olive Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (3), 1116–1122. <https://doi.org/10.1021/jf970540o>.
- (371) Kanavouras, A.; Kiritsakis, A.; Hernandez, R. J. Comparative Study on Volatile Analysis of Extra Virgin Olive Oil by Dynamic Headspace and Solid Phase Micro-Extraction. *Food Chem.* **2005**, *90* (1–2), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.025>.
- (372) Kiralan, M.; Ozkan, G.; Koyluoglu, F.; Ugurlu, H. A.; Bayrak, A.; Kiritsakis, A. Effect of Cultivation Area and Climatic Conditions on Volatiles of Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114* (5), 552–557. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100289>.
- (373) Hassine, K. Ben; Taamalli, A.; Slama, M. Ben; Khoulood, T.; Kiristakis, A.; Benincasa, C.; Perri, E.; Malouche, D.; Hammami, M.; Bornaz, S.; Grati-Kammoun, N. Characterization and Preference Mapping of Autochthonous and Introduced Olive Oil Cultivars in Tunisia. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, *117* (1), 112–121. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400049>.
- (374) Lukić, I.; Lukić, M.; Žanetić, M.; Krapac, M.; Godena, S.; Bubola, K. B. Inter-Varietal Diversity of Typical Volatile and Phenolic Profiles of Croatian Extra Virgin Olive Oils as Revealed by GC-IT-MS and UPLC-DAD Analysis. *Foods* **2019**, *8* (11). <https://doi.org/10.3390/foods8110565>.
- (375) Cecchi, L.; Migliorini, M.; Giambanelli, E.; Rossetti, A.; Cane, A.; Mulinacci, N.; Melani, F. Authentication of the Geographical Origin of Virgin Olive Oils from the Main Worldwide Producing Countries: A New Combination of HS-SPME-GC-MS Analysis of Volatile Compounds and Chemometrics Applied to 1217 Samples. *Food Control* **2020**, *112*



- (November 2019), 107156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107156>.
- (376) Aiello, A.; Guccione, G. D.; Accardi, G.; Caruso, C. What Olive Oil for Healthy Ageing? *Maturitas* **2015**, *80* (2), 117–118. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.10.016>.
- (377) Monfreda, M.; Gobbi, L.; Grippa, A. Blends of Olive Oil and Sunflower Oil: Characterisation and Olive Oil Quantification Using Fatty Acid Composition and Chemometric Tools. *Food Chem.* **2012**, *134* (4), 2283–2290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.122>.
- (378) Servili, M.; Montedoro, G. F. Contribution of Phenolic Compounds to Virgin Olive Oil Quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104* (9–10), 602–613. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X).
- (379) Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G. F.; Morozzi, G. Health and Sensory Properties of Virgin Olive Oil Hydrophilic Phenols: Agronomic and Technological Aspects of Production That Affect Their Occurrence in the Oil. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054* (1–2), 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.070>.
- (380) Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: A Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules* **2007**, *12* (8), 1679–1719. <https://doi.org/10.3390/12081679>.
- (381) Wani, T. A.; Masoodi, F. A.; Gani, A.; Baba, W. N.; Rahmanian, N.; Akhter, R.; Wani, I. A.; Ahmad, M. Olive Oil and Its Principal Bioactive Compound: Hydroxytyrosol – A Review of the Recent Literature. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *77* (September 2017), 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.001>.
- (382) Servili, M.; Sordini, B.; Esposto, S.; Urbani, S.; Veneziani, G.; Di Maio, I.; Selvaggini, R.; Taticchi, A. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants* **2014**, *3* (1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>.
- (383) Zarrouk, W.; Haddada, F. M.; Baccouri, B.; Queslati, I.; Taamalli, W.; Fernandez, X.; Lizzani-Cuvelier, L.; Daoud, D.; Zarrouk, M. Characterization of Virgin Olive Oil from Southern Tunisia. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110* (1), 81–88. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700085>.
- (384) Aparicio, R.; Harwood, J. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*, Second ed.; Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8>.
- (385) Bianco, A.; Buiarelli, F.; Cartoni, G.; Coccioli, F.; Muzzalupo, I.; Polidori, A.; Buiarelli, F.; Coccioli, F.; Muzzalupo, I.; Polidori, A.; Uccella, N. Analysis by HPLC-MS/MS of Biophenolic Components in Olives and Oil. *Anal. Lett.* **2001**, *34* (6), 37–41.
- (386) Christophoridou, S.; Dais, P. Detection and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oil by High Resolution <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *633* (2), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.048>.
- (387) Jolayemi, O. S.; Tokatli, F.; Ozen, B. Effects of Malaxation Temperature and Harvest Time on the Chemical Characteristics of Olive Oils. *Food Chem.* **2016**, *211*, 776–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.134>.
- (388) Becerra-Herrera, M.; Vélez-Martín, A.; Ramos-Merchante, A.; Richter, P.; Beltrán, R.; Sayago, A. Characterization and Evaluation of Phenolic Profiles and Color as Potential Discriminating Features among Spanish Extra Virgin Olive Oils with Protected Designation of Origin. *Food Chem.* **2018**, *241* (November 2016), 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.106>.

- (389) Montedoro, G.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Begliomini, A. L.; Taticchi, A.; Servili, M. Relationships between Phenolic Composition of Olive Fruit and Olive Oil: The Importance of the Endogenous Enzymes. *Acta Hort.* **2002**, 586, 551–556. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.115>.
- (390) Sicari, V.; Giuffrè, A. M.; Louadj, L.; Poiana, M. Evolution of Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil during 12 Months Storage. *Riv. Ital. delle Sostanze Grasse* **2010**, 87 (2), 109–115.
- (391) Brenes, M.; García, A.; García, P.; Garrido, A. Acid Hydrolysis of Secoiridoid Aglycons during Storage of Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (11), 5609–5614. <https://doi.org/10.1021/jf0107860>.
- (392) Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40 (9), 1571–1576. <https://doi.org/10.1021/jf00021a019>.
- (393) Pérez-Trujillo, M.; Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Parella, T. Separation and Identification of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil from *Olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a New Diastereoisomer of the Aldehydic Form of Oleuropein Aglycone. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58 (16), 9129–9136. <https://doi.org/10.1021/jf101847e>.
- (394) Ruiz-Aracama, A.; Goicoechea, E.; Guillén, M. D. Direct Study of Minor Extra-Virgin Olive Oil Components without Any Sample Modification. <sup>1</sup>H NMR Multisuppression Experiment: A Powerful Tool. *Food Chem.* **2017**, 228, 301–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.009>.
- (395) Christophoridou, S.; Dais, P.; Tseng, L. I. H.; Spraul, M. Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (12), 4667–4679. <https://doi.org/10.1021/jf040466r>.
- (396) Mateos, R.; Espartero, J. L.; Trujillo, M.; Ríos, J. J.; León-Camacho, M.; Alcudia, F.; Cert, A. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (5), 2185–2192. <https://doi.org/10.1021/jf0013205>.
- (397) Bianco, A.; Mazzei, R. A.; Melchioni, C.; Romeo, G.; Scarpati, M. L.; Soriero, A.; Uccella, N. Microcomponents of Olive Oil - III. Glucosides of 2(3,4-Dihydroxy-Phenyl)Ethanol. *Food Chem.* **1998**, 63 (4), 461–464. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00064-8).
- (398) Jerman Klen, T.; Golc Wondra, A.; Vrhovšek, U.; Mozetič Vodopivec, B. Phenolic Profiling of Olives and Olive Oil Process-Derived Matrices Using UPLC-DAD-ESI-QTOF-HRMS Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63 (15), 3859–3872. <https://doi.org/10.1021/jf506345q>.
- (399) Rigane, G.; Boukhris, M.; Bouaaziz, M.; Sayadi, S.; Salem, R. Ben. Analytical Evaluation of Two Monovarietal Virgin Olive Oils Cultivated in the South of Tunisia: Jemri-Bouchouka and Chemlali-Tataouin Cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, 93 (5), 1242–1248. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5864>.
- (400) Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J. J.; Garrido, A. Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (9), 3535–3540. <https://doi.org/10.1021/jf990009o>.
- (401) Brenes, M.; Romero, C.; García, A.; Hidalgo, F. J.; Ruiz-Méndez, M. V. Phenolic Compounds

- in Olive Oils Intended for Refining: Formation of 4-Ethylphenol during Olive Paste Storage. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (26), 8177–8181. <https://doi.org/10.1021/jf0402532>.
- (402) De La Torre-Carbot, K.; Jauregui, O.; Gimeno, E.; Castellote, A. I.; Lamuela-Raventós, R. M.; López-Sabater, M. C. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (11), 4331–4340. <https://doi.org/10.1021/jf0501948>.
- (403) Abbattista, R.; Losito, I.; De Ceglie, C.; Castellaneta, A.; Calvano, C. D.; Palmisano, F.; Cataldi, T. R. I. A Comprehensive Study of Oleuropein Aglycone Isomers in Olive Oil by Enzymatic/Chemical Processes and Liquid Chromatography-Fourier Transform Mass Spectrometry Integrated by H/D Exchange. *Talanta* **2019**, 205 (April), 120107. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.07.002>.
- (404) Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clin. Chem.* **2000**, 46 (7), 976–988. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.7.976>.
- (405) Limiroti, R.; Consonni, R.; Ottolina, G.; Marsilio, V.; Bianchi, G.; Zetta, L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Characterization of New Oleuropein Aglycones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, No. 12, 1519–1523. <https://doi.org/10.1039/p19950001519>.
- (406) Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Miniati, E.; Macchioni, A. Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41 (11), 2228–2234. <https://doi.org/10.1021/jf00035a076>.
- (407) Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Corana, F.; Mellerio, G. Characterization of Phenolic and Secoiridoid Aglycons Present in Virgin Olive Oil by Gas Chromatography-Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1996**, 736 (1–2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01375-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01375-X).
- (408) De Nino, A.; Mazzotti, F.; Perri, E.; Procopio, A.; Raffaelli, A.; Sindona, G. Virtual Freezing of the Hemiacetal-Aldehyde Equilibrium of the Aglycones of Oleuropein and Ligstroside Present in Olive Oils from Carolea and Coratina Cultivars by Ionspray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35 (3), 461–467. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200003\)35:3<461::AID-JMS961>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200003)35:3<461::AID-JMS961>3.0.CO;2-E).
- (409) Diamantakos, P.; Velkou, A.; Killday, K. B.; Gimisis, T.; Melliou, E.; Magiatis, P. Oleokoronal and Oleomissional: New Major Phenolic Ingredients of Extra Virgin Olive Oil. *Olivae* **2015**, 122 (August 2016), 22–32.
- (410) Obied, H. K.; Bedgood, D. R.; Prenzler, P. D.; Robards, K. Chemical Screening of Olive Biophenol Extracts by Hyphenated Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 603 (2), 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.044>.
- (411) Tsolakou, A.; Diamantakos, P.; Kalaboki, I.; Mena-Bravo, A.; Priego-Capote, F.; Abdallah, I. M.; Kaddoumi, A.; Melliou, E.; Magiatis, P. Oleocanthalic Acid, a Chemical Marker of Olive Oil Aging and Exposure to a High Storage Temperature with Potential Neuroprotective Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66 (28), 7337–7346. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00561>.
- (412) Angelis, A.; Antoniadis, L.; Stathopoulos, P.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, L. A. Oleocanthalic and Oleaceinic Acids: New Compounds from Extra Virgin Olive Oil (EVOO). *Phytochem. Lett.* **2018**, 26 (June), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.06.020>.
- (413) Brenes, M.; García, A.; Rios, J. J.; García, P.; Garrido, A. Use of 1-Acetoxy-pinorensinol to Authenticate Picual Olive Oils. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, 37 (6), 615–625.

- <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00591.x>.
- (414) Brenes, M.; Hidalgo, F. J.; García, A.; Rios, J. J.; García, P.; Zamora, R.; Garrido, A. Pinoresinol and 1-Acetoxy-pinoresinol, Two New Phenolic Compounds Identified in Olive Oil. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77* (7), 715–720. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0115-4>.
- (415) Taamalli, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Zarrouk, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Determination of Apolar and Minor Polar Compounds and Other Chemical Parameters for the Discrimination of Six Different Varieties of Tunisian Extra-Virgin Olive Oil Cultivated in Their Traditional Growing Area. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231* (6), 965–975. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1350-3>.
- (416) Kalogiouri, N. P.; Alygizakis, N. A.; Aalizadeh, R.; Thomaidis, N. S. Olive Oil Authenticity Studies by Target and Nontarget LC–QTOF-MS Combined with Advanced Chemometric Techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (28), 7955–7970. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9891-3>.
- (417) A. Bianco, F. Coccioli, M. Guiso, C. M. The Occurrence in Olive Oil of a New Class of Phenolic Compounds: Hydroxy-Isochromans. *Food Chem.* **2001**, *77*, 405–411. <https://doi.org/10.1108/03055720010804249>.
- (418) Guiso, M.; Marra, C.; Arcos, R. R. An Investigation on Dihydroxy-Isochromans in Extra Virgin Olive Oil. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22* (16), 1403–1409. <https://doi.org/10.1080/14786410701823942>.
- (419) Angelis, A.; Hamzaoui, M.; Aligiannis, N.; Nikou, T.; Michailidis, D.; Gerolimatos, P.; Termentzi, A.; Hubert, J.; Halabalaki, M.; Renault, J. H.; Skaltsounis, A. L. An Integrated Process for the Recovery of High Added-Value Compounds from Olive Oil Using Solid Support Free Liquid-Liquid Extraction and Chromatography Techniques. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1491*, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.046>.
- (420) Rigakou, A.; Diamantakos, P.; Melliou, E.; Magiatis, P. S-(E)-Elenolide: A New Constituent of Extra Virgin Olive Oil. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99* (12), 5319–5326. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9770>.
- (421) Hatzakis, E.; Dagounakis, G.; Agiomyrgianaki, A.; Dais, P. A Facile NMR Method for the Quantification of Total, Free and Esterified Sterols in Virgin Olive Oil. *Food Chem.* **2010**, *122* (1), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.043>.
- (422) Krichène, D.; Allalout, A.; Salvador, M. D.; Fregapane, G.; Zarrouk, M. Fatty Acids, Volatiles, Sterols and Triterpenic Alcohols of Six Monovarietal Tunisian Virgin Olive Oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112* (3), 400–409. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900095>.
- (423) Aparicio, R.; Luna, G. Characterisation of Monovarietal Virgin Olive Oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104* (9–10), 614–627. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L).
- (424) Benítez-Sánchez, P. L.; León-Camacho, M.; Aparicio, R. A Comprehensive Study of Hazelnut Oil Composition with Comparisons to Other Vegetable Oils, Particularly Olive Oil. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *218* (1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0766-4>.
- (425) Aparicio-Ruiz, R.; García-González, D. L.; Lobo-Prieto, A.; Aparicio, R. Andalusian Protected Designations of Origin of Virgin Olive Oil: The Role of Chemical Composition in Their Authentication. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2019**, *121* (3), 1–9. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800133>.
- (426) Kiosseoglou, B.; Vlachopoulou, I.; Boskou, D. Esterified 4-Monomethyl- and 4,4-Dimethyl-

- Sterols in Some Vegetable Oils. *Grasas y aceites* **1987**, *38* (2), 102–103.
- (427) Murkovic, M.; Lechner, S.; Pietzka, A.; Bratacos, M.; Katzogiannos, E. Analysis of Minor Components in Olive Oil. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *61* (1-2 SPEC. ISS.), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.04.002>.
- (428) Grigoriadou, D.; Androulaki, A.; Psomiadou, E.; Tsimidou, M. Z. Solid Phase Extraction in the Analysis of Squalene and Tocopherols in Olive Oil. *Food Chem.* **2007**, *105* (2), 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.065>.
- (429) Belitz, H. .; Grosch, W.; Schieberle, P. *Food Chemistry (4th Revised and Extended Ed.)*, 4th revise.; Springer Berlin Heidelberg: Germany, 2009; Vol. 0. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (430) Reiter, B.; Lorbeer, E. Analysis of the Wax Ester Fraction of Olive Oil and Sunflower Oil by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78* (9), 881–888. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0359-z>.
- (431) Grob, K.; Lanfranchi, M.; Mariani, C. Evaluation of Olive Oils through the Fatty Alcohols, the Sterols and Their Esters by Coupled LC-GC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67* (10), 626–634. <https://doi.org/10.1007/BF02540412>.
- (432) Reglamento Europeo (Ue) N. **2015**, *31*, 1–99.
- (433) Psomiadou, E.; Tsimidou, M. Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (12), 5132–5138. <https://doi.org/10.1021/jf980250n>.
- (434) Gandul-Rojas, B.; Minguez-Mosquera, M. I. Chlorophyll and Carotenoid Composition in Virgin Olive Oils from Various Spanish Olive Varieties. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *72* (1), 31–39. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199609\)72:1<31::AID-JSFA619>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199609)72:1<31::AID-JSFA619>3.0.CO;2-5).
- (435) Küpper, H.; Dëdic, R.; Svoboda, A.; Hála, J.; Kroneck, P. M. H. Kinetics and Efficiency of Excitation Energy Transfer from Chlorophylls, Their Heavy Metal-Substituted Derivatives, and Pheophytins to Singlet Oxygen. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2002**, *1572* (1), 107–113. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00284-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00284-2).
- (436) Aparicio-Ruiz, R.; Gandul-Rojas, B. Thermal Degradation Kinetics of Neoxanthin, Violaxanthin, and Antheraxanthin in Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (20), 5180–5191. <https://doi.org/10.1021/jf300332m>.
- (437) Peragon, J. Time Course of Pentacyclic Triterpenoids from Fruits and Leaves of Olive Tree (*Olea europaea* L.) Cv. Picual and Cv. Cornezuelo during Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (27), 6671–6678. <https://doi.org/10.1021/jf401495t>.
- (438) Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M. N.; Scheffler, A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants - Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules* **2009**, *14* (6), 2016–2031. <https://doi.org/10.3390/molecules14062016>.
- (439) Stiti, N.; Triki, S.; Hartmann, M. A. Formation of Triterpenoids throughout *Olea europaea* Fruit Ontogeny. *Lipids* **2007**, *42* (1), 55–67. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-3002-8>.
- (440) Xu, H.-X.; Zeng, F.-Q.; Wan, M.; Sim, K.-Y. Anti-HIV Triterpene Acids from Geum Japonicum. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59* (7), 643–645. <https://doi.org/10.1021/np960165e>.
- (441) Alqahtani, A.; Hamid, K.; Kam, A.; Wong, K. H.; Abdelhak, Z.; Razmovski-Naumovski, V.; Chan, K.; Li, K. M.; Groundwater, P. W.; Li, G. Q. The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal

- Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 908–931.
- (442) Rodríguez-Rodríguez, R. Oleanolic Acid and Related Triterpenoids from Olives on Vascular Function: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22* (11), 1414–1425. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141212122921>.
- (443) Patlolla, J. M. R.; Rao, C. V. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13* (1), 147–155. <https://doi.org/10.2174/138920112798868719>.
- (444) Kaeidi, A.; Esmaeili-Mahani, S.; Sheibani, V.; Abbasnejad, M.; Rasoulilian, B.; Hajializadeh, Z.; Afrazi, S. Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Attenuates Early Diabetic Neuropathic Pain through Prevention of High Glucose-Induced Apoptosis: In Vitro and in Vivo Studies. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *136* (1), 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.038>.
- (445) Wang, X.; Li, Y. L.; Wu, H.; Liu, J. Z.; Hu, J. X.; Liao, N.; Peng, J.; Cao, P. P.; Liang, X.; Hai, C. X. Antidiabetic Effect of Oleanolic Acid: A Promising Use of a Traditional Pharmacological Agent. *Phyther. Res.* **2011**, *25* (7), 1031–1040. <https://doi.org/10.1002/ptr.3385>.
- (446) Liby, K. T.; Yore, M. M.; Sporn, M. B. Triterpenoids and Rexinoids as Multifunctional Agents for the Prevention and Treatment of Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (5), 357–369. <https://doi.org/10.1038/nrc2129>.
- (447) Andre, C. M.; Greenwood, J. M.; Walker, E. G.; Rassam, M.; Sullivan, M.; Evers, D.; Perry, N. B.; Laing, W. A. Anti-Inflammatory Procyanidins and Triterpenes in 109 Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (42), 10546–10554. <https://doi.org/10.1021/jf302809k>.
- (448) Wang, W. H.; Chuang, H. Y.; Chen, C. H.; Chen, W. K.; Hwang, J. J. Lupeol Acetate Ameliorates Collagen-Induced Arthritis and Osteoclastogenesis of Mice through Improvement of Microenvironment. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *79* (155), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.010>.
- (449) Razboršek, M. I.; Vončina, D. B.; Doleček, V.; Vončina, E. Determination of Oleanolic, Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and Mass Spectral Fragmentation of Their Trimethylsilylated Derivatives. *Chromatographia* **2008**, *67* (5–6), 433–440. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0533-6>.
- (450) Siddiqui, B. S.; Aslam, H.; Ali, S. T.; Begum, S.; Khatoon, N. Two New Triterpenoids and a Steroidal Glycoside from the Aerial Parts of *Ocimum Basilicum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55* (4), 516–519. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.516>.
- (451) Guinda, Á.; Rada, M.; Delgado, T.; Gutiérrez-Adán, P.; Castellano, J. M. Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (17), 9685–9691. <https://doi.org/10.1021/jf102039t>.
- (452) Bianchi, G.; Pozzi, N.; Vlahov, G. Pentacyclic Triterpene Acids in Olives. *Phytochemistry* **1994**, *37* (1), 205–207. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85026-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85026-7).
- (453) Olmo-García, L.; Bajoub, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Carrasco-Pancorbo, A. Evaluating the Potential of LC Coupled to Three Alternative Detection Systems (ESI-IT, APCI-TOF and DAD) for the Targeted Determination of Triterpenic Acids and Dialcohols in Olive Tissues. *Talanta* **2016**, *150*, 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.042>.
- (454) Sánchez-Ávila, N.; Priego-Capote, F.; Ruiz-Jiménez, J.; Luque de Castro, M. D. Fast and Selective Determination of Triterpenic Compounds in Olive Leaves by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Multiple Reaction Monitoring after Microwave-Assisted Extraction. *Talanta* **2009**, *78* (1), 40–48.

- <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.037>.
- (455) Pérez-Camino, M. C.; Cert, A. Quantitative Determination of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids in Vegetable Oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (4), 1558–1562. <https://doi.org/10.1021/jf980881h>.
- (456) Allouche, Y.; Jiménez, A.; Uceda, M.; Aguilera, M. P.; Gaforio, J. J.; Beltrán, G. Triterpenic Content and Chemometric Analysis of Virgin Olive Oils from Forty Olive Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (9), 3604–3610. <https://doi.org/10.1021/jf803237z>.
- (457) Valls, J.; Millán, S.; Martí, M. P.; Borràs, E.; Arola, L. Advanced Separation Methods of Food Anthocyanins, Isoflavones and Flavanols. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (43), 7143–7172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.030>.
- (458) Yeap Foo, L.; Karchesy, J. J. Polyphenolic Glycosides from Douglas Fir Inner Bark. *Phytochemistry* **1989**, *28* (4), 1237–1240. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80217-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80217-1).
- (459) Moore, B. S.; Floss, H. G.; Poralla, K. Biosynthesis of the Cyclohexanecarboxylic Acid Starter Unit of  $\omega$ -Cyclohexyl Fatty Acids in *Alicyclobacillus Acidocaldarius*. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (12), 5267–5274. <https://doi.org/10.1021/ja00065a043>.
- (460) Nonaka, G. I.; Nishioka, I.; Goto, Y.; Kinjo, J. E.; Nohara, T. Tannins and Related Compounds. LII.1) Studies on the Constituents of the Leaves of *Thujopsis Dolabrata* SIEB. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35* (3), 1105–1108. <https://doi.org/10.1248/cpb.35.1105>.
- (461) Zhang, X. F.; Tran, M. H.; Phuong, T. P.; Tran, M. N.; Min, B. S.; Song, K. S.; Yeon, H. S.; Bae, K. H. Anti-Inflammatory Activity of Flavonoids from *Populus Davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29* (12), 1102–1108. <https://doi.org/10.1007/BF02969299>.
- (462) Rayyan, S.; Fossen, T.; Solheim Nateland, H.; Andersen, M. Isolation and Identification of Flavonoids, Including Flavone Rotamers, from the Herbal Drug “Crateagi Folium Cum Flore” (Hawthorn). *Phytochem. Anal.* **2005**, *16* (5), 334–341. <https://doi.org/10.1002/pca.853>.
- (463) Bastos, C.; Barros, L.; Dueñas, M.; Calhelha, R. C.; Queiroz, M. J. R. P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. Chemical Characterisation and Bioactive Properties of *Prunus avium* L.: The Widely Studied Fruits and the Unexplored Stems. *Food Chem.* **2015**, *173*, 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.145>.
- (464) Yoshinari, K.; Shimazaki, N.; Sashida, Y.; Mimaki, Y. Flavanone Xyloside and Lignans from *Prunus Jamasakura* Bark. *Phytochemistry* **1990**, *29* (5), 1675–1678. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80144-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80144-6).
- (465) Agulló-Chazarra, L.; Borrás-Linares, I.; Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Micol, V.; Herranz-López, M.; Barrajón-Catalán, E. Sweet Cherry Byproducts Processed by Green Extraction Techniques as a Source of Bioactive Compounds with Antiaging Properties. *Antioxidants* **2020**, *9* (5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antiox9050418>.
- (466) Khan, M. K.; Rakotomanomana, N.; Loonis, M.; Dangles, O. Chemical Synthesis of Citrus Flavanone Glucuronides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (14), 8437–8443. <https://doi.org/10.1021/jf1010403>.
- (467) Ibrahim, A. R. S.; Galal, A. M.; Ahmed, M. S.; Mossa, G. S. O-Demethylation and Sulfation of 7-Methoxylated Flavanones by *Cunninghamella Elegans*. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51* (2), 203–206. <https://doi.org/10.1248/cpb.51.203>.
- (468) Yenjai, C.; Wanich, S.; Pitchuanom, S.; Sripanidkulchai, B. Structural Modification of 5,7-Dimethoxyflavone from *Kaempferia Parviflora* and Biological Activities. *Arch. Pharm. Res.*

- 2009**, 32 (9), 1179–1184. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1900-z>.
- (469) Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B.; Yenjai, C.; Jay, M. Simultaneous Identification and Quantitation of 11 Flavonoid Constituents in *Kaempferia Parviflora* by Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1143 (1–2), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.033>.
- (470) Tomohara, K.; Ito, T.; Onikata, S.; Kato, A.; Adachi, I. Discovery of Hyaluronidase Inhibitors from Natural Products and Their Mechanistic Characterization under DMSO-Perturbed Assay Conditions. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (7), 1620–1623. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.083>.
- (471) Smailagić, A.; Veljović, S.; Gašić, U.; Zagorac, D. D.; Stanković, M.; Radotić, K.; Natić, M. Phenolic Profile, Chromatic Parameters and Fluorescence of Different Woods Used in Balkan Cooperage. *Ind. Crops Prod.* **2019**, 132 (February), 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.017>.
- (472) Pacheco, H. Structure of a Glycoside of Aromadendrin Extracted from the Sapwood of *Prunus Mahaleb* and *P. Persica Vulgaris*. *Compt. rend.* **1960**, 251, 1653–1654.
- (473) Treutter, D.; Feucht, W.; Schmid, P. P. S. Ageing-Dependent Responses of Phloem Flavonoids of *Prunus avium* Graftings: Flavanone-, Flavone- and Isoflavone-Glucosides. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **1987**, 32 (3–4), 183–193. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(87\)90085-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(87)90085-9).
- (474) Bayer, O. Influence of Different Phenolic Compounds Derived from Bark of Sweet Cherry on in Vitro Growth of Two Bark Pathogens. *Gartenbauwissenschaft* **1989**, 54, 138–141.
- (475) Matias, A. A.; Rosado-Ramos, R.; Nunes, S. L.; Figueira, I.; Serra, A. T.; Bronze, M. R.; Santos, C. N.; Duarte, C. M. M. Protective Effect of a (Poly)Phenol-Rich Extract Derived from Sweet Cherries Culls against Oxidative Cell Damage. *Molecules* **2016**, 21 (4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules21040406>.
- (476) Salehi, B.; Fokou, P. V. T.; Sharifi-Rad, M.; Zucca, P.; Pezzani, R.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals* **2019**, 12 (1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ph12010011>.
- (477) Nishina, A.; Sato, D.; Yamamoto, J.; Kobayashi-Hattori, K.; Hirai, Y.; Kimura, H. Antidiabetic-Like Effects of Naringenin-7-O-Glucoside from Edible Chrysanthemum 'Kotobuki' and Naringenin by Activation of the PI3K/Akt Pathway and PPAR $\gamma$ . *Chem. Biodivers.* **2019**, 16 (1). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800434>.
- (478) Hou, X.; Du, H.; Yang, R.; Qi, J.; Huang, Y.; Feng, S.; Wu, Y.; Lin, S.; Liu, Z.; Jia, A. Q.; Yuan, S.; Sun, L. The Antitumor Activity Screening of Chemical Constituents from *Camellia Nitidissima* Chi. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, 41 (5), 2793–2801. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3502>.
- (479) Fischer, A.; Sellner, M.; Neranjan, S.; Smieško, M.; Lill, M. A. Potential Inhibitors for Novel Coronavirus Protease Identified by Virtual Screening of 606 Million Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21103626>.
- (480) Bravo, M. N.; Silva, S.; Coelho, A. V.; Boas, L. V.; Bronze, M. R. Analysis of Phenolic Compounds in Muscatel Wines Produced in Portugal. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563 (1–2 SPEC. ISS.), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.054>.
- (481) Singh, A. K.; Pathak, V.; Agrawal, P. K. Annphenone, a Phenolic Acetophenone from *Artemisia Annua*. *Phytochemistry* **1997**, 44 (3), 555–557. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00424-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00424-4).
- (482) Lee, I. S.; Yu, S. Y.; Jung, S. H.; Lee, Y. R.; Lee, Y. M.; Kim, J. H.; Sun, H.; Kim, J. S.



- Proanthocyanidins from *Spenceria Ramalana* and Their Effects on AGE Formation in Vitro and Hyaloid-Retinal Vessel Dilation in Larval Zebrafish in Vivo. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76 (10), 1881–1888. <https://doi.org/10.1021/np400442b>.
- (483) Sharma, P. K.; Romanczyk, L. J.; Kondaveti, L.; Reddy, B.; Arumugasamy, J.; Lombardy, R.; Gou, Y.; Schroeter, H. Total Synthesis of Proanthocyanidin A1, A2, and Their Stereoisomers. *Org. Lett.* **2015**, 17 (10), 2306–2309. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b00646>.
- (484) Prasad, D. Two A-Type Proanthocyanidins from *Prunus Armeniaca* Roots. *Fitoterapia* **2000**, 71 (3), 245–253. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00165-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00165-3).
- (485) Calzada, F.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R.; Bye, R.; Mata, R. Geranins A and B, New Antiprotozoal A-Type Proanthocyanidins from *Geranium Niveum*. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62 (5), 705–709. <https://doi.org/10.1021/np980467b>.
- (486) Kashiwada, Y.; Morita, M.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Tannins and Related Compounds.XCI.: Isolation and Characterization of Proanthocyanidins with an Intramolecularly Doubly-Linked Unit from the Fern, *Dicranopteris Pedata* HOUTT. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1990**, 38 (4), 856–860. <https://doi.org/10.1248/cpb.38.856>.
- (487) Zhang, Y. J.; Tanaka, T.; Iwamoto, Y.; Yang, C. R.; Kouno, I. Novel Norsesquiterpenoids from the Roots of *Phyllanthus Emblica*. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63 (11), 1507–1510. <https://doi.org/10.1021/np000135i>.
- (488) Pant, G.; Nautiyal, A. K.; Rawat, M. S. M.; Sutherland, J. K.; Morris, G. A. Identification and Ab Initio Carbon-13 NMR Assignment of a Proanthocyanidin from *Prunus Jacquemontii*. *Magn. Reson. Chem.* **1992**, 30 (13), S142–S147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrc.1260301323>.
- (489) Rawat, M. S. M.; Prasad, D.; Joshi, R. K.; Pant, G. Proanthocyanidins from *Prunus Armeniaca* Roots. *Phytochemistry* **1999**, 50 (2), 321–324. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00541-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00541-X).
- (490) Prasad, D. A New Aromatic Glycoside from the Roots of *Prunus Armeniaca*. *Fitoterapia* **1999**, 70 (3), 266–268. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00032-5).
- (491) Irizar, A. C.; Fernandez, M. F.; González, A. G.; Ravelo, A. G. Constituents of *Prunus spinosa*. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55 (4), 450–454. <https://doi.org/10.1021/np50082a008>.
- (492) G. González, A.; Crespo Irizar, A.; Ravelo, A. G.; Fernández Fernández, M. Type a Proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry* **1992**, 31 (4), 1432–1434. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80312-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80312-3).
- (493) Rawat, M. S. M.; Pant, G.; Prasad, D.; Joshi, R. K.; Pande, C. B. Plant Growth Inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, 26 (1), 13–23. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(97\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00080-X).
- (494) Bilia, A. R.; Morelli, I.; Hamburger, M.; Hostettmann, K. Flavans and A-Type Proanthocyanidins from *Prunus prostrata*. *Phytochemistry* **1996**, 43 (4), 887–892. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00291-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00291-9).
- (495) Baldé, A. M.; Pieters, L. A.; Wray, V.; Kolodziej, H.; Berghe, D. A. V.; Claeys, M.; Vlietinck, A. J. Dimeric and Trimeric Proanthocyanidins Possessing a Doubly Linked Structure from *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry* **1991**, 30 (12), 4129–4135. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83480-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83480-9).
- (496) Hikino, H.; Shimayana, N.; Kasahara, Y.; Takahashi, M.; Konno, C. Structures of Mahuannin A and B, Hypotensive Principles of Ephedra Roots. *Heterocycles* **1982**, 19 (8), 10–13.

- (497) Phuwapraisirisan, P.; Sowanthip, P.; Miles, D. H.; Tip-Pyang, S. Reactive Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibition of Proanthocyanidins from *Carallia Brachiata*. *Phyther. Res.* **2006**, 20 (6), 458–461. <https://doi.org/10.1002/ptr.1877>.
- (498) Fang, L.; Geng, W.; Zhou, J.; Cao, R.; Wang, Z.; Li, J.; Geng, Y. Preparative Separation and Purification of Flavonoids from *Ephedra sinica* Stapf. by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Asian J. Chem.* **2015**, 27 (2), 517–520. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2015.17007>.
- (499) Hartisch, C.; Kolodziej, H.; Von Bruchhausen, F. Dual Inhibitory Activities of Tannins from Hamamelis Virginiana and Related Polyphenols on 5-Lipoxygenase and Lyso-PAF: Acetyl-CoA Acetyltransferase. *Planta Med.* **1997**, 63 (2), 106–110. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957623>.
- (500) Wang, A.; Gao, X.; Huo, X.; Huang, S.; Feng, L.; Sun, C.; Zhang, B.; Ma, X.; Jia, J.; Wang, C. Antioxidant Acetophenone Glycosides from the Roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata. *Nat. Prod. Res.* **2018**, 32 (18), 2187–2192. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1371160>.
- (501) Huang, S. S.; Li, P.; Zhang, B. J.; Deng, S.; Zhang, H. L.; Sun, C. P.; Huo, X. K.; Tian, X. G.; Ma, X. C.; Wang, C. Acetophenone Glycosides from the Roots of *Euphorbia Fischeriana* and Their Inhibitory Effects against Mycobacterium Smegmatis. *Phytochem. Lett.* **2017**, 19, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.032>.
- (502) Zhao, Y.; Geng, C. A.; Chen, H.; Ma, Y. B.; Huang, X. Y.; Cao, T. W.; He, K.; Wang, H.; Zhang, X. M.; Chen, J. J. Isolation, Synthesis and Anti-Hepatitis B Virus Evaluation of p-Hydroxyacetophenone Derivatives from *Artemisia Capillaris*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (7), 1509–1514. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.02.024>.
- (503) Long, A.; Fu, J.; Hu, Y.; Luo, Y. Annphenone from *Artemisia Vestita* inhibits HepG2 Cell Proliferation. *Asian J. Chem.* **2013**, 25 (17), 9497–9502. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.15043>.
- (504) Ding, Y.; Liang, C.; Yang, S. Y.; Ra, J. C.; Choi, E. M.; Kim, J. A.; Ho Kim, Y. Phenolic Compounds from *Artemisia iwayomogi* and Their Effects on Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, 33 (8), 1448–1453. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1448>.
- (505) Shin, J. S.; Kang, K. A.; Kim, E. S.; Zhang, R.; Piao, M. J.; Ko, D. O.; Wang, Z. H.; Maeng, Y. H.; Eun, S. Y.; Chae, S.; Chung, H. S.; Hyun, J. W. Cytoprotective Activity of Annphenone against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in V79-4 Lung Fibroblast Cells. *Cell Biol. Int.* **2008**, 32 (9), 1099–1107. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.04.022>.
- (506) Jamróz, M. K. D.; Kaźmierski, S.; Stefaniak, K.; Gliński, V. B.; Gliński, J. A. Conformational Equilibria in Selected A-Type Trimeric Procyanidins. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (48), 9837–9844. <https://doi.org/10.1039/c4ob02086c>.
- (507) Kamiya, K.; Watanabe, C.; Endang, H.; Umar, M.; Satake, T. Studies on the Constituents of Bark of *Parameria Laevigata* Moldenke. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49 (5), 551–557. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.551>.
- (508) Lou, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Uchida, M.; Tanaka, H.; Oka, S. A-Type Proanthocyanidins from Peanut Skins. *Phytochemistry* **1999**, 51 (2), 297–308. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00736-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00736-5).
- (509) Sun, B.; Belchior, G. P.; Ricardo-Da-Silva, J. M.; Spranger, M. I. Isolation and Purification of Dimeric and Trimeric Procyanidins from Grape Seeds. *J. Chromatogr. A* **1999**, 841 (1), 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00281-2).
- (510) Verstraeten, S. V.; Hammerstone, J. F.; Keen, C. L.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. Antioxidant and

- Membrane Effects of Procyanidin Dimers and Trimers Isolated from Peanut and Cocoa. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (12), 5041–5048. <https://doi.org/10.1021/jf058018m>.
- (511) Jayaprakasha, G. K.; Ohnishi-Kameyama, M.; Ono, H.; Yoshida, M.; Rao, L. J. Phenolic Constituents in the Fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (5), 1672–1679. <https://doi.org/10.1021/jf052736r>.
- (512) Killday, K. B.; Davey, M. H.; Glinski, J. A.; Duan, P.; Veluri, R.; Proni, G.; Daugherty, F. J.; Tempesta, M. S. Bioactive A-Type Proanthocyanidins from *Cinnamomum cassia*. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74 (9), 1833–1841. <https://doi.org/10.1021/np1007944>.
- (513) Morimoto, S.; Nonaka, G.-I.; Chen, R.-F.; Nishioka, I. Tannins and Related Compounds. LXI.<sup>1)</sup> Isolation and Structures of Novel Bi- and Triflavanoids from the Leaves of *Cassia fistula* L. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36 (1), 39–47. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.39>.
- (514) Oldoni, T. L. C.; Melo, P. S.; Massarioli, A. P.; Moreno, I. A. M.; Bezerra, R. M. N.; Rosalen, P. L.; Da Silva, G. V. J.; Nascimento, A. M.; Alencar, S. M. Bioassay-Guided Isolation of Proanthocyanidins with Antioxidant Activity from Peanut (*Arachis hypogaea*) Skin by Combination of Chromatography Techniques. *Food Chem.* **2016**, 192, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.004>.
- (515) Wu, B. X.; Zhang, X.; Zhu, G. L.; Yang, X. Q.; Liu, Y.; Zhang, Y. J.; Zhao, P. Phenolic Compounds and Triterpenes from the Roots of *Vaccinium dunalianum* Wight and Their Chemotaxonomic Significance. *Biochem. Syst. Ecol.* **2021**, 95 (January), 104228. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104228>.
- (516) Wang, Q. Q.; Gao, H.; Yuan, R.; Han, S.; Li, X. X.; Tang, M.; Dong, B.; Li, J. X.; Zhao, L. C.; Feng, J.; Yang, S. Procyanidin A2, a Polyphenolic Compound, Exerts Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activity in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells. *PLoS One* **2020**, 15 (8 August), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237017>.
- (517) Ma, Y.; Kosińska-Cagnazzo, A.; Kerr, W. L.; Amarowicz, R.; Swanson, R. B.; Pegg, R. B. Separation and Characterization of Phenolic Compounds from Dry-Blanched Peanut Skins by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1356, 64–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.027>.
- (518) Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L. Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (25), 7513–7521. <https://doi.org/10.1021/jf034815d>.
- (519) Foo, L. Y.; Lu, Y.; Howell, A. B.; Vorsa, N. The Structure of Cranberry Proanthocyanidins Which Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated *Escherichia coli* in Vitro. *Phytochemistry* **2000**, 54 (2), 173–181. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00573-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00573-7).
- (520) Peragon, J. Time Course of Pentacyclic Triterpenoids from Fruits and Leaves Of Olive Tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo During Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 6671–6678. <https://doi.org/10.1021/jf401495t>.
- (521) Reyes-Zurita, F. J.; Rufino-Palomares, E. E.; Medina, P. P.; Leticia García-Salguero, E.; Peragón, J.; Cascante, M.; Lupiáñez, J. A. Antitumour Activity on Extrinsic Apoptotic Targets of the Triterpenoid Maslinic Acid in P53-Deficient Caco-2 Adenocarcinoma Cells. *Biochimie* **2013**, 95 (11), 2157–2167. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.017>.
- (522) Jiménez-Herrera, R.; Pacheco-López, B.; Peragón, J. Water Stress, Irrigation and Concentrations of Pentacyclic Triterpenes and Phenols in *Olea europaea* L. Cv. Picual Olive Trees. *Antioxidants* **2019**, 8 (8). <https://doi.org/10.3390/antiox8080294>.

- (523) Bianchi, G.; Vlahov, G.; Anglani, C.; Murelli, C. Epicuticular Wax of Olive Leaves. *Phytochemistry* **1992**, 32 (1), 49–52. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80104-M](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80104-M).
- (524) Consejo Oleíco Internacional (COI). Determinación de Los Biofenoles de Los Aceites de Oliva Mediante HPLC. *COI/T.20/Doc.nº29* **2009**, 1–8.
- (525) Karkoula, E.; Skantzari, A.; Melliou, E.; Magiatis, P. Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative  $^1\text{H}$  NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (47), 11696–11703. <https://doi.org/10.1021/jf3032765>.
- (526) Karkoula, E.; Melliou, E.; Magiatis, P.; Demopoulos, V.; Karkoula, E.; Magiatis, P.; Melliou, E.; Kotsiras, A.; Mouroutoglou, C.; Skantzari, A.; Melliou, E.; Magiatis, P.; Angelis, A.; Koulakiotis, N. S.; Gikas, E.; Halabalaki, M.; Tsarbopoulos, A.; Skaltsounis, A. L.; Skantzari, A.; Melliou, E.; Magiatis, P. Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (1), 600–607.
- (527) Vougiannopoulou, K.; Lemus, C.; Halabalaki, M.; Pergola, C.; Werz, O.; Smith, A. B.; Michel, S.; Skaltsounis, L.; Deguin, B. One-Step Semisynthesis of Oleacein and the Determination as a 5-Lipoxygenase Inhibitor. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77 (3), 441–445. <https://doi.org/10.1021/np401010x>.
- (528) He, Z. D.; But, P. P. H.; Chan, T. W. D.; Dong, H.; Xu, H. X.; Lau, C. P.; Sun, H. D. Antioxidative Glucosides from the Fruits of *Ligustrum lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49 (6), 780–784. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.780>.
- (529) Damtoft, S.; Franzzyk, H.; Jensen, S. R. Excelsioside, a Secoiridoid Glucoside from *Fraxinus excelsior*. *Phytochemistry* **1992**, 31 (12), 4197–4201. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80442-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80442-H).
- (530) Miho, H.; Díez, C. M.; Mena-Bravo, A.; Sánchez de Medina, V.; Moral, J.; Melliou, E.; Magiatis, P.; Rallo, L.; Barranco, D.; Priego-Capote, F. Cultivar Influence on Variability in Olive Oil Phenolic Profiles Determined through an Extensive Germplasm Survey. *Food Chem.* **2018**, 266 (June), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.002>.
- (531) Nardi, M.; Bonacci, S.; De Luca, G.; Maiuolo, J.; Oliverio, M.; Sindona, G.; Procopio, A. Biomimetic Synthesis and Antioxidant Evaluation of 3,4-DHPEA-EDA [2-(3,4-Hydroxyphenyl) Ethyl (3S,4E)-4-Formyl-3-(2-Oxoethyl)Hex-4-Enoate]. *Food Chem.* **2014**, 162, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.015>.
- (532) Mason, J. D.; Murphree, S. S. Microwave-Assisted Aqueous Krapcho Decarboxylation. *Synlett* **2013**, 24 (11), 1391–1394. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338701>.
- (533) Fernández-Bolaños, J. M.; Maya-Castilla, I.; González-Benjumea, A. Use of DMSO for the Synthesis of Oleacein and Oleocanthal. WO 2018162769, 2018.
- (534) Costanzo, P.; Bonacci, S.; Cariati, L.; Nardi, M.; Oliverio, M.; Procopio, A. Simple and Efficient Sustainable Semi-Synthesis of Oleacein [2-(3,4-Hydroxyphenyl) Ethyl (3S,4E)-4-Formyl-3-(2-Oxoethyl)Hex-4-Enoate] as Potential Additive for Edible Oils. *Food Chem.* **2018**, 245 (July 2017), 410–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.097>.
- (535) Sarikaki, G.; Christoforidou, N.; Gaboriaud-Kolar, N.; Smith, A. B.; Kostakis, I. K.; Skaltsounis, A. L. Biomimetic Synthesis of Oleocanthal, Oleacein, and Their Analogues Starting from Oleuropein, A Major Compound of Olive Leaves. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83 (6), 1735–1739. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00086>.
- (536) Wen, X.; Walle, T. Methylated Flavonoids Have Greatly Improved Intestinal Absorption and Metabolic Stability. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34 (10), 1786–1792. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.011122>.

- (537) Koirala, N.; Thuan, N. H.; Ghimire, G. P.; Thang, D. Van; Sohng, J. K. Methylation of Flavonoids: Chemical Structures, Bioactivities, Progress and Perspectives for Biotechnological Production. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *86*, 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.003>.
- (538) Wen, L.; Jiang, Y.; Yang, J.; Zhao, Y.; Tian, M.; Yang, B. Structure, Bioactivity, and Synthesis of Methylated Flavonoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc. June 1, 2017, pp 120–129. <https://doi.org/10.1111/nyas.13350>.
- (539) During, A.; Larondelle, Y. The O-Methylation of Chrysin Markedly Improves Its Intestinal Anti-Inflammatory Properties: Structure-Activity Relationships of Flavones. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 1739–1746. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.003>.
- (540) Si, C. L.; Zhang, Y.; Zhu, Z. Y.; Xu, J.; Kim, J. K.; Bae, Y. S. Isolation and Structure Elucidation of Secoiridoid Glucosides from *Fraxinus Rhynchophylla* Leaves. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45* (6), 814–816. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9498-4>.
- (541) Samara, P.; Christoforidou, N.; Lemus, C.; Argyropoulou, A.; Ioannou, K.; Vougiotiannopoulou, K.; Aligiannis, N.; Paronis, E.; Gaboriaud-Kolar, N.; Tsitsilonis, O.; Skaltsounis, A. L. New Semi-Synthetic Analogs of Oleuropein Show Improved Anticancer Activity in Vitro and in Vivo. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *137*, 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.029>.
- (542) Berg, R.; Bergman, J. Synthesis of Thieno[2,3-b]Indole-2,3-Diones and Their Ring Expansions Induced by Diazomethane. *Tetrahedron* **2017**, *73* (38), 5654–5658. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.07.059>.
- (543) Kaumanns, O.; Lucius, R.; Mayr, H. Determination of the Electrophilicity Parameters of Diethyl Benzyldenemalonates in Dimethyl Sulfoxide: Reference Electrophiles for Characterizing Strong Nucleophiles. *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14* (31), 9675–9682. <https://doi.org/10.1002/chem.200801277>.
- (544) Fan, R.; Wang, W.; Pu, D.; Wu, J. Tandem Knoevenagel-Michael Addition of Aryl Sulfonimines with Diethyl Malonate for Synthesis of Arylidene Dimalonates. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (15), 5905–5907. <https://doi.org/10.1021/jo070726e>.
- (545) Kukla, M. J.; Breslin, H. J.; Gill, A. Antihypertensive Dihydropyridines with 1,4,4-Trisubstitution. *J. Med. Chem.* **1990**, *33* (1), 223–228. <https://doi.org/10.1021/jm00163a037>.
- (546) Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>.
- (547) Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82* (4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.
- (548) Tungmunthum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yangsabai, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* **2018**, *5* (3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>.
- (549) Pokorny, J.; Yanishlieva-Maslarova, N. V.; Gordon, M. H. *Antioxidantes de Los Alimentos. Aplicaciones Prácticas*; Acirbia: Zaragoza, 2001.
- (550) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- (551) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate

- Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, 28 (1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- (552) Klancnik, A.; Guzej, B.; Kolar, M. H.; Abramovic, H.; Mozina, S. S. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations. *J. Food Prot.* **2009**, 72 (8), 1744–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1744>.
- (553) Zaouali, Y.; Bouzaine, T.; Boussaid, M. Essential Oils Composition in Two *Rosmarinus Officinalis* L. Varieties and Incidence for Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48 (11), 3144–3152. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.010>.
- (554) Grzegorzczak, I.; Matkowski, A.; Wysokińska, H. Antioxidant Activity of Extracts from in Vitro Cultures of *Salvia Officinalis* L. *Food Chem.* **2007**, 104 (2), 536–541. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.003>.
- (555) Farhat, M. Ben; Jordán, M. J.; Chaouech-Hamada, R.; Landoulsi, A.; Sotomayor, J. A. Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Tunisian Cultivated *Salvia Officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (21), 10349–10356. <https://doi.org/10.1021/jf901877x>.
- (556) Stanković, M. S.; Radić, Z. S.; Blanco-Salas, J.; Vázquez-Pardo, F. M.; Ruiz-Téllez, T. Screening of Selected Species from Spanish Flora as a Source of Bioactive Substances. *Ind. Crops Prod.* **2017**, 95, 493–501. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.070>.
- (557) Argoti, J. C.; Salido, S.; Linares-Palomino, P. J.; Ramírez, B.; Insuasty, B.; Altarejos, J. Antioxidant Activity and Free Radical-Scavenging Capacity of a Selection of Wild-Growing Colombian Plants. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, 91 (13), 2399–2406. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4476>.
- (558) Noferi, M.; Masson, E.; Merlin, A.; Pizzi, A.; Deglise, X. Antioxidant Characteristics of Hydrolysable and Polyflavonoid Tannins: An ESR Kinetics Study. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, 63 (4), 475–482. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4628\(19970124\)63:4<475::aid-app9>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(19970124)63:4<475::aid-app9>3.0.co;2-o).
- (559) Ortega-Vidal, J.; Cobo, A.; Ortega-Morente, E.; Gálvez, A.; Alejo-Armijo, A.; Salido, S.; Altarejos, J.; alvez, A. G.; ia Salido, S.; in Altarejos, J. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Flavonoids Isolated from Wood of Sweet Cherry Tree (*Prunus avium* L.). *J. Wood Chem. Technol.* **41** (3), 104–117. <https://doi.org/10.1080/02773813.2021.1910712>.
- (560) Hyperoxaluria, Primary - List Results - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Hyperoxaluria%2C+Primary&term=&cntry=&state=&city=&dist=> (accessed May 22, 2021).
- (561) Salido, E.; Pey, A. L.; Rodriguez, R.; Lorenzo, V. Primary Hyperoxalurias: Disorders of Glyoxylate Detoxification. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2012**, 1822 (9), 1453–1464. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.03.004>.
- (562) Martín-Higueras, C.; Torres, A.; Salido, E. Molecular Therapy of Primary Hyperoxaluria. *J. Inher. Metab. Dis.* **2017**, 40 (4), 481–489. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0045-3>.
- (563) Martín-Higueras, C.; Luis-Lima, S.; Salido, E. Glycolate Oxidase Is a Safe and Efficient Target for Substrate Reduction Therapy in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type I. *Mol. Ther.* **2016**, 24 (4), 719–725. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.224>.
- (564) Lai, C.; Pursell, N.; Gierut, J.; Saxena, U.; Zhou, W.; Dills, M.; Diwanji, R.; Dutta, C.; Koser, M.; Nazef, N.; Storr, R.; Kim, B.; Martín-Higueras, C.; Salido, E.; Wang, W.; Abrams, M.; Dudek, H.; Brown, B. D. Specific Inhibition of Hepatic Lactate Dehydrogenase Reduces Oxalate Production in Mouse Models of Primary Hyperoxaluria. *Mol. Ther.* **2018**, 26 (8), 1983–

1995. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.016>.
- (565) Kletzmayer, A.; Ivarsson, M. E.; Leroux, J. C. Investigational Therapies for Primary Hyperoxaluria. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (7), 1696–1707. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00268>.
- (566) Moya-Garzon, M. D.; Gomez-Vidal, J. A.; Alejo-Armijo, A.; Altarejos, J.; Rodriguez-Madoz, J. R.; Fernandes, M. X.; Salido, E.; Salido, S.; Diaz-Gavilan, M. Small Molecule-Based Enzyme Inhibitors in the Treatment of Primary Hyperoxalurias. *J. Pers. Med.* **2021**, *11* (2), 1–31. <https://doi.org/10.3390/jpm11020074>.
- (567) Moya-Garzón, M. D.; Martín Higuera, C.; Peñalver, P.; Romera, M.; Fernandes, M. X.; Franco-Montalbán, F.; Gómez-Vidal, J. A.; Salido, E.; Díaz-Gavilán, M. Salicylic Acid Derivatives Inhibit Oxalate Production in Mouse Hepatocytes with Primary Hyperoxaluria Type 1. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (16), 7144–7167. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00399>.
- (568) Rani, R.; Kumar, V. Recent Update on Human Lactate Dehydrogenase Enzyme 5 (HLDH5) Inhibitors: A Promising Approach for Cancer Chemotherapy. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (2), 487–496. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00168>.
- (569) Shirfule, A. L.; Sangamwar, A. T.; Khobragade, C. N. Exploring Glycolate Oxidase (GOX) as an Antiurothitic Drug Target: Molecular Modeling and in Vitro Inhibitor Study. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49* (1), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.016>.
- (570) Li, W.; Liu, J.; Guan, R.; Chen, J.; Yang, D.; Zhao, Z.; Wang, D. Chemical Characterization of Procyanidins from *Spatholobus Suberectus* and Their Antioxidative and Anticancer Activities. *J. Funct. Foods* **2015**, *12*, 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.009>.
- (571) Granchi, C.; Paterni, I.; Rani, R.; Minutolo, F. Small-Molecule Inhibitors of Human LDH5. *Future Med. Chem.* **2013**, *5* (16), 1967–1991. <https://doi.org/10.4155/FMC.13.151>.
- (572) Bader, A.; Tuccinardi, T.; Granchi, C.; Martinelli, A.; Macchia, M.; Minutolo, F.; De Tommasi, N.; Braca, A. Phenylpropanoids and Flavonoids from *Phlomis kurdica* as Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenase. *Phytochemistry* **2015**, *116* (1), 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.007>.
- (573) Lluís, C.; Bozal, J. Kinetic Formulations for the Oxidation and the Reduction of Glyoxylate by Lactate Dehydrogenase. *BBA - Enzymol.* **1977**, *480* (2), 333–342. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(77)90025-0).
- (574) Blanca-Pestaña, M. D. Evaluación de Proantocianidinas Naturales Como Inhibidores de La Enzima Lactato Deshidrogenasa, Universidad de Jaén, 2020.
- (575) Balcázar, J. L.; Subirats, J.; Borrego, C. M. The Role of Biofilms as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01216>.
- (576) Giaouris, E.; Heir, E.; Desvaux, M.; Hébraud, M.; Møretrø, T.; Langsrud, S.; Doulgeraki, A.; Nychas, G. J.; Kacániová, M.; Czaczyk, K.; Ölmez, H.; Simões, M. Intra- and Inter-Species Interactions within Biofilms of Important Foodborne Bacterial Pathogens. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>.
- (577) Górniak, I.; Bartoszewski, R.; Króliczewski, J. Comprehensive Review of Antimicrobial Activities of Plant Flavonoids. *Phytochem. Rev.* **2019**, *18*, 241–272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>.
- (578) Díez-Bello, R.; Jardín, I.; López, J. J.; El Haouari, M.; Ortega-Vidal, J.; Altarejos, J.; Salido, G. M.; Salido, S.; Rosado, J. A. (–)-Oleocanthal Inhibits Proliferation and Migration by Modulating Ca<sup>2+</sup> Entry through TRPC6 in Breast Cancer Cells. *Biochim. Biophys. Acta -*

- Mol. Cell Res.* **2019**, 1866 (3), 474–485. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.010>.
- (579) Pastorio, C. Characterization of the Mechanisms of Cell Death Induced by Oleocanthal in Human Tumour Cells, University of Granada, 2021.
- (580) Dácil-Marreiro, A.; Ortega-Vidal, J.; Salido, S.; Altarejos, J.; Quesada, A. R.; Martínez-Poveda, B.; Medina-Torres, M. A. Oleocanthal and Oleacein, Two Polyphenols from Olive Oil, Inhibit Angiogenesis; 43rd Annual Meeting of the Spanish Society of Biochemistry & Molecular Biology: Barcelona, 2021.
- (581) Huang, Z.; Huang, X.; Li, B.; Mou, C.; Yang, S.; Song, B. A.; Chi, Y. R. Access to P-Stereogenic Phosphinates via N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed Desymmetrization of Bisphenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (24), 7524–7527. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04624>.
- (582) Bettoni, L.; Gaillard, S.; Renaud, J. L. A Phosphine-Free Iron Complex-Catalyzed Synthesis of Cycloalkanes: Via the Borrowing Hydrogen Strategy. *Chem. Commun.* **2020**, 56 (85), 12909–12912. <https://doi.org/10.1039/d0cc05840h>.
- (583) Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus Linearise*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (3), 632–638. <https://doi.org/10.1021/jf960281n>.
- (584) Rupiani, S.; Buonfiglio, R.; Manerba, M.; Di Ianni, L.; Vettrano, M.; Giacomini, E.; Masetti, M.; Falchi, F.; Di Stefano, G.; Roberti, M.; Recanatini, M. Identification of N-Acylhydrazone Derivatives as Novel Lactate Dehydrogenase A Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 101, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.028>.
- (585) Dragovich, P. S.; Fauber, B. P.; Boggs, J.; Chen, J.; Corson, L. B.; Ding, C. Z.; Eigenbrot, C.; Ge, H.; Giannetti, A. M.; Hunsaker, T.; Labadie, S.; Li, C.; Liu, Y.; Liu, Y.; Ma, S.; Malek, S.; Peterson, D.; Pitts, K. E.; Purkey, H. E.; Robarge, K.; Salphati, L.; Sideris, S.; Ultsch, M.; Vanderporten, E.; Wang, J.; Wei, B.; Xu, Q.; Yen, I.; Yue, Q.; Zhang, H.; Zhang, X.; Zhou, A. Identification of Substituted 3-Hydroxy-2-Mercaptocyclohex-2-Enones as Potent Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (16), 3764–3771. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.06.076>.
- (586) Fernández-Fuentes, M. A.; Ortega Morente, E.; Abriouel, H.; Pérez Pulido, R.; Gálvez, A. Isolation and Identification of Bacteria from Organic Foods: Sensitivity to Biocides and Antibiotics. *Food Control* **2012**, 26 (1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.017>.
- (587) Castejon, M. L.; Sánchez-Hidalgo, M.; Aparicio-Soto, M.; Montoya, T.; Martín-LaCave, I.; Fernández-Bolaños, J. G.; Alarcón-de-la-Lastra, C. Dietary Oleuropein and Its New Acyl-Derivate Attenuate Murine Lupus Nephritis through HO-1/Nrf2 Activation and Suppressing JAK/STAT, NF-KB, MAPK and NLRP3 Inflammasome Signaling Pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, 74, 108229. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108229>.
- (588) Montoya, T.; Castejón, M. L.; Sánchez-Hidalgo, M.; González-Benjumea, A.; Fernández-Bolaños, J. G.; Alarcón De-La-Lastra, C. Oleocanthal Modulates LPS-Induced Murine Peritoneal Macrophages Activation via Regulation of Inflammasome, Nrf-2/HO-1, and MAPKs Signaling Pathways. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67 (19), 5552–5559. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00771>.





# ABREVIATURAS

**AB** – Ácido betulínico

**AcOEt** – Acetato de etilo (= EtOAc, en inglés)

**AM** – Ácido maslínico

**AO** – Ácido oleanólico

**CC** – Cromatografía en columna

**CCF** – Cromatografía en capa fina

**CCUG** – Culture Collection of the University of Göteborg

**CFCT** – Colección Española de Cultivos Tipo

**COI** – Consejo Oleícola Internacional

**COSY** – Correlation Spectroscopy

**DCM** – Diclorometano

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DPPH** – 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical

**EC<sub>50</sub>** – Concentración efectiva (en inglés *efficient concentration*)

**Er** – Eritrodiol

**EtOH** – Etanol

**FCPC** – Fast Centrifugal Partition Chromatography

**Hex** – Hexano

**HMBC** – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

**HPLC** – High Performance Liquid Chromatography

**HRF** – Fragmentación *Heterocyclic Ring Fission*

**HSQC** – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

**IC<sub>50</sub>** – Concentración inhibitoria (en inglés *inhibitory concentration*)

**IGD** – Interconversión de grupo funcional

**LDHA** – Lactato deshidrogenasa A

**MeCN** – Acetonitrilo

**MeOH** – Metanol

**MIC** – Concentración mínima inhibitoria (en inglés *Minimum Inhibitory Concentration*)

**MS** – Espectrometría de Masas

**QM** – Fragmentación *Quinone Methide*

**RDA** – Fragmentación retro-*Diels-Alder*

**RMN** – Resonancia Magnética Nuclear

***t*-BuOH** – *terc*-Butanol

**THF** – Tetrahidrofurano

**UV** – Uvaol

**UV-Vis** – Espectroscopía ultravioleta-visible

ANEXOS

# Datos espectroscópicos de los compuestos aislados y síntetizados

(En formato electrónico)



Contribuciones Científicas

## 1. Publicaciones científicas

- Diez-Bello, R.; Jardin, I.; Lopez, J. J.; El Haouari, M.; Ortega-Vidal, J.; Altarejos, J.; Salido, G. M.; Salido, S.; Rosado, J. A. (-)-Oleocanthal Inhibits Proliferation and Migration by Modulating  $\text{Ca}^{2+}$  Entry through TRPC6 in Breast Cancer Cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2019**, 1866 (3), 474–485. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.010>.
- Ortega-Vidal, J.; Cobo, A.; Ortega-Morente, E.; Gálvez, A.; Alejo-Armijo, A.; Salido, S.; Altarejos, J. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Flavonoids Isolated from Wood of Sweet Cherry Tree (*Prunus Avium* L.). *J. Wood Chem. Technol.* **2021**, 41 (3), 104–117. <https://doi.org/10.1080/02773813.2021.1910712>.
- Ortega-Vidal, J.; Cobo, A.; Ortega-Morente, E.; Gálvez, A.; Martínez-Bailén, M.; Salido, S.; Altarejos, J. Antimicrobial activity of phenolics isolated from the pruning wood residue of European plum (*Prunus domestica* L.). *Ind. Crop. Prod.* **2021** (Manuscrito INDCRO-D-21-01961R2).
- Ortega-Vidal, J.; Salido, S.; Altarejos, J. Phenolic compounds profile and lactate dehydrogenase inhibition of seven sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Ind. Crop. Prod.* (Manuscrito en preparación).
- Castejón, M.L., Montoya, T., Ortega-Vidal, J., Altarejos, J., Alarcón-de-la-Lastra, C. Ligstroside aglycon, an extra virgin olive oil secoiridoid, prevents inflammation via regulation of MAPKs, JAK/STAT, NF- $\kappa$ B, Nrf2/HO-1 and NLRP3 inflammasome signalling pathways in LPS-stimulated murine peritoneal macrophages. *J. Agric. Food Chem.* (Manuscrito en preparación).
- (-)-Methyl-oleocanthal, a new semisynthetic derivate, modulates histone methylation and acetylation, and reduces LPS- induced macrophage inflammatory response via MAPKs, Nrf-2/HO-1 and inflammasome signaling pathways. *Food Chem.* (Manuscrito en preparación).



## **2. Comunicaciones a congresos**

- Isolation of flavonoids from the pruning wood of cherry tree cultivars. Jornadas Doctorales para Jóvenes Investigadores (EDUJA). Universidad de Jaén. Jaén (España), **2016**.
- Aislamiento de proantocianidinas tipo A de restos de poda de ciruelo europeo. II Jornadas de Investigadores en Formación: fomentando la interdisciplinariedad (JIFFI). Universidad de Granada. Granada (España), **2017**.
- Isolation of A-type proanthocyanidins from the pruning wood of Japanese plum tree cultivars. Jornadas Doctorales para Jóvenes Investigadores (EDUJA). Universidad de Jaén. Jaén (España), **2017**.
- Oleocanthal isolated from Olive Oil by Countercurrent Chromatography Reduces Breast Cancer Cell Migration. 6<sup>th</sup> Portuguese Young Chemists Meeting-6PYCHEM. Setúbal (Portugal), **2018**.
- Análisis of bioactive triterpenoids in olive tree cultivars 'Picual', 'Frantoio' and 'Koroneiki'. III Congreso Nacional de Jóvenes Químicos y Bioquímicos terapéuticos "QuimBioQuim". Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete (España), **2018**.
- (-)-Oleocanthal impairs proliferation and migration in triple negative breast cancer cells. XXXIX Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences. Cádiz (España), **2019**.
- Aislamiento de oleocantal y oleaceína a partir de aceite de oliva. XIX Simposio Científico-Técnico de Expoliva 2019. Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines. Jaén (España), **2019**.
- OL-128 y su derivado metilado reducen la respuesta inflamatoria inducida por LPS en macrófagos intraperitoneales murinos. XI Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Málaga (España), **2019**.

- Quantification of ligustroside and oleuropein in leaves and stems of olive tree cultivars. Jornadas Doctorales para Jóvenes Investigadores (EDUJA). Universidad de Jaén. Jaén (España), **2019**.
- El secoiridoide OL-128 y su derivado metilado reducen la respuesta inflamatoria inducida por IL-1b en fibroblastos sinoviales humanos sw982. II Jornadas de Jóvenes Investigadores. Granada (España), **2020**.
- Efecto antiinflamatorio de un secoiridoide el olivo y su derivado semisintético en macrófagos peritoneales murinos estimulados con lipopolisacárido bacteriano sobre las vías canónica y no canónica del inflammasoma y MAPK. II Jornadas de Jóvenes Investigadores. Granada (España), **2020**.
- Oleocanthal and oleacein, two polyphenols from olive oil, inhibit angiogenesis. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Spanish Society of Biochemistry & Molecular Biology. Barcelona (España), **2021**.