



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química

**Análisis fitoquímico de frutos de *Prunus persica* cv Vesuvio**

***Autor: Álvaro Muñoz Benito***

***Tutores: Antonio Fiorentino, Lucía Citores González***

## INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT .....	2
3.	LISTADO DE TABLAS .....	3
4.	LISTADO DE FIGURAS .....	4
5.	INTRODUCCION.....	5
6.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	8
7.	MATERIALES Y METODOS .....	10
7.1.	Material biológico .....	10
7.2.	Equipo .....	10
7.3.	Material de laboratorio .....	11
7.4.	Reactivos .....	11
7.5.	Procedimiento.....	11
7.5.1.	Tratamiento del material vegetal .....	11
7.5.2.	Obtención de extractos orgánicos de la piel del melocotón. ....	12
7.5.2.1.	Extracción sólido-líquido. ....	12
7.5.2.2.	Extracción líquido-líquido.....	12
7.5.3.	Cromatografía de líquidos de alta eficacia de la fracción acuosa.....	13
7.5.3.1.	Separación por cromatografía de intercambio iónico de la fracción acuosa. ....	13
7.5.3.2.	Separación por exclusión molecular.....	14
7.5.3.3.	Análisis de las fracciones mediante cromatografía en capa fina. ....	14
7.5.3.4.	Separación por cromatografía en fase inversa.....	16
7.5.4.	Aislamiento y caracterización de compuestos.....	17
7.5.5.	Análisis espectroscópico. ....	19
8.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	22
8.1.	Extracción sólido-líquido. ....	22
8.2.	Cromatografía de intercambio iónico de la fracción acuosa PVB/2-1, en Amberlite. ....	22
8.3.	Cromatografía de PVBA/1 en Sephadex LH-20. ....	23
8.4.	Cromatografía de PVBA/2 en C-18. ....	25
8.5.	Cromatografía de PVBA/6 en C-18. ....	28
8.6.	Identificación espectroscópica.....	30
8.6.1.	Fracción PVBA/4/3. ....	30
8.6.2.	Fracción PVBA/8/4 .....	40
8.6.3.	Fracción PVBA/10/1. ....	43
8.6.4.	Fracción PVBA/11/1. ....	47
9.	CONCLUSIONES.....	50

10. BIBLIOGRAFIA.....	51
11. WEBGRAFIA .....	54

## 1. RESUMEN

Los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la calidad de los alimentos y contribuyen al aroma y sabor de la fruta. Un mayor contenido de fenoles en la fruta se asocia a menudo con un mejor sabor, pero también pueden tener un efecto negativo incrementando el daño por el pardeamiento de la fruta (Lurie y Crisosto, 2005). Además, los compuestos fenólicos han mostrado una importante actividad fisiológica en seres humanos como antioxidantes y agentes contra el cáncer. Numerosas investigaciones sugieren que una amplia variedad de fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos y carotenoides, son capaces de prevenir o retrasar el daño inducido por el estrés oxidativo que conduce al cáncer (Liu 2003). Continuando con la investigación de compuestos beneficiosos para la salud en plantas comestibles propias de la región de Campania (Cefarelli et al. 2006, Fiorentino et al. 2008), hemos iniciado con este trabajo el estudio fitoquímico del melocotón (*Prunus persica* (L.) cv Vesuvio). El melocotonero es uno de los árboles frutales de clima templado más importante cultivado en Campania y contribuye de manera significativa a la producción total de fruta de hueso y de pepita.

Para llevar a cabo este estudio se separó la piel de la pulpa de los frutos de melocotón. Las pieles liofilizadas se sonicaron durante 40 min, primero con acetato de etilo y, a continuación, después de la eliminación del disolvente, con etanol. Después de la destilación de los disolventes a vacío, se obtuvieron los extractos de acetato de etilo y etanol.

El extracto de etanol se disolvió en agua y se agitó con acetato de etilo para obtener una fracción orgánica y una acuosa. La fracción acuosa se sometió a cromatografía en Amberlite XAD-4, eluyendo primero con agua y luego con metanol. La fracción metanólica se sometió a cromatografía en Sephadex LH-20, eluyendo con soluciones de agua /metanol y luego se utilizaron varias técnicas cromatográficas para la purificación de metabolitos. Los compuestos puros se han dilucidado sobre la base de un amplio análisis espectroscópico de RMN 2D, incluyendo COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, CIGAR-HMBC, H2BC y HSQC-TOCSY. En este trabajo se han identificado cuatro nuevos compuestos de la piel de melocotón: bencil- $\beta$ -D-gentiobiosido, fenilalanina, uridina y un glucósido fenólico. Todos estos compuestos biológicamente activos hacen del melocotón Vesuvio un alimento funcional que puede ser beneficioso para la salud.

## 2. ABSTRACT

Phenolic compounds play an important role in the foods quality, and contribute to the aroma or flavor of the fruit, and it is reported that the higher content of phenols in fruit often associated with improved taste, but can also have a negative effect increasing the damage by browning of the fruit (Lurie and Crisosto, 2005).

Furthermore phenolic compounds have shown an important physiological activity in humans like antioxidants and anticancer agents and numerous researches suggest that a wide variety of phytochemicals, such as phenolics and carotenoids, is able to prevent or slow down oxidative stress-induced damage leading to cancer (Liu 2003). Continuing investigation of health-protective compounds from edible plants, characteristic of the Campania Region (Cefarelli et al. 2006, Fiorentino et al. 2008), we started the phytochemical study of peach [*Prunus persica* (L.) cv Vesuvio]. This crop is one the most important temperate fruit tree grown in Campania making a major contribution to total stone and pome fruit production.

The peach fruits were separated into peel and pulp. Freeze-dried peels were transferred in a glass tube and ultrasonicated for 40 min before with ethyl acetate and then, after removal of the solvent, with ethanol. After distillation of the solvents in a vacuum, we obtained the ethyl acetate and ethanol crude extracts.

The EtOH extract was dissolved in water and shaken with EtOAc to obtain an organic and an aqueous fractions. The aqueous fraction was chromatographed on AmberliteXAD-4, eluting with water first and then with MeOH. The methanolic fraction was chromatographed on Sephadex LH-20, eluting with water/methanol solutions and then several chromatographic techniques were used for metabolites purification. The pure compounds have been elucidated on the basis of extensive 2D NMR spectroscopic analyses, including COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, CIGAR-HMBC, H2BC and HSQC-TOCSY. In this study, four new compounds have been identified in the peel of the peach fruit: benzyl- $\beta$ -D-gentiobiose, phenylalanine, uridine and a phenolic glycoside. All these biologically active compounds make Vesuvio peach a functional food that could provide a health benefit.

### 3. LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 1.- Extracciones de la piel de Prunus persica cv Vesuvio.</i>	22
<i>Tabla 2.- Fracciones acuosas obtenidas.</i>	22
<i>Tabla 3.- Fracciones, pesos y transferencias de la fracción PVBA/1.</i>	23
<i>Tabla 4.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/3.</i>	24
<i>Tabla 5.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/15.</i>	24
<i>Tabla 6.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/16.</i>	24
<i>Tabla 7.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/17.</i>	25
<i>Tabla 8.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/18.</i>	25
<i>Tabla 9.- Fracciones, pesos y transferencias de la fracción PVBA/2.</i>	26
<i>Tabla 10.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/4.</i>	26
<i>Tabla 11.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/5.</i>	27
<i>Tabla 12.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/7.</i>	27
<i>Tabla 13.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/8.</i>	27
<i>Tabla 14.- Fracciones, pesos y transferencias de la fracción PVBA/6.</i>	28
<i>Tabla 15.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/9.</i>	28
<i>Tabla 16.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/10.</i>	29
<i>Tabla 17.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/11.</i>	29
<i>Tabla 18.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/12.</i>	29
<i>Tabla 19.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/13.</i>	30
<i>Tabla 20.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/14.</i>	30
<i>Tabla 21.- Desplazamientos químicos asignados en <math>^{13}\text{C}</math> al compuesto PVBA/4/3.</i>	38
<i>Tabla 22.- Desplazamientos químicos de <math>^{13}\text{C}</math> experimentales en alcohol bencílico y gentiobiosa.</i>	39
<i>Tabla 23.- Desplazamientos químicos de <math>^1\text{H}</math> experimentales en la fenilalanina.</i>	42
<i>Tabla 24.- Desplazamientos químicos de <math>^1\text{H}</math> experimentales y teóricos en la uridina.</i>	47

#### 4. LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1.- Laboratorio de Química Orgánica.</i>	10
<i>Figura 2.- Cromatografía en placa fina de aluminio de algunas fracciones obtenidas tras la cromatografía de PVBA/2.</i>	16
<i>Figura 3.- Diagrama de flujo del procedimiento llevado a cabo.</i>	17
<i>Figura 4.- Observación a luz ultravioleta de una placa cromatográfica en capa fina.</i>	18
<i>Figura 5.- Espectrómetro NMR Varian Mercury 300.</i>	19
<i>Figura 6.- Espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/4/3.</i>	31
<i>Figura 7.- Ampliación del espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/4/3.</i>	32
<i>Figura 8.- Espectro NMR carbónico general de la fracción PVBA/4/3.</i>	33
<i>Figura 9.- Espectro NMR DEPT de la fracción PVBA/4/3.</i>	34
<i>Figura 10.- Espectro HSQC de la fracción PVBA/4/3.</i>	34
<i>Figura 11.- Ampliación del espectro HSQC de la fracción PVBA/4/3.</i>	35
<i>Figura 12.- Espectro HSQC-TOCSY de la fracción PVBA/4/3.</i>	35
<i>Figura 13.- Ampliación del espectro HSQC-TOCSY de la fracción PVBA/4/3.</i>	36
<i>Figura 14.- Desplazamientos tabulados de <math>\beta</math>-D-Glucosa.</i>	36
<i>Figura 15.- Espectro HMBC de la fracción PVBA/4/3.</i>	36
<i>Figura 16.- Ampliación del espectro HMBC de la fracción PVBA/4/3.</i>	37
<i>Figura 17.- Estructura final del compuesto PVBA/4/3.</i>	37
<i>Figura 18.- Moléculas de alcohol bencílico y <math>\beta</math>-gentiobiosa tabuladas.</i>	38
<i>Figura 19.- Espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/8/4.</i>	40
<i>Figura 20.- Ampliación del espectro NMR protónico de la fracción PVBA/8/4.</i>	41
<i>Figura 21.- Estructura final del compuesto PVBA/8/4.</i>	41
<i>Figura 22.- Estructura de la fenilalanina.</i>	42
<i>Figura 23.- Desplazamientos químicos de <math>^1\text{H}</math> y constantes de acoplamiento en la fenilalanina.</i>	43
<i>Figura 24.- Espectro NMR protónico de la fracción PVBA/10/1.</i>	44
<i>Figura 25.- Ampliación del espectro NMR protónico de la fracción PVBA/10/1.</i>	45
<i>Figura 26.- Estructura final del compuesto PVBA/10/1.</i>	46
<i>Figura 27.- Estructura de la uridina.</i>	46
<i>Figura 28.- Espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/11/1.</i>	48
<i>Figura 29.- Ampliación del espectro NMR protónico de la fracción PVBA/11/1.</i>	49
<i>Figura 30.- Estructura final del compuesto PVBA/11/1.</i>	49

## 5. INTRODUCCION

El melocotón es el fruto del melocotonero cuyo nombre científico es *Prunus persica* L. También se le denomina nuez persa o nuez de Persia, ya que *persica* o *persicum* significa literalmente fruta Pérsica. Durante muchos siglos se pensó que este árbol procedía de Persia pero lo cierto es que se introdujo en Persia a través de rutas comerciales y en realidad es originario de China occidental, donde ya existen registros del siglo II a.C. Allí el melocotón aún hoy en día es un símbolo de inmortalidad, mientras que en Egipto se considera el símbolo del silencio y la infancia debido a que era un fruto sagrado para el dios Harpócrates. Los melocotones se introdujeron en Italia precisamente en el siglo I d.C. y gracias a Alejandro Magno fue introducido en el resto de la cuenca mediterránea, debido a lo cual en la Edad Media, Francia era el segundo centro de producción después de China. Desde 1800 los melocotones han tenido un gran éxito y son una de las frutas frescas con mayor número de variedades producidas y vendidas en el mercado internacional.

Dentro del género *Prunus* se incluyen otras frutas de hueso como los albaricoques, almendras, cerezas y ciruelas. El melocotón es una típica drupa, un fruto carnoso indehiscente con una parte delgada en su exterior llamada epicarpio membranoso o piel, una parte central carnosa llamada mesocarpio carnoso o pulpa, y una parte interna leñosa llamada endocarpio leñoso o núcleo, el cual contiene en su interior la semilla ósea. Tiene un sabor succulento y azucarado más o menos ácido, con una pulpa dulce y fragante, blanca, amarilla o roja y una piel fina, lisa y aterciopelada que puede ir desde un color amarillo hasta rojo carmín o salmón y con un núcleo interno que contiene una almendra que puede estar adherida (durazno) o no a la pulpa del melocotón. Gracias a sus características, su jugosidad y su capacidad para saciar la sed (85% de agua y ácido cítrico), el melocotón es una de las frutas del verano por excelencia, cuyo uso es principalmente como fruta fresca pero también se usa en jarabes, fruta en conserva, como licor aromatizante en bebidas o incluso últimamente usos cosméticos para el cuidado de la piel y cabello.

El melocotón es una fruta revitalizante, con gran contenido de vitaminas A y C. Además es una fruta laxante y diurética por lo que purifica el cuerpo humano, aumentando la funcionalidad de riñones e intestinos. Está muy bien tolerado por el estómago, por esta razón se recomienda en dietas de personas con trastornos en las funciones digestivas y al no tener gluten es adecuado para personas celiacas. Tiene un papel muy importante en otros conceptos como la desintoxicación del cuerpo, regulación de la alcalinidad de la sangre o estimulación de la



secreción gástrica. También se usa contra el reumatismo, la artritis o la nefritis. Por otra parte en sujetos sensibles o predispuestos, puede provocar algunas reacciones alérgicas, especialmente en los más pequeños.

Debido a las innumerables variedades de melocotones, hay una gran competencia entre varios países de la Unión Europea y el resto del mundo. Italia se encuentra en el segundo puesto mundial de producción de duraznos, solo superada por el mayor productor, China, y seguido de países como Estados Unidos, España, Grecia, Francia y Argentina, en este orden. El melocotón italiano es considerado, desde mediados del siglo pasado, un modelo para países europeos, norafricanos o de oriente medio. A pesar de ello, España, que es el cuarto mayor productor mundial, es el mayor exportador mundial gracias a su cosecha temprana en comparación con otros países europeos.

Entre las variedades de fruta fresca, el melocotón es la segunda producción italiana más importante, solo por detrás de la manzana, ocupando entre todos los huertos de frutas de hueso un 1,3% de tierras de cultivo italianas, representando el melocotón y la nectarina 93.100 hectáreas. El pico de recolección de esta fruta se ubica, lógicamente, en los meses de junio y julio. En lo que a Italia se refiere, en los últimos datos existentes de Istat, instituto nacional de estadística italiano, referentes al año 2013, se produjeron más de 930.000 toneladas de melocotón, 87.300 toneladas de percocha (variedad italiana con pulpa de color dorado y sabor fresco y dulce) y 782.000 toneladas de nectarina. La producción de durazno se realizó en 47.378 hectáreas, repartidas en 12.730 en el norte del país, 2.808 en el centro y 32.840 en la parte sur del país. Esto concuerda con los datos regionales, donde las regiones con mayor producción son Emilia-Romaña con un 33%, Campania con un 25%, Véneto y Lacio (Istat, Istituto nazionale di statistica).

Se han llevado a cabo estudios sobre *Prunus persica* diferenciando la semilla, la flor y el fruto. En lo que a la semilla o hueso se refiere, incluye constituyentes químicos como la amigdalina, prunasina o glucósidos cianogénicos, por ello en países como China, Japón u otros países asiáticos se utiliza en la medicina tradicional. Se han llevado a cabo estudios que demuestran actividad antitumoral sobre el crecimiento del papiloma epidérmico (Fukuda et al. 2003). También se ha demostrado que un extracto acuoso de la semilla, inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa, una enzima humana presente en los tejidos nerviosos y glóbulos rojos, cuya función es hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina y constituir un antígeno en los glóbulos

rojos. Por tanto su presencia en cobayas propicia un aumento de la acetilcolina en su hipocampo (Kim et al. 2003).

Desde la antigüedad las flores se han venido utilizando en Asia oriental para los trastornos de la piel. En un estudio realizado se han podido aislar diferentes compuestos flavonoides como la multiflorina B, azfelina, astragalina o trifolina presentes en la flor. Un extracto de etanol inhibe la liberación de metabolitos por parte del ácido araquidónico, en queratinocitos humanos *in vitro*, mientras que *in vivo*, inhibe la formación del eritema (Young Ha et al. 2002).

En cuanto al fruto, se han realizado estudios sobre el efecto del extracto de etanol de frutos en la inflamación alérgica mediada por mastocitos observándose que inhibe la liberación de la histamina y reduce la afluencia de cationes  $\text{Ca}^{2+}$  en el factor NF-kB, un complejo proteico que controla la transcripción del ADN y por tanto reduce la expresión de citoquinas inflamatorias (Shin et al. 2010).

## 6. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Antioxidantes provenientes de fuentes vegetales, como ácidos fenólicos y flavonoides, han sido reconocidos por tener un gran potencial para reducir enfermedades tumorales y relacionadas con el corazón, ayudando a neutralizar los radicales libres, compuestos inestables que están relacionados con este tipo de enfermedades. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y extintores de oxígeno. Además, tienen el potencial de quelación de metales.

El objetivo general de este trabajo fin de grado es el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en la fruta, en este caso concreto en una variedad del melocotón típica de la Campania italiana, el melocotón Vesuvio.

En definitiva lo que se busca con este estudio es la confirmación de la recomendabilidad de esta especie en concreto, debido a sus buenos efectos sobre la salud de la persona.

Las etapas del plan de trabajo han sido las siguientes:

1. Preparación del producto a estudiar.

El producto del estudio se prepara con las operaciones necesarias, eliminando el agua presente, para su posterior investigación. Habrá que separar las diferentes partes del fruto, desecarlas y disponerlas para la instrumentación química.

2. Obtención del extracto correspondiente al estudio.

En este caso se examinará la piel del fruto. Para ello se realizan diferentes tipos de extracción sólido-líquido primero, y posteriormente, líquido-líquido.

3. Aplicación de técnicas cromatográficas sobre el extracto obtenido.

Sobre los extractos obtenidos, acuosos u orgánicos, se emplean técnicas cromatográficas. Técnicas de separación en las cuales la muestra se introduce en un sistema formado por un fluido (fase móvil), que circula por una fase estacionaria. Los componentes de la muestra difieren en su afinidad por alguna de las fases y se produce la separación. De esta forma, se agrupan los compuestos por sus semejanzas, facilitando su posterior identificación.

4. Obtención de compuestos fitoquímicos puros.

Mediante el uso de diferentes técnicas cromatográficas se llegará a la obtención de fracciones finales a partir de las cuales mediante técnicas de recuperación de compuestos con distintas soluciones, podremos aislar y obtener el metabolito.

5. Identificación mediante técnicas espectroscópicas.

Los compuestos fitoquímicos obtenidos se analizan mediante resonancia magnética nuclear, NMR. Los experimentos utilizados serán tanto monodimensionales, como bidimensionales, aunque son más complejos, de la misma forma serán tanto correlaciones homonucleares, como heteronucleares. De esta forma se podrá prácticamente determinar su estructura y así, sus posibles comportamientos.

## 7. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó entre los meses de febrero y julio del año 2014, en las instalaciones de las que dispone la Seconda Università degli Studi di Napoli en la ciudad de Caserta.

### 7.1. Material biológico

Los melocotones utilizados en el estudio provenían de la unidad de investigación en la fruticultura de Caserta, CRA-FRC, y fueron recolectados en septiembre del 2013.

La especie frutícola empleada en este estudio es *Prunus persica* L. cv Vesubio, una variedad característica de la Campania, que se identifica por su pulpa amarilla y jugosa ligeramente mayor que la del resto.

### 7.2. Equipo

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Química Orgánica y de Botánica de la Seconda Università degli Studi di Napoli, que están equipados con todos los instrumentos necesarios para poder llevar a cabo este trabajo (Figura 1).



Figura 1.- Laboratorio de Química Orgánica.

El laboratorio dispone del siguiente equipamiento:

Balanza analítica; evaporador rotatorio Hei-VAP; liofilizador; cámara frigorífica (-20°C); estufa de secado ( $120 \pm 5^\circ\text{C}$ ); centrífuga; baño ultrasónico; bomba LC-10AD (Shimadzu,

Japón); lámpara ultravioleta (254 nm y 366 nm); bomba extractora de solvente; baño de agua caliente; sistema de agua ultrapura Milli-Q; parrilla de extracción y sistema HPLC consistente en: bomba HPLC LC-10AD (Shimadzu, Japon), detector de índice de refracción (Shimadzu RID-10A) y un registrador Chromatopac Shimadzu C-R6A.

Además las dependencias disponían de varias cámaras frigoríficas, destinadas al almacenamiento de muestras, ya sea bien en forma de producto natural, bien en matraces esféricos en los que se trataban las muestras, tubos de ensayo provenientes de la cromatografía o cubetas preparadas para su análisis espectroscópico.

### **7.3. Material de laboratorio**

Pipetas Pasteur; tubos de ensayo; mortero y mano de mortero; columnas cromatográficas Phenomenex; placas cromatográficas (Merck); sistema de extracción por agitación; cuba de cristal para placas; embudos de cristal; embudos de decantación; Fluka Amberlite XAD-4 y XAD-7; Sephadex LH-20 (Pharmacia, Piscataway, NJ); resina C-18; jeringas de 500 µl; matraces cilíndricos de 50 ml, 100 ml y 250 ml; probetas de 10 ml, 25 ml, 100 ml y 500 ml; buretas de 100 ml; pipetas graduadas de 1 ml, 2 ml 5 ml y 10 ml; vasos de precipitados de 100 ml y 250 ml y cubetas de espectrofotómetro.

### **7.4. Reactivos**

Los siguientes reactivos químicos de la mayor pureza disponible en el mercado se utilizaron durante la realización de este trabajo:

Metanol calidad HPLC (Merck), cloroformo calidad HPLC (Merck), ácido sulfúrico (Merck) y acetona (Merck).

El agua que se utilizó para todo el trabajo fue agua tipo I Milli Q (Millipore).

### **7.5. Procedimiento**

#### **7.5.1. Tratamiento del material vegetal**

La piel del melocotón se preparó a partir de 4000 g de melocotones recolectados en Septiembre de 2013 en Caserta. Se separó la piel de la pulpa obteniéndose 550 y 2300 g respectivamente y

posteriormente se liofilizaron las muestras obteniendo 90 g de piel y 360 g de pulpa. A continuación se trituraron los 90 g de piel con nitrógeno líquido para llevar a cabo la extracción.

### **7.5.2. Obtención de extractos orgánicos de la piel del melocotón.**

#### **7.5.2.1. Extracción sólido-líquido.**

La extracción con ultrasonidos, UAE (Ultrasound Assisted Extraction), es una tecnología utilizada en la industria alimentaria. Son señales de alta intensidad que se usan para modificar el producto. El ultrasonido también ejerce un efecto mecánico, permitiendo una mayor penetración de disolvente en la muestra.

Se llevó a cabo una extracción sólido-líquida asistida por ultrasonido durante 60 minutos a una frecuencia de 37 MHz y una intensidad de 80 mW/cm<sup>2</sup>. La primera extracción se realiza con 500 ml de acetato de etilo, cuyo filtrado se lleva a seco. El acetato de etilo recuperado, se utiliza para un segundo ciclo de sonicación en las mismas condiciones experimentales, juntando ambos (extracto PVB/1). El proceso se repite cuatro veces más, pero esta vez partiendo de una extracción con 500 ml de etanol, estos filtrados se juntan y se denominan extracto PVB/2.

#### **7.5.2.2. Extracción líquido-líquido.**

Sobre la fracción PVB/2, previo secado, se realiza una nueva extracción, en este caso líquido-líquido. Este es un proceso que permite separar los componentes por su distribución entre dos fases líquidas inmiscibles. Se suele llevar a cabo entre una disolución acuosa y otro disolvente inmiscible con el agua con la ayuda de un embudo de decantación. La extracción líquido-líquido, se realiza a partes iguales de agua y acetato de etilo. De esta manera se obtienen dos fracciones: una orgánica denominada PVB/2-2 que se pasa por sulfato sódico anhidro y luego se lleva a seco, obteniendo un peso de 834 mg y otra fracción acuosa, sobre la que se centrará nuestro trabajo, que la llamaremos PVB/2-1 y que posteriormente se concentra para eliminar eventuales trazas de acetato de etilo.

### **7.5.3. Cromatografía de líquidos de alta eficacia de la fracción acuosa.**

Para llevar a cabo las separaciones cromatográficas empleando columnas, la muestra disuelta en una porción del disolvente se carga por la parte superior de la columna. A continuación se adiciona la fase móvil de forma continua, arrastrando así los componentes de la muestra, que se distribuyen según los valores de sus coeficientes de distribución. El soluto que tenga mayor relación de distribución se desplazará más lentamente.

Las cromatografías se desarrollarán con la columna indicada acoplada a un sistema colector de fracciones de HPLC.

#### **7.5.3.1. Separación por cromatografía de intercambio iónico de la fracción acuosa.**

Las resinas Amberlite (nombre comercial de la gama de resinas) XAD son polímeros esféricos muy porosos, basados en poliestireno macrorreticular. Su superficie interna puede adsorber y desorber a continuación, varias especies diferentes dependiendo del entorno en que se usen. En disolventes polares tienen un comportamiento hidrofóbico y así pueden adsorber especies orgánicas poco solubles, mientras que en disolventes no polares el comportamiento es el contrario, adsorbiendo especies polares. Proporcionan un excelente primer paso de purificación en la recuperación de compuestos fenólicos o hidrocarburos.

Los dos tipos que usaremos serán XAD-4, no polar y útil en procedimientos analíticos sensibles, y XAD-7, de polaridad intermedia que adsorbe materiales hidrófobos de sistemas acuosos e hidrofílicos de sistemas no acuosos.

La fracción acuosa (PVB/2-1) se sometió a cromatografía en una columna Amberlite XAD-4 y posteriormente en una XAD-7 acopladas a un sistema colector de fracciones de HPLC.

La resina Amberlite XAD-4 se empaquetó dentro de la columna y se equilibró con 3 litros de agua desgasada, al igual que la columna empaquetada con la resina XAD-7. La muestra se cargó en la columna XAD-4 y el agua cargada se pasa por la XAD-7. Tras ello se lava la XAD-4 con 1,5 litros de agua destilada que se pasan posteriormente por la XAD-7, para pasar finalmente 1,5 litros de metanol sobre ambas Amberlite. Las muestras resultantes (PVB/3-1 y PVB/3-2) se llevan a seco recuperando el metanol.

La fracción PVB/3-1, con la que continuaremos nuestro trabajo, la renombramos PVBA/1.



### **7.5.3.2. Separación por exclusión molecular.**

La fracción metanólica resultante de la XAD-4, PVBA/1, se sometió a cromatografía en Sephadex LH-20, para solventes acuosos, acoplada a un sistema colector de fracciones de HPLC.

En este caso el Sephadex LH-20 es una cromatografía líquida diseñada para cribar según el tamaño molecular de los productos naturales. Es un dextrano cuyas esferas se hinchan en agua o soluciones electrolíticas, según el grado de reticulación del polímero. Tiene una selectividad cromatográfica única debido a la doble naturaleza hidrófila y lipófila de la matriz. Sus características dependen del disolvente utilizado, siendo ideal para los glicósidos con mezclas de metanol-agua o cloroformo-metanol.

La columna de 60 cm x 3 cm se equilibra con agua purificada en un sistema Milli-Q y se eluye con soluciones de agua /metanol, comenzando con un 20% MeOH/H<sub>2</sub>O y aumentando progresivamente. Se recogen fracciones de 3 ml.

El seguimiento separativo de las fracciones se lleva a cabo mediante cromatografía en capa fina.

### **7.5.3.3. Análisis de las fracciones mediante cromatografía en capa fina.**

Las fracciones obtenidas en la cromatografía en Sephadex LH-20 se analizan mediante cromatografía en capa fina o TLC (Thin Layer Chromatography), una técnica analítica rápida y sencilla para realizar un seguimiento o comparar muestras. En este caso la fase estacionaria o adsorbente es la alúmina, óxido de aluminio, de carácter polar, ya que es más cómodo y más económico. El adsorbente que debe ser inerte y no catalizador, interacciona con las sustancias mediante enlaces de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo. El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Normalmente el eluyente que utilizamos son mezclas de varios componentes, ya sean monofásicas o bifásicas. Nuestros reactivos fundamentales a la hora de elegir fase móvil serán cloroformo, metanol y agua destilada, por tanto, un sistema bifásico de estos componentes estará formado por una capa superior hidroalcohólica llamada refinado y por una capa inferior clorofórmica llamada extracto, la cual será utilizada para la cromatografía.

En primer lugar las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna se transfieren a matraces esféricos y se elimina el disolvente innecesario, es decir en caso de que la muestra se diluya en metanol, se lleva a seco la muestra de agua y metanol totalmente, y se diluye

totalmente en metanol o en su defecto con las mínimas gotas de agua posibles. La fase móvil, que en nuestro caso, mejores resultados ha proporcionado ha sido 13:7:2 cloroformo:metanol:agua, bifásica.

La muestra se puntea en la citada placa de aluminio, en porciones que serán de 10 cm de longitud y de ancho en función de los puntos, dejando 1 cm libre a cada lado y 0.5 cm de espacio entre punto y punto.

El revelado de la placa cromatográfica se realiza de dos formas diferentes y siempre en el mismo orden, se observan los compuestos activos a la luz ultravioleta con una longitud de onda corta de 254 nm y una longitud de onda larga de 366 nm. El otro agente revelador utilizado tras la fuente ultravioleta es la pulverización de una disolución de ácido sulfúrico (1 ml de ácido sulfúrico, 20 ml de ácido acético y 4 ml de agua destilada) que posteriormente se calienta en una estufa a 120°C.

A continuación se comparan los perfiles de las diferentes fracciones y si hay similitudes se procede a juntar las fracciones en un único matraz esférico. Si las muestras de los tubos de ensayo analizados están muy retenidas o poco retenidas, cambiamos la polaridad del eluyente, bien más polar como por ejemplo una mezcla 13:7:4 o menos polar, como 14:6:1, siempre cloroformo:metanol:agua.

Cada día tanto al inicio como al final de la jornada se realizaban análisis de los últimos tubos de ensayo provenientes de la cromatografía en columna. De esta forma tras realizar la pertinente cromatografía se observa si siguen apareciendo marcas de compuestos o no (ejemplo, Figura 2), en caso contrario se añade metanol al eluyente, aumentando progresivamente su porcentaje en la cromatografía de columna, para propiciar la salida de más compuestos, aumentando a un 10%, 20%, 40% y sucesivamente.



*Figura 2.- Cromatografía en placa fina de aluminio de algunas fracciones obtenidas tras la cromatografía de PVBA/2.*

La placa se reveló pulverizando con una disolución de ácido sulfúrico.

#### **7.5.3.4. Separación por cromatografía en fase inversa.**

Dos de las fracciones obtenidas de la cromatografía Sephadex de PVBA/1, denominadas PVBA/2 y PVBA/6 se seleccionaron debido a su alto peso y a la cantidad de compuestos revelados y se sometieron a una cromatografía en fase inversa con resina C-18.

En esta cromatografía, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil y los compuestos hidrofílicos, polares, se retienen menos y eluyen primero, mientras que los compuestos hidrofóbicos, no polares, son retenidos más fuertemente.

Las cromatografías se realizaron con resina C-18, equilibrada en metanol y empleando una columna Luna RP-8 (Phenomenex, Torrance, CA) 250 x 10 mm i.d., con un flujo de 600 gotas por tubo cromatográfico (3 ml) y eluyendo inicialmente con una disolución al 10% MeOH/H<sub>2</sub>O, aumentando progresivamente este porcentaje cuando no se observaban compuestos separados.

En la Figura 3, se muestra un esquema general del procedimiento llevado a cabo hasta la obtención de las fracciones PVBA/2 y PVBA/6.

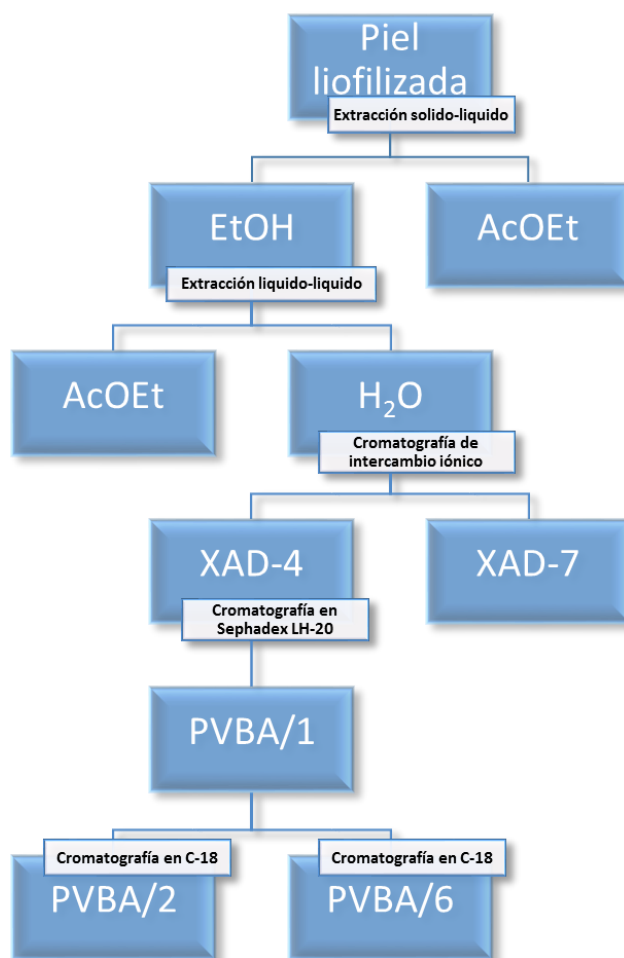


Figura 3.- Diagrama de flujo del procedimiento llevado a cabo.

#### 7.5.4. Aislamiento y caracterización de compuestos.

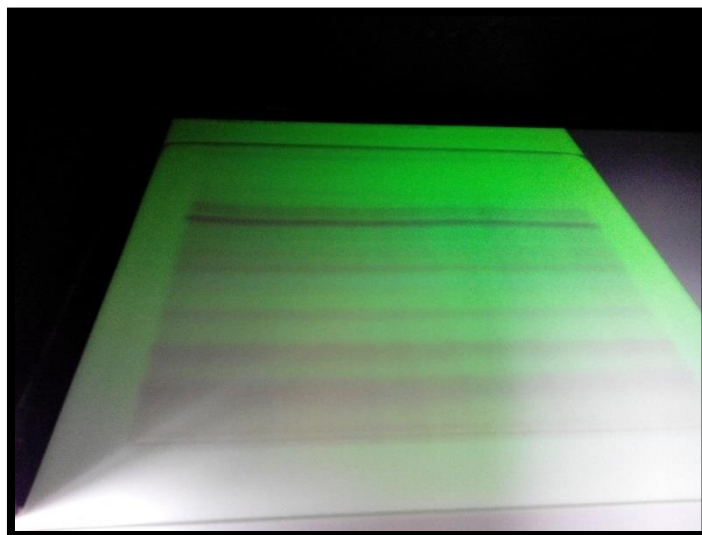
Tras realizar análisis espectroscópicos a las diferentes fracciones se decide, en función del revelado y la claridad del espectro, aislar los compuestos, siempre que la separación observada en la cromatografía con alúmina sea buena.

Para ello se purifican utilizando tres tipos diferentes de cromatografías en capa, dependiendo del peso de la muestra. En los tres casos son placas de gel de sílice de 20 cm x 20 cm, para las cuales, lógicamente, se preparará mayor cantidad de eluyente, aproximadamente unos 40 ml.

Los tres tipos se diferencian en el peso de la muestra a separar, si el peso es grande y el número de compuestos es alto, se utilizará una cromatografía PLC (Preparative Layer Chromatography), que a su vez puede ser preparativa o semipreparativa, siendo la primera para un mayor peso. La tercera opción, la más usada, es TLC analítica, cromatografía de capa fina.

Por tanto si se decide usar TLC, serán placas de 20 cm x 20 cm de gel de sílice 60 F254. La semipreparativa serán placas de 20 cm x 20 cm de gel de sílice 60 F254 de 0.5 mm de espesor o la preparativa que será de 1 mm de espesor.

El eluyente se define en función de las placas de aluminio utilizadas. La elución se lleva a cabo de la misma manera que en una placa pequeña de aluminio. Una vez realizada la cromatografía, el proceso de revelado consiste en observar la placa con luz ultravioleta (Figura 4), marcando todas las bandas para aislar el componente.



*Figura 4.- Observación a luz ultravioleta de una placa cromatográfica en capa fina.*

Sin embargo hay marcas o bandas que solo se observan pulverizando con un spray de disolución ácida  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:20:4). Para aislar el componente, se tallan unos milímetros de uno de los lados de la placa de arriba abajo, se pulveriza con el spray y tras unos 5 o 10 minutos en la estufa a  $120^\circ\text{C}$  estará revelada. En ese momento se compara con la placa bajo la luz ultravioleta y se trazan las líneas sobre las posibles marcas o bandas vistas sólo tras la pulverización.

Una vez delimitadas todas las bandas, se rallan y raspan con una espátula obteniendo toda la sílice de cada marca. Esta sílice será la que contenga el componente, por tanto para obtenerla debemos filtrarla con una solución más polar que el eluyente de la cromatografía, capaz de arrastrar el compuesto. El filtrado se realizará o bien con pequeñas columnas de destilación, o si el peso es bajo, para evitar pérdidas, con pipetas Pasteur, en las que se introduce algodón con una pequeña cantidad de arena purificada para facilitar la filtración. La solución utilizada en todos los casos para eluir la sílice obtenida será una solución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (6:14:1), de gran polaridad respecto a las utilizadas para eluir en la cromatografía.

### 7.5.5. Análisis espectroscópico.

Los compuestos fotoquímicos obtenidos se analizan mediante resonancia magnética nuclear, NMR.

La RMN es la técnica que más utilidad presenta en la determinación estructural de los compuestos orgánicos. Su base es la absorción de energía por un núcleo atómico que provoca transiciones entre niveles de energía nucleares o entre distintos estados del espín nuclear.

Muchos núcleos atómicos tienen espín nuclear I, su movimiento crea un campo magnético m. Pero no todos los núcleos se comportan así, para que se observe el isótopo debe tener I distinto a cero.

Los espectros fueron recogidos mediante la técnica de RMN con transformada de Fourier, a 300 MHz para protónicos ( $^1\text{H}$ ) y a 75 MHz para carbónicos ( $^{13}\text{C}$ ) en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) o cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) a  $25^\circ\text{C}$  con un equipo Varian Mercury 300 MHz (Figura 5). Las correlaciones heteronucleares de protones detectadas fueron medidas usando HSQC (optimizado para  $^1J_{\text{HC}} = 145 \text{ Hz}$ ) y HMBC (optimizado para  $^nJ_{\text{HC}} = 8 \text{ Hz}$ ).



*Figura 5.- Espectrómetro NMR Varian Mercury 300.*

Cada análisis se desarrollará con el disolvente en el que mejor se disuelva la muestra, pero siempre deuterado para no interferir en el espectro. La cubeta espectroscópica debe tener unos 3.5 cm de altura, por lo tanto se disolverá el compuesto en 600 µl de disolvente.

Los espectros que se recogerán serán de dos tipos: monodimensionales y bidimensionales.

Los monodimensionales serán aplicables a un grupo de núcleos ( $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ) en las moléculas para proporcionar información sobre la cantidad de protones o carbonos que contiene la molécula y la determinación de su entorno gracias a su desplazamiento químico. Aplicando una secuencia de pulsos se puede obtener el DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), un método útil para determinar la presencia de diferentes átomos de carbono como primario, secundario y terciario. Diferencia entre grupos CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> por variación del parámetro ángulo de selección. Aparecen los CH y CH<sub>3</sub> en una fase y en antifase los CH<sub>2</sub>.

Los espectros bidimensionales abarcan una gran variedad de ellos. Son secuencias de grupo en las que controlando la intensidad de la irradiación y el tiempo transcurrido entre pulsos se obtienen señales en las que la intensidad depende de las frecuencias de dos núcleos, que se relacionan por acoplamiento, efecto NOE o intercambio químico. Las señales que aparecen en estos espectros indican qué señal de un núcleo está acoplada con un núcleo de otro tipo.

- COSY: Correlation Spectroscopy, conjuntos de experimentos bidimensionales de correlación homonuclear. Las señales indican que los núcleos están acoplados directamente, 2 o 3 enlaces.
- NOESY: NOE Spectroscopy, se producen por correlación homonuclear por efecto NOE. Las señales indican núcleos que están próximos en el espacio, tanto si forman parte del mismo sistema de spin como si no.
- TOCSY: Total Correlation Spectroscopy, las señales determinan los núcleos pertenecientes a un mismo sistema de acoplamiento.
- HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy, es un método que detecta correlaciones heteronucleares a un enlace de distancia.
- HMBC: Heteronuclear Multiple-bond Correlation Spectroscopy, es un experimento de correlación heteronuclear. Las señales indican correlaciones a largas distancias, 2 o 3 enlaces.

- H2BC: Heteronuclear 2 Bond Correlation Spectroscopy, experimento que correlaciona átomos heteronucleares con dos enlaces de distancia.
- HSQC-TOCSY, experimento que combina un  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC con experimentos  $^1\text{H}$ -TOCSY para dar correlaciones a través del enlace  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a todos los demás  $^1\text{H}$  del conjunto.



## 8. RESULTADOS Y DISCUSION

### 8.1. Extracción sólido-líquido.

Los extractos obtenidos, sus pesos y los agrupamientos tras la extracción sólido-líquido (Figura 3), se muestran en la Tabla 1.

Extracción	Peso	
AcOEt	1,344 g	Reunidos en PVB/1
AcOEt	0,534 g	
EtOH	4,6 g	Reunidos en PVB/2
EtOH	3,7 g	
EtOH	2,6 g	
EtOH	1,9 g	
		14,2 g

Tabla 1.- Extracciones de la piel de *Prunus persica* cv *Vesuvio*.

### 8.2. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción acuosa PVB/2-1, en Amberlite.

Tras la cromatografía en Amberlite XAD sobre la fracción acuosa obtenida de la extracción líquido-líquido (Figura 3), se obtuvieron los siguientes pesos y fracciones (Tabla 2).

		Peso	
1,5 l MeOH	XAD-4	451,2 mg	PVB/3-1
1,5 l MeOH	XAD-7	476,5 mg	PVB/3-2

Tabla 2.- Fracciones acuosas obtenidas.

La fracción XAD-7 (sustancias húmicas) presenta mayor coloración y absorbancia específica que la fracción XAD-4 (ácidos hidrofílicos de bajo peso molecular), por tanto la fracción XAD-7 tiene mayores pesos moleculares medios. Ambas fracciones tienen contenidos similares de hidrógeno, carbono y oxígeno, sin embargo la fracción XAD-4 tiene un mayor contenido en nitrógeno. También presenta mayor carácter alifático y mayor contenido en grupos carboxilos que la fracción XAD-7.

### 8.3. Cromatografía de PVBA/1 en Sephadex LH-20.

El resultado de los pesos obtenidos para las distintas fracciones de la cromatografía Sephadex LH-20 para la muestra PVBA/1 (Figura 3) se muestra en la Tabla 3.

PVBA/1			
Fracciones	Peso	Eluyente	
2-3	10,5 mg		PVBA/16
4-5	162,8 mg		PVBA/2
6-7	48,3 mg		PVBA/6
8	9,2 mg	20%	PVBA/15
9-10	13,4 mg	MeOH/H <sub>2</sub> O	PVBA/17
11-17	25,8 mg		PVBA/18
18-21	10,2 mg		
22-29	13,7 mg		
30-36	11,5 mg		
37-41	9,8 mg	40%	
42-47	6,7 mg	MeOH/H <sub>2</sub> O	
47-51	10,3 mg		
52-68	11,7 mg	60%	
69-76	8,2 mg	MeOH/H <sub>2</sub> O	PVBA/3
77-88	8,9 mg	80% MeOH/H <sub>2</sub> O	
89-139	72,7 mg	80% y 100% MeOH/H <sub>2</sub> O	

*Tabla 3.- Fracciones, pesos y transferencias de la fracción PVBA/1.*

Sobre las fracciones obtenidas, se realizan cromatografías en capa fina, y en base a esos resultados se decide llevar a cabo otra cromatografía o purificar la fracción.

La fracción PVBA/3 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 13:7:2 (Tabla 4).

PVBA/3	
Fracciones	Peso
1	1,7 mg
2	3,0 mg

*Tabla 4.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/3.*

La fracción PVBA/15 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:2 (Tabla 5).

PVBA/15	
Fracciones	Peso
1	1,3 mg
2	1,0 mg
3	1,3 mg
4	0,9 mg
5	1,6 mg
6	1,8 mg
7	2,0 mg
8	-

*Tabla 5.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/15.*

La fracción PVBA/16 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:3 (Tabla 6).

PVBA/16	
Fracciones	Peso
1	2,1 mg
2	3,2 mg
3	1,8 mg
4	1,5 mg
5	0,8 mg

*Tabla 6.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/16.*

La fracción PVBA/17 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo dos veces con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:3 (Tabla 7).

PVBA/17	
Fracciones	Peso
1	0,9 mg
2	2,6 mg
3	1,3 mg
4	1,4 mg
5	-

*Tabla 7.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/17.*

La fracción PVBA/18 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa PLC semipreparativa, eluyendo una sola vez con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:2 (Tabla 8).

PVBA/18	
Fracciones	Peso
1	3,6 mg
2	1,5 mg
3	3,9 mg
4	1,1 mg
5	1,0 mg
6	1,7 mg

*Tabla 8.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/18.*

#### **8.4. Cromatografía de PVBA/2 en C-18.**

La fracción PVBA/2, obtenida en la cromatografía de PVBA/1 en Sephadex LH-20 (Tabla 3) se carga en una cromatografía en columna C-18, obteniéndose los pesos y fracciones que se indican en la Tabla 9:

PVBA/2			
Fracciones	Peso	Eluyente	
2-8	6,4 mg		
9-10	68,8 mg		
11-14	21,5 mg		
15-16	10,3 mg		
18-24	16,0 mg		
25-30	5,1 mg	20% MeOH/H <sub>2</sub> O	PVBA/8
31-40	2,8 mg		
41-48	16,3 mg		
49-57	10,5 mg		PVBA/5
58-64	4,7 mg		PVBA/4
65-91	8,6 mg		PVBA/7
92-114	9,9 mg	40% MeOH/H <sub>2</sub> O	
UF	24,1 mg		

*Tabla 9.- Fracciones, pesos y transferencias de la fracción PVBA/2.*

La fracción PVBA/4 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 13:7:2 (Tabla 10).

PVBA/4	
Fracciones	Peso
1	2,7 mg
2	2,4 mg
3	0,9 mg
4	2,1 mg
5	1,7 mg

*Tabla 10.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/4.*

La fracción PVBA/5 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa PLC semipreparativa, eluyendo una sola vez con una disolución CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 13:7:2 (Tabla 11).

PVBA/5	
Fracciones	Peso
1	4,4 mg
2	3,7 mg
3	2,8 mg
4	-
5	-

*Tabla 11.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/5.*

La fracción PVBA/7 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 13:7:2 (Tabla 12).

PVBA/7	
Fracciones	Peso
1	1,2 mg
2	2,5 mg
3	6,5 mg
4	3,7 mg

*Tabla 12.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/7.*

La fracción PVBA/8 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 14:6:1 (Tabla 13).

PVBA/8	
Fracciones	Peso
1	1,4 mg
2	2,7 mg
3	1,1 mg
4	1,6 mg

*Tabla 13.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/8.*

### 8.5. Cromatografía de PVBA/6 en C-18.

La fracción PVBA/6 obtenida en la cromatografía de PVBA/1 en Sephadex LH-20 (Tabla3) se sometió a cromatografía en fase inversa C-18 obteniéndose los pesos y fracciones que se indican en la Tabla 14:

PVBA/6			
Fracciones	Peso	Eluyente	
2-3	6,5 mg	10% MeOH/H <sub>2</sub> O	PVBA/10
4-5	4,9 mg		
6-7	2,5 mg		PVBA/11
8-10	4,2 mg		
11-13	2,0 mg	20% MeOH/H <sub>2</sub> O	PVBA/12
14-18	6,2 mg		PVBA/14
19-51	14,4 mg		PVBA/9
52-59	2,8 mg		
60-64	6,0 mg	40% MeOH/H <sub>2</sub> O	PVBA/13
65-71	5,5 mg		
72-73	2,7 mg		
74	1,0 mg		
75	0,8 mg	60% MeOH/H <sub>2</sub> O	
76	2,1 mg		
77	1,1 mg		
78	1,0 mg		
79-80	1,0 mg	60% MeOH/H <sub>2</sub> O	
81-111	8,2 mg		
UF	4,8 mg		

*Tabla 14.- Fracciones, pesos y transferencias de la fracción PVBA/6.*

La fracción PVBA/9 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 13:7:2 (Tabla 15).

PVBA/9	
Fracciones	Peso
1	1,3 mg
2	1,2 mg

*Tabla 15.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/9.*

La fracción PVBA/10 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:2 (Tabla 16).

PVBA/10	
Fracciones	Peso
1	2,7 mg
2	3,2 mg

*Tabla 16.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/10.*

La fracción PVBA/11 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:2 (Tabla 17).

PVBA/11	
Fracciones	Peso
1	0,8 mg

*Tabla 17.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/11.*

La fracción PVBA/12 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:2 (Tabla 18).

PVBA/12	
Fracciones	Peso
1	1,5 mg

*Tabla 18.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/12.*

La fracción PVBA/13 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 13:7:2 (Tabla 19).



PVBA/13	
Fracciones	Peso
1	1,7 mg
2	2,4 mg
3	1,1 mg

*Tabla 19.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/13.*

La fracción PVBA/14 se diluyó en metanol y se punteó sobre una placa TLC analítica, eluyendo una sola vez con una disolución CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 13:7:4 (Tabla 20).

PVBA/14	
Fracciones	Peso
1	1,5 mg
2	2,4 mg
3	1,3 mg

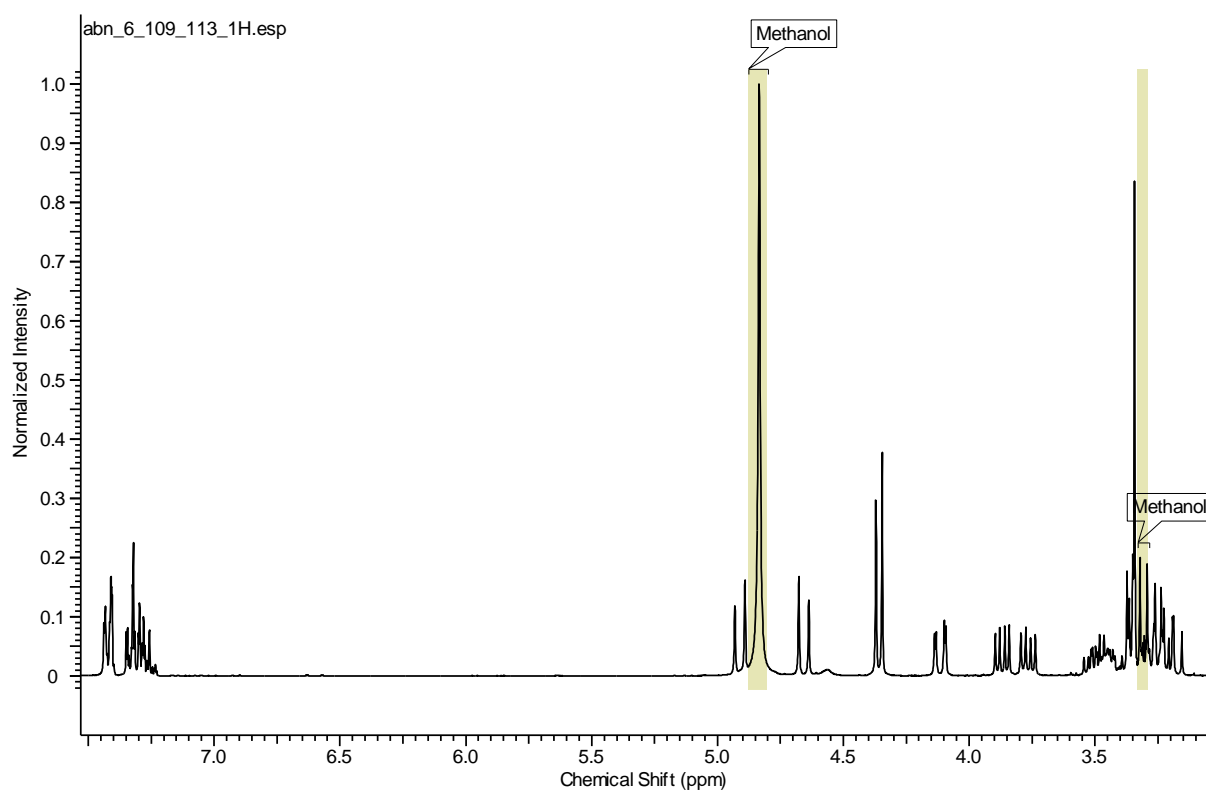
*Tabla 20.- Fracciones y pesos de la fracción PVBA/14.*

## **8.6. Identificación espectroscópica.**

De todas las fracciones obtenidas se logró identificar un número de ellas que a continuación se describen.

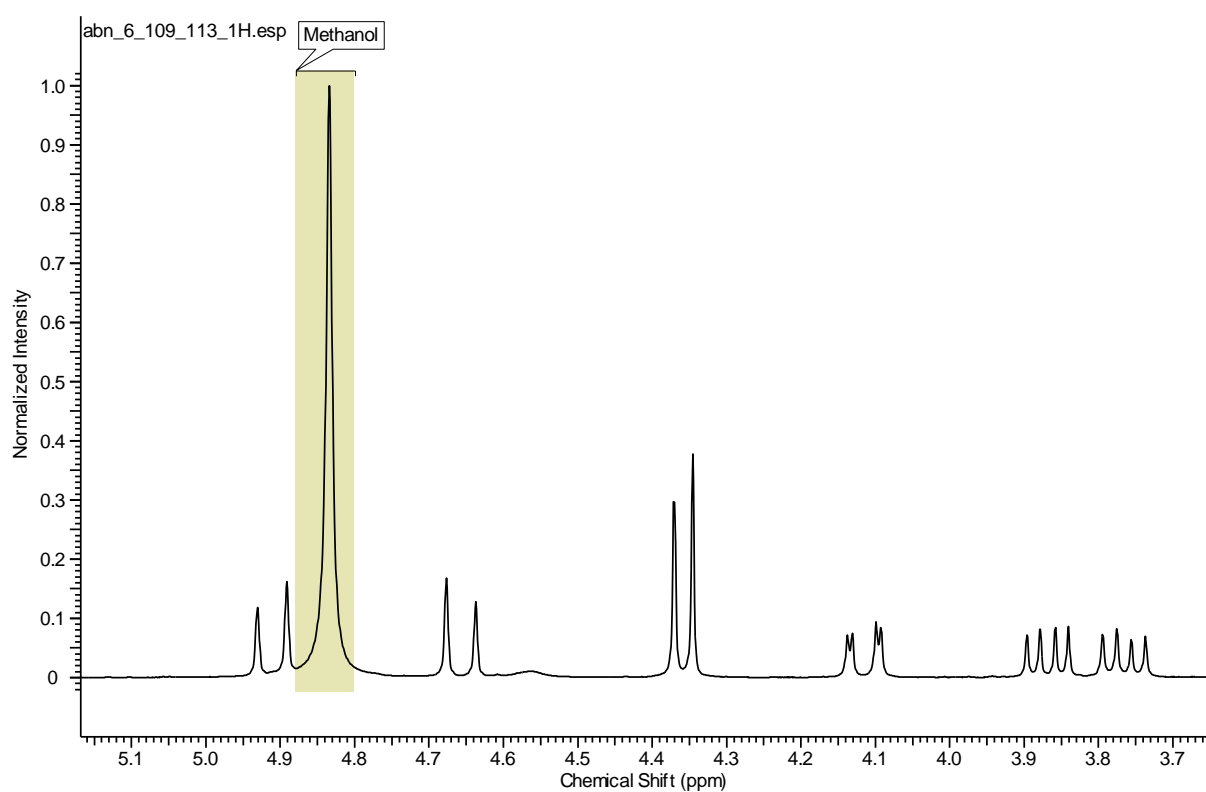
### **8.6.1. Fracción PVBA/4/3.**

El estudio de la fracción PVBA/4/3, proveniente de la cromatografía en fase inversa C-18 realizada sobre la fracción PVBA/2 (Tablas 9 y 10), se realizó con CD<sub>3</sub>OD, metanol deuterado. Con un desplazamiento químico de  $\delta$  7.35 se observan 5 protones aromáticos (Figura 6), pertenecientes al mismo anillo que será por tanto un anillo monosustituido debido a la proximidad de señales.



*Figura 6.- Espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/4/3.*

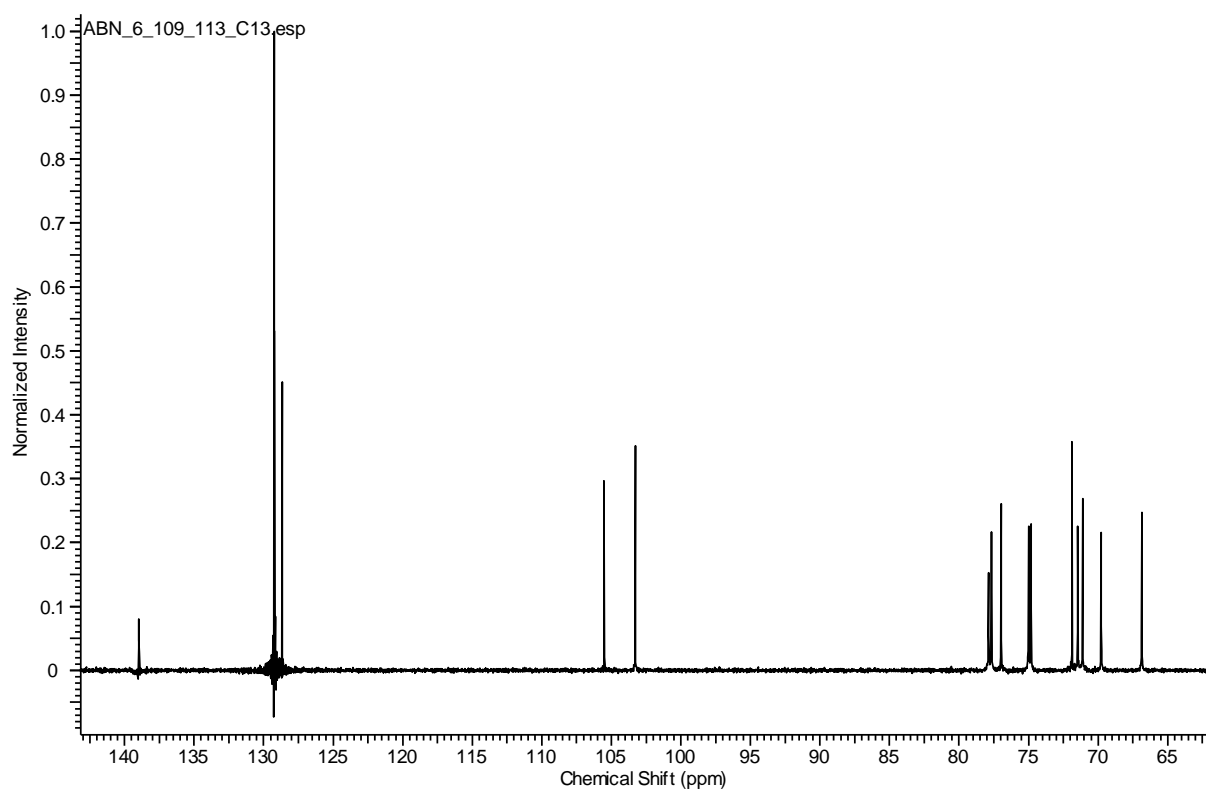
De la misma forma se observan a  $\delta$  4.66 y  $\delta$  4.91 las señales de dos protones metilenos diastereotópicos (Figura 7), en forma de dos dobletes. A su vez se identifican dos protones anoméricos coincidentes en  $\delta$  4.34, como se puede observar en la Figura 7.



*Figura 7.- Ampliación del espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/4/3.*

Estos datos en principio indicarían la presencia de dos compuestos alicíclicos.

En el espectro NMR <sup>13</sup>C (Figura 8), se observan los 6 carbonos aromáticos que habíamos previsto anteriormente, con los cinco carbonos no sustituidos en un desplazamiento alrededor de  $\delta$  129, y el carbono sustituido del anillo a  $\delta$  139.



*Figura 8.- Espectro NMR carbónico general de la fracción PVBA/4/3.*

Observamos en  $\delta$  105.5 y  $\delta$  103.3 dos carbonos probablemente unidos a dos heterotermos. A su vez en la región  $sp^3$  se encuentran varias señales que se identificarán mejor con el espectro DEPT (Figura 9).

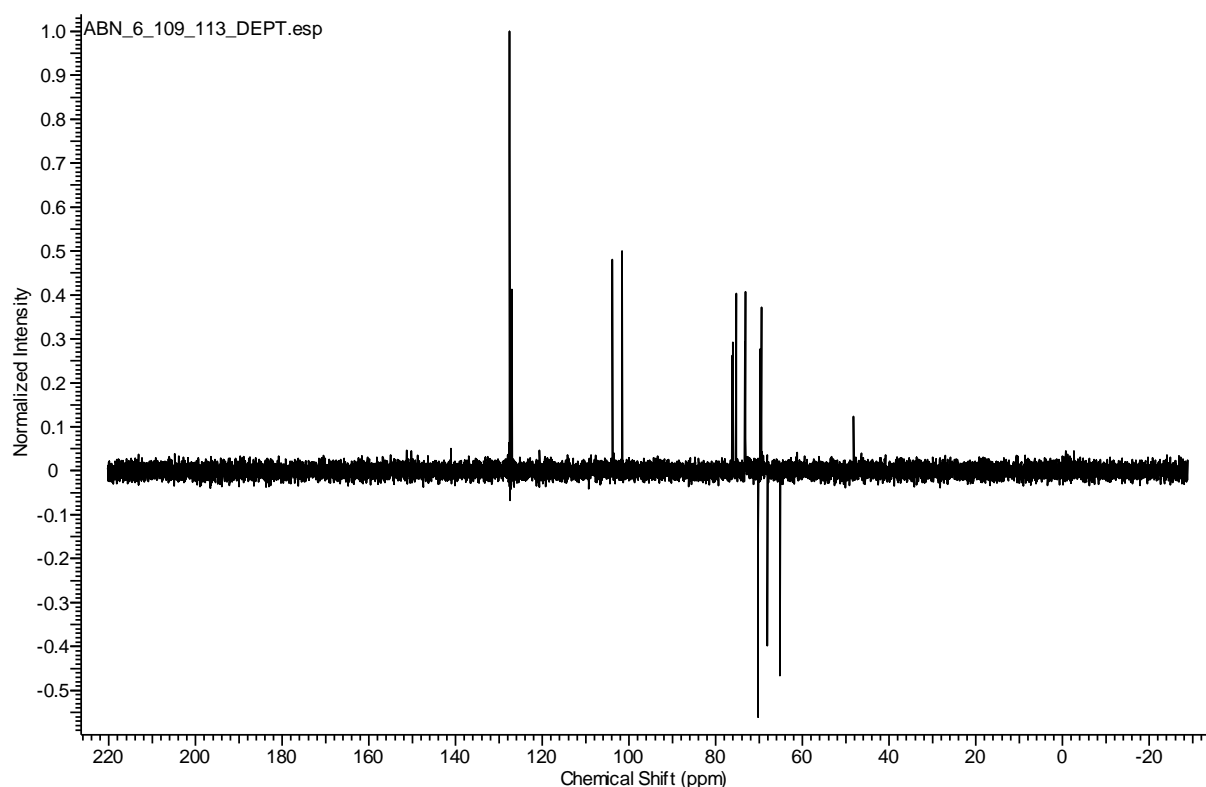


Figura 9.- Espectro NMR DEPT de la fracción PVBA/4/3.

Comparando con el espectro  $^{13}\text{C}$ , habrá tres carbonos metilénicos ( $\text{CH}_2$ ) a  $\delta$  71.9,  $\delta$  69.8 y  $\delta$  66.9. Mientras que el resto de señales, debido a sus altos desplazamientos, estarán probablemente relacionados a heteroátomos.

Las correlaciones heteronucleares de estos carbonos las controlaremos con el experimento HSQC (Figura 10 y Figura 11), que proporcionará relaciones directas  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

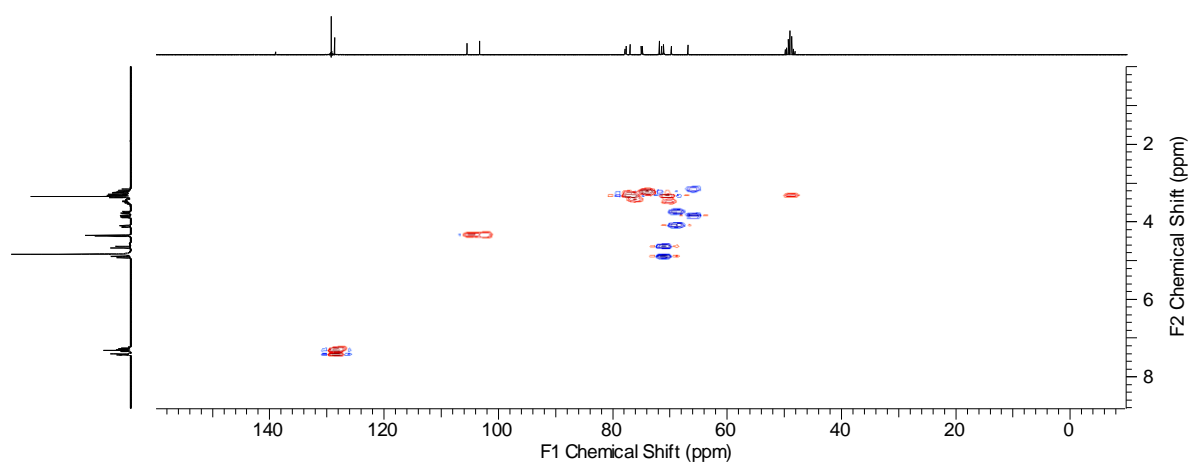


Figura 10.- Espectro HSQC de la fracción PVBA/4/3.

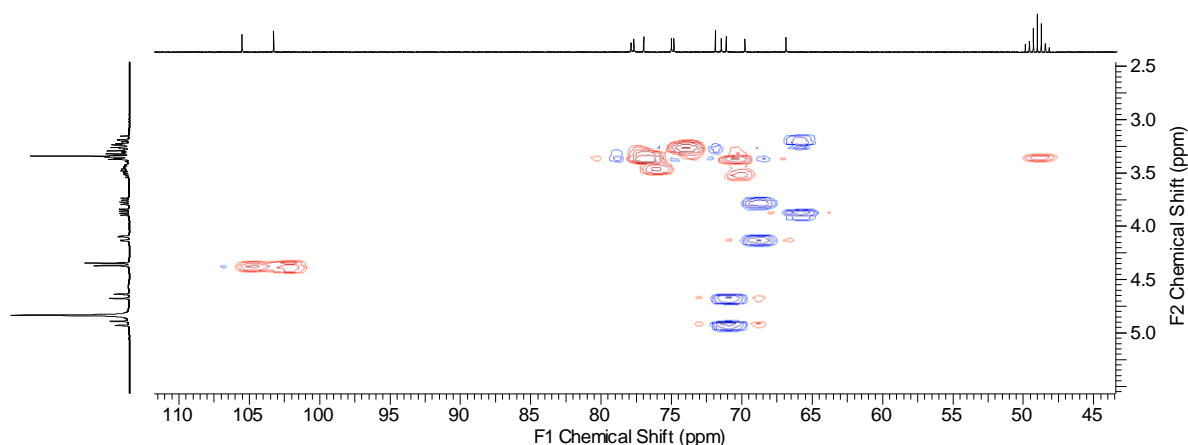


Figura 11.- Ampliación del espectro HSQC de la fracción PVBA/4/3.

Observamos como los protones metilénicos diastereotópicos descritos anteriormente a  $\delta$  4.66 y  $\delta$  4.91 correlacionan con el metileno de mayor desplazamiento,  $\delta$  71.9. Esto indica un menor apantallamiento de este metileno respecto a los otros, con lo que probablemente esté a continuación del anillo aromático, formando seguramente un alcohol bencílico.

Se identifican 4 protones metilénicos como dos dobletes de dobletes en  $\delta$  4.12 y  $\delta$  3.77 correlacionados con el carbono en  $\delta$  69.8 y dos dobletes de dobletes en  $\delta$  3.87 y  $\delta$  3.20 en correlación con el carbono en  $\delta$  66.9.

El espectro HSQC-TOCSY (Figura 12 y Figura 13), evidencia por la región sacárida, la presencia de dos restos de hexosas, relacionados con los 4 protones metilénicos a  $\delta$  4.12 y  $\delta$  3.77.

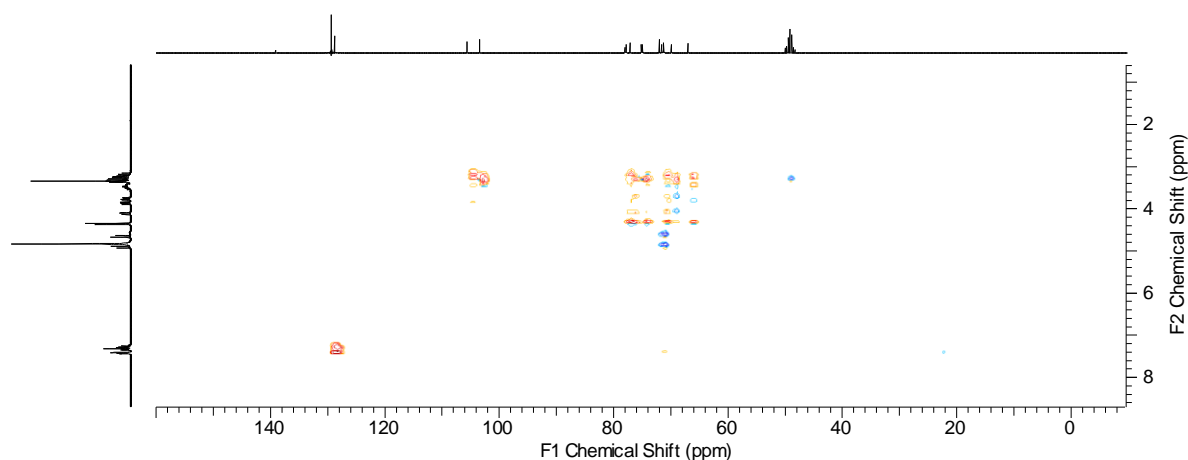


Figura 12.- Espectro HSQC-TOCSY de la fracción PVBA/4/3.

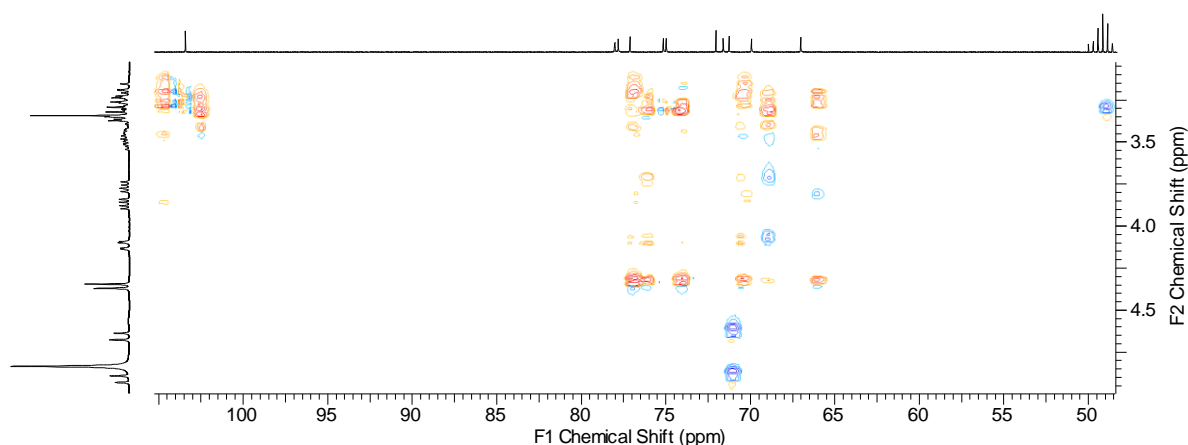


Figura 13.- Ampliación del espectro HSQC-TOCSY de la fracción PVBA/4/3.

Teniendo clara la presencia de dos hexosas, sus valores de desplazamiento en el espectro carbónico están en concordancia con la presencia de dos glucosas (Figura14).

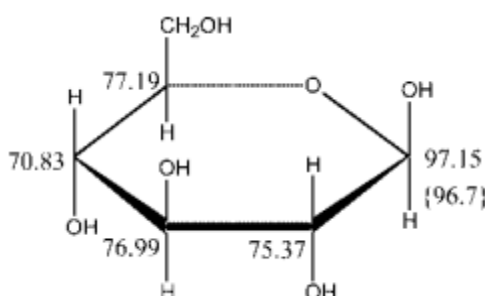


Figura 14.- Desplazamientos tabulados de  $\beta$ -D-Glucosa.

Por tanto los carbonos anoméricos corresponderán con los valores en  $\delta$  105.5 y  $\delta$  103.3. Para determinar finalmente la unión entre las subunidades detectadas observamos el experimento HMBC (Figuras 15 y 16), que nos mostrará las heterocorrelaciones lejanas.

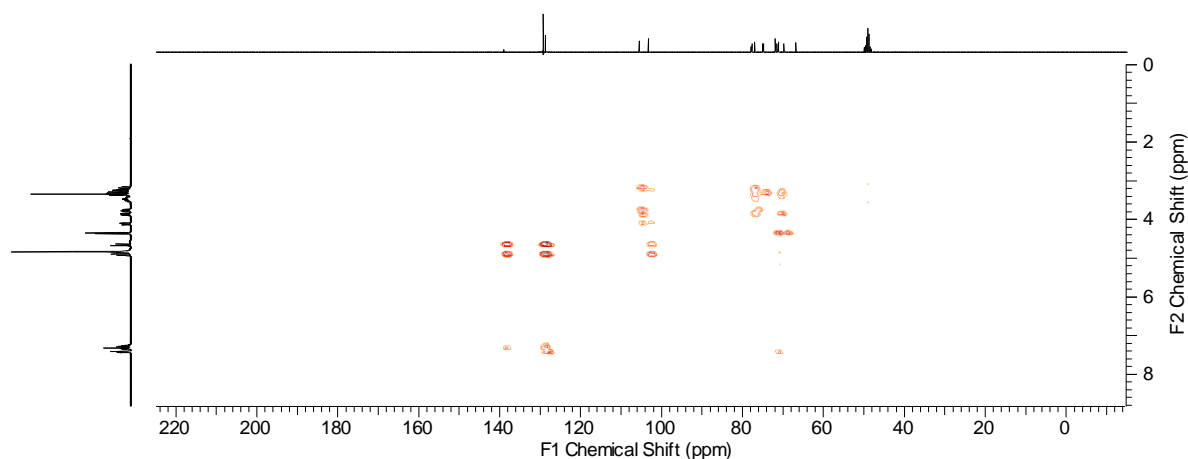


Figura 15.- Espectro HMBC de la fracción PVBA/4/3.

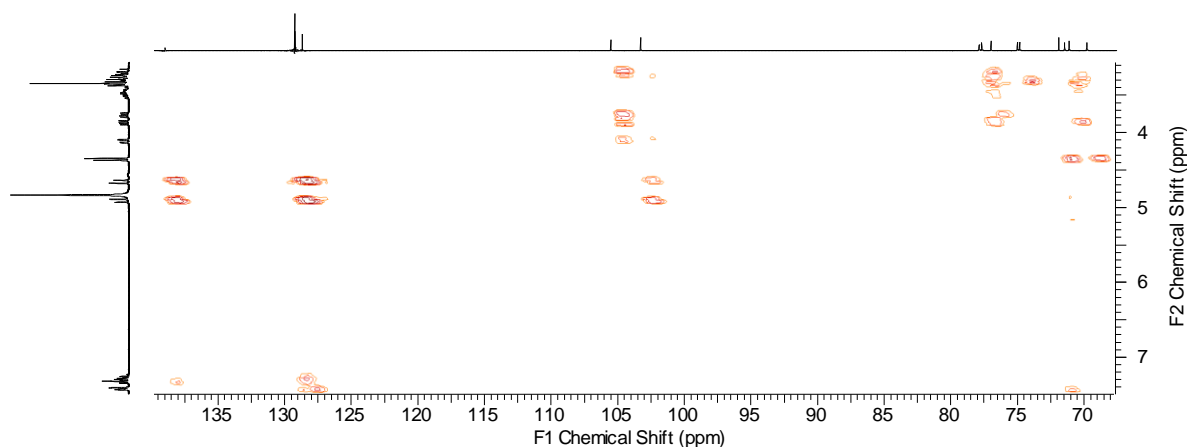


Figura 16.- Ampliación del espectro HMBC de la fracción PVBA/4/3.

El carbono anomérico del primer azúcar en  $\delta$  103.3 muestra una correlación con los protones del carbono metilénico resultante del alcohol bencílico que se deberá formar con el anillo aromático y un azúcar. Mientras que el segundo carbono anomérico en  $\delta$  105.5 está en correlación con los protones de la primera glucosa.

Se observa como los carbonos metilénicos en  $\delta$  71.9 y  $\delta$  69.8 correlacionan con los protones anoméricos, el segundo será de la primera glucosa, ligada al alcohol bencílico.

Tras esta deducción se llega a la única posibilidad del alcohol bencílico glicosilato denominado bencil- $\beta$ -D-gentiobiosido (Figura 17).

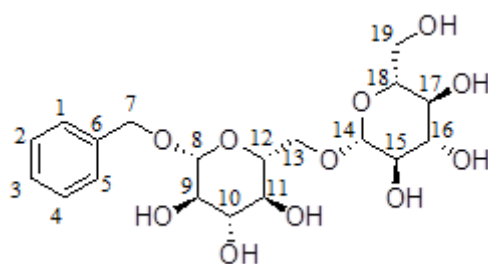


Figura 17.- Estructura final del compuesto PVBA/4/3.

Estructurada la molécula, establecemos los desplazamientos carbónicos (Tabla 21):



C	$\delta$	CH	$\delta$	CH <sub>2</sub>	$\delta$
6	138,9	1	128,7	7	71,9
		2	129,3	13	69,8
		3	129,2	19	66,9
		4	129,3		
		5	128,7		
		8	103,3		
		9	74,8		
		10	77,0		
		11	71,1		
		12	77,7		
		14	105,5		
		15	77,0		
		16	75,0		
		17	71,5		
		18	77,9		

Tabla 21.- Desplazamientos químicos asignados en  $^{13}\text{C}$  al compuesto PVBA/4/3.

De esta forma comparamos su concordancia con una base de datos de metabolitos (Biological Magnetic Resonance Data Bank). Aunque no serán exactos, se pueden comparar con los datos correspondientes a la gentiobiosa y al alcohol bencílico (Figura 18 y Tabla 22).

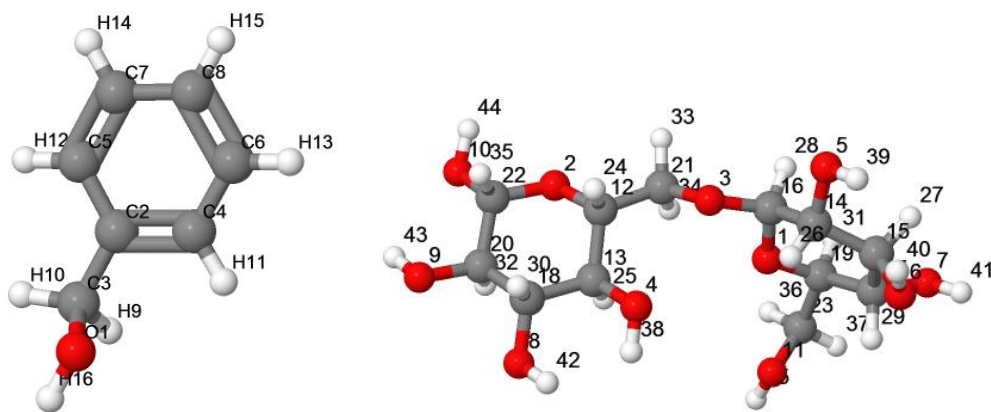


Figura 18.- Moléculas de alcohol bencílico y  $\beta$ -gentiobiosa tabuladas.

Assigned Peak ID	atom ID	shift	Assigned Peak ID	atom ID	shift
1	C2	142.887	1	C16	105.3979
2	C4	131.482	2	C22	98.6873
2	C5	131.482	3	C22	94.8421
2	C6	131.482	4	C19	78.6321
2	C7	131.482	5	C15	78.3387
2	C8	131.482	5	C18	78.3387
3	C4	130.588	6	C12	77.589
3	C5	130.588	7	C20	76.7283
3	C6	130.588	8	C14	75.7944
3	C7	130.588	9	C20	75.3619
3	C8	130.588	10	C18	74.1171
4	C4	130.236	11	C12	73.1497
4	C5	130.236	12	C17	72.3108
4	C6	130.236	13	C13	72.1797
4	C7	130.236	14	C13	72.1344
4	C8	130.236	15	C21	71.5182
5	C3	66.633	16	C21	71.3567
			17	C23	63.42

Tabla 22.- Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  experimentales en alcohol bencílico y gentiobiosa.

Comprobamos la similitud de los resultados, si bien es cierto que no deben ser totalmente precisos, debido a la diferencia de apantallamiento que producirán ambas subunidades entre sí.

Conociendo la estructura anterior compuesta de dos glucosas y un anillo aromático, nos servirá como base para identificar próximos compuestos.

Asimismo, continuando con la estructuración de compuestos se hallaron dos metabolitos primarios. En ambos casos, ambos conocidos y tabulados, únicamente con el espectro protónico será posible su identificación.

### 8.6.2. Fracción PVBA/8/4

El estudio de la fracción PVBA/8/4, proveniente de la cromatografía en fase inversa C-18 (Tablas 9 y 13), se realizó con  $\text{CD}_3\text{OD}$ , metanol deuterado.

Observamos varias señales aromáticas en  $\delta$  7.31, identificables como 5 protones, referentes a un ciclo aromático monosustituido, debido a la proximidad de las señales (Figura 19).

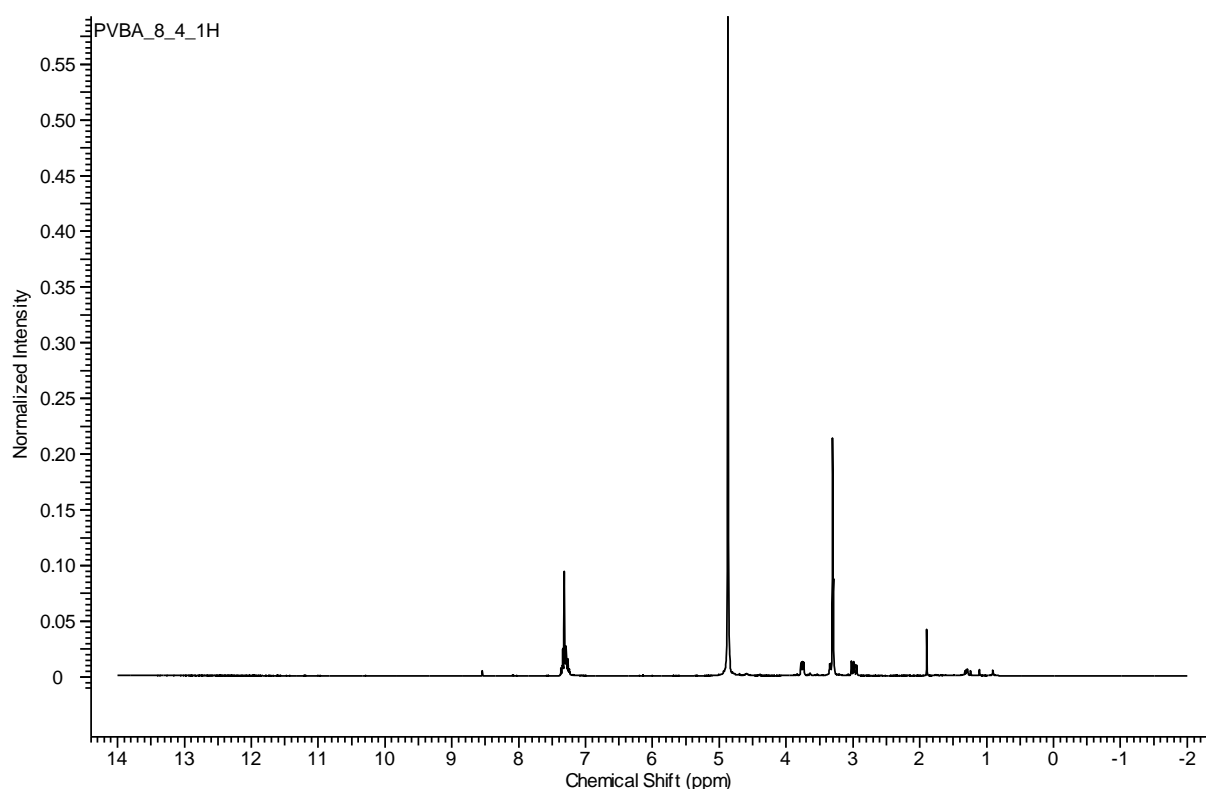
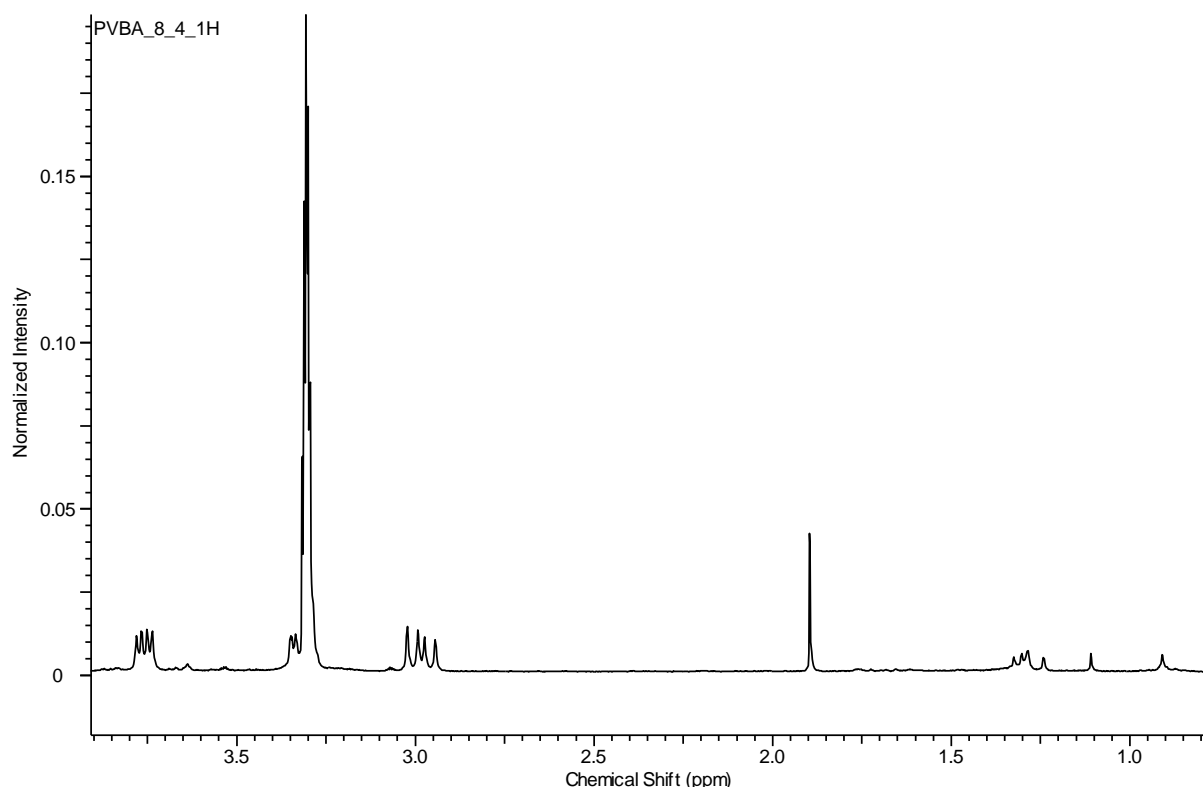


Figura 19.- Espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/8/4.

A un desplazamiento de  $\delta$  3.76 se advierte un doblete de doblete, correspondiente a un protón acoplado a dos protones muy similares, con este alto desplazamiento, estará relacionado directamente con dos grupos, amino, alcohol u ácido carboxílico (Figura 20).

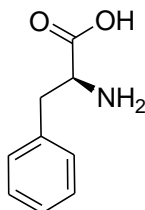


*Figura 20.- Ampliación del espectro NMR protónico de la fracción PVBA/8/4.*

También se perciben en  $\delta$  3.32 y  $\delta$  2.98 dos dobletes de dobletes, el primero solapado con la señal del metanol, cuya constante de acoplamiento es la misma. Serán dos protones diastereotópicos de un carbono metilénico. Este  $\text{CH}_2$  estará por tanto relacionado tanto con el anillo aromático como con el CH anterior.

Fijándonos en los desplazamientos más bajos, encontramos una señal a  $\delta$  1.90, la cual se podría corresponder a una amina primaria, ligada al CH, del protón con mayor desplazamiento. Considerando esta pesquisa, ese protón estará relacionado a su vez con un ácido carboxílico debido a su apantallamiento.

Este resultado está en concordancia con el ácido 2-amino-3-fenilpropanoico, más comúnmente conocido como fenilalanina (Figura 21).



*Figura 21.- Estructura final del compuesto PVBA/8/4.*

Para corroborar el resultado obtenido se empleará base de datos BMRB (Figura 22 y Tabla 23) y el libro *Determinación estructural de compuestos orgánicos* como desplazamientos teóricos (Figura 23).

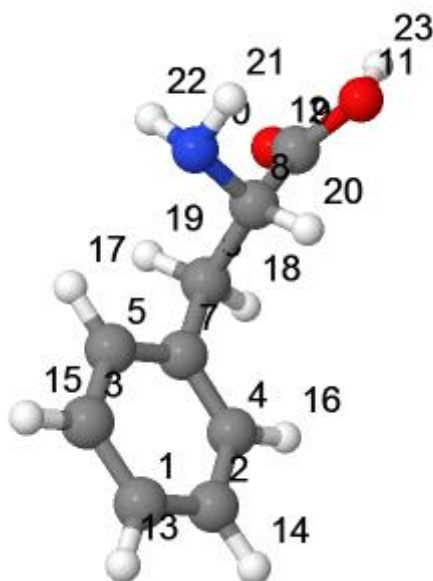


Figura 22.- Estructura de la fenilalanina.

H13	8.471
H14	8.505
H15	8.533
H16	8.420
H17	9.081
H18	3.674
H19	3.824
H20	4.317
H21	1.803
H22	1.235
H23	6.218

Tabla 23.- Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  experimentales en la fenilalanina.

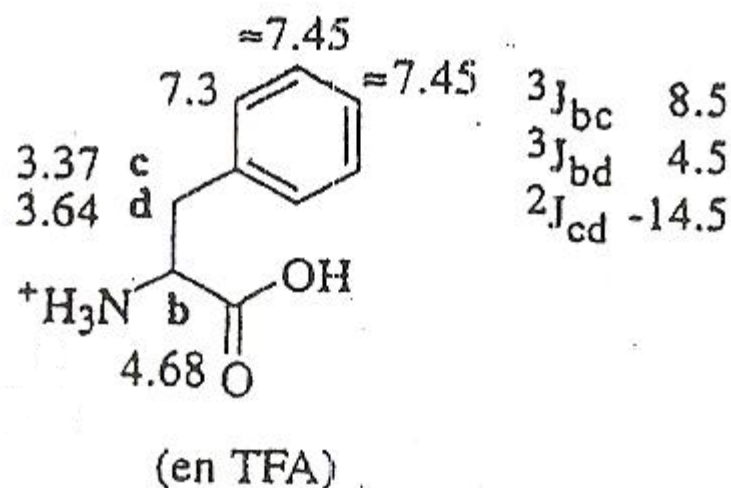


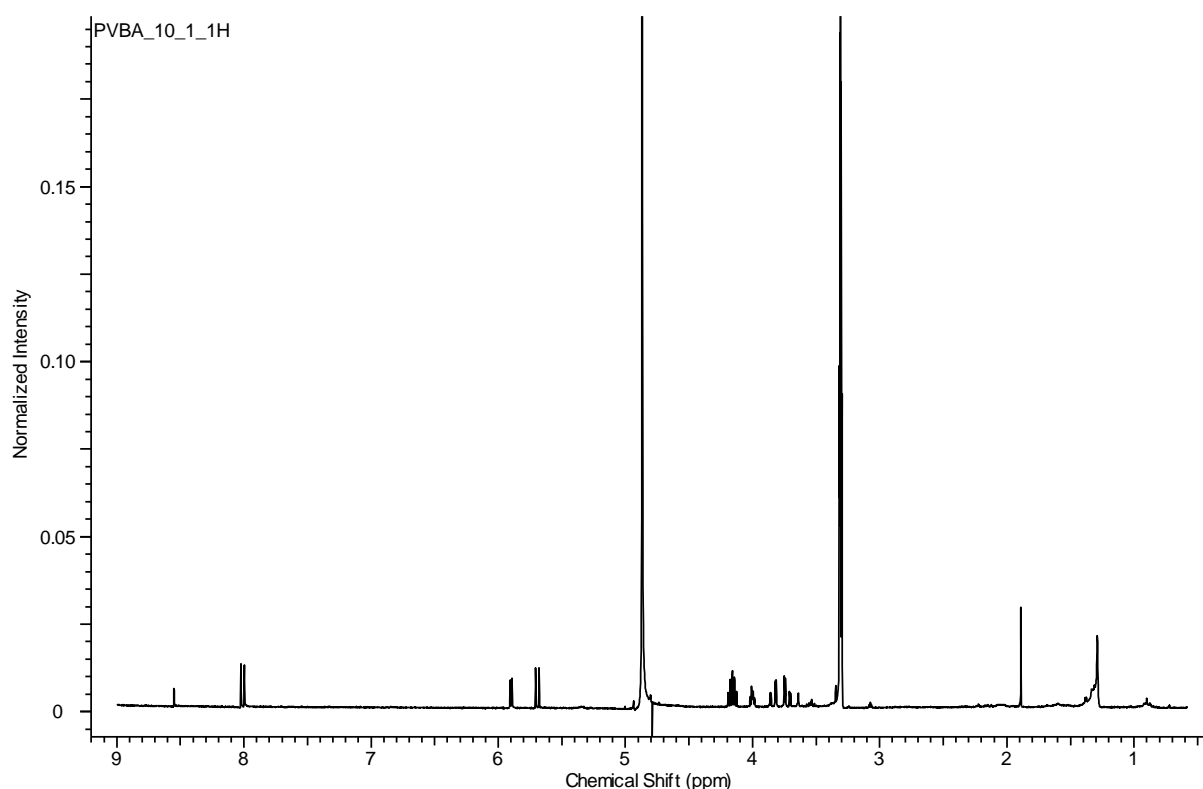
Figura 23.- Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y constantes de acoplamiento en la fenilalanina.

Los datos representados se asemejan de forma general al espectro que debería ser, si bien es cierto que el disolvente empleado en el análisis puede variar los desplazamientos y comparando con los desplazamientos teóricos, no encajan a la perfección.

El aminoácido fenilalanina presenta importante beneficios para la salud como bloquear ciertas enzimas del sistema nervioso central que degradan hormonas naturales que actúan como analgésicos endógenos. Por ello es efectiva para el dolor de espalda, dolores menstruales, migrañas u osteoartritis. Realiza funciones en el organismo como aliviar el dolor, como estimulante cerebral, regulador del ritmo cardíaco y mejora la memoria (<http://www.rdnatural.es/>).

### 8.6.3. Fracción PVBA/10/1.

El estudio de la fracción PVBA/10/1, obtenida de la cromatografía en fase inversa C-18 realizada sobre la fracción PVBA/6 (Tablas 3 y 14), se realizó con  $\text{CD}_3\text{OD}$ , metanol deuterado. Se obtuvo el espectro NMR  $^1\text{H}$  indicado en la Figura 24.



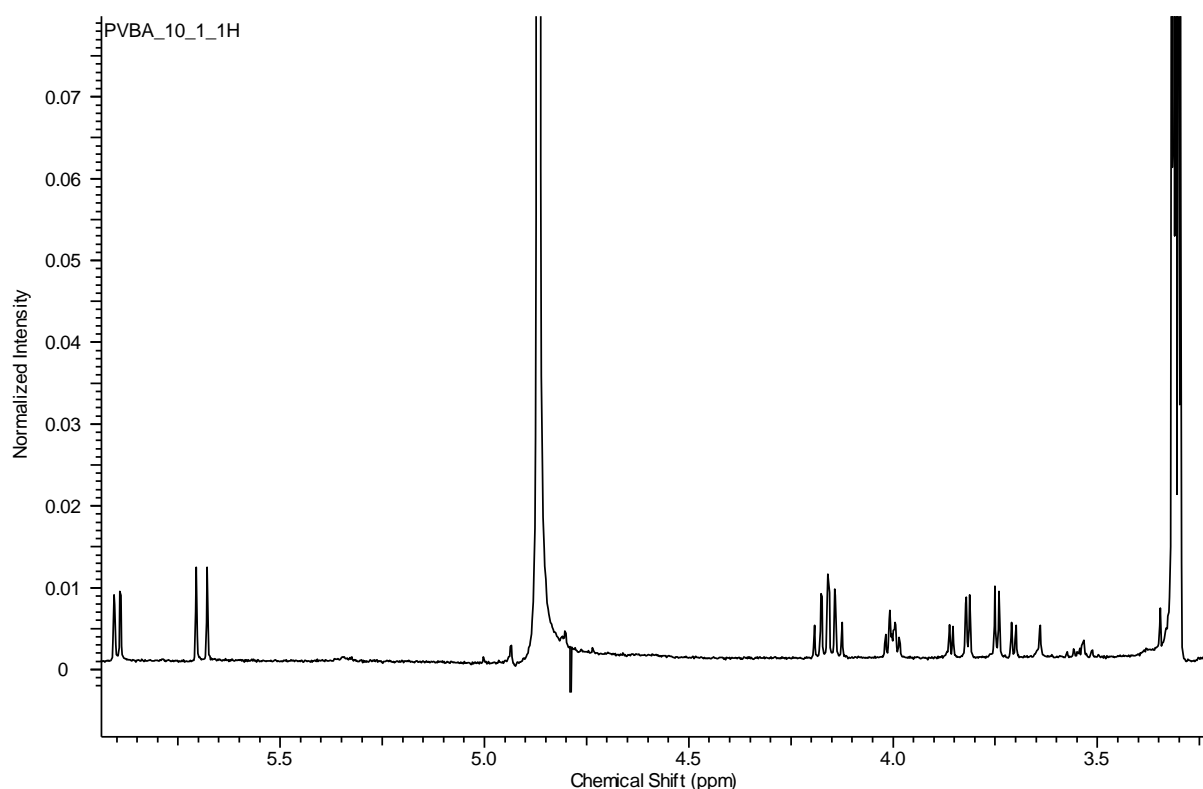
*Figura 24.- Espectro NMR protónico de la fracción PVBA/10/1.*

Se advierte una pequeña señal a  $\delta$  1.89, que podría ser debida a una amina.

A su vez, percibimos dos dobletes relacionados entre sí, ya que tienen la misma constante de acoplamiento, el primero de ellos en  $\delta$  8.01 y el segundo en  $\delta$  5.69. Esta situación, y el alto desplazamiento de ambos, indican una relación a través de un doble enlace entre sus respectivos carbonos, estando el primero relacionado también con un heteroátomo y el segundo indirectamente a una cetona.

Ampliando el espectro (Figura 25), observamos otro doblete, a un desplazamiento  $\delta$  5.90, sin correlación con los anteriores, luego seguramente esté relacionado con dos heteroátomos.

Por tanto se podría decir que formarán una relación cíclica de 6 eslabones, en la que entre dos carbonos se sitúa un doble enlace y a continuación una cetona seguida de una amina, que se enlazará a través de una nueva cetona



*Figura 25.- Ampliación del espectro NMR protónico de la fracción PVBA/10/1.*

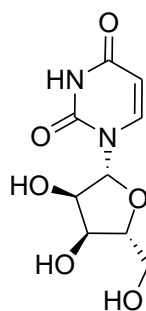
Dicho doblete en  $\delta$  5.90 se encuentra relacionado por su constante de acoplamiento con la señal múltiple en  $\delta$  4.16, señal correspondiente a dos protones, relacionados entre ellos, cuyas señales se solapan. Sus constantes de acoplamiento están también correlacionadas con la señal a  $\delta$  4.00. Por tanto estos 4 eslabones estarán correlacionados formando un heterociclo, con un oxígeno probablemente debido al desplazamiento tan alto de  $\delta$  5.90, que unirá con la otra subunidad por el nitrógeno de la misma.

A  $\delta$  3.84 y  $\delta$  3.72 se observan dos dobletes de dobletes, correlacionados por la constante de acoplamiento más grande y con la señal a  $\delta$  4.00 ambos también, son dos protones metilénicos, unidos al carbono cíclico del protón  $\delta$  4.00 lógicamente.

Se perciben también varias señales a  $\delta$  3.64,  $\delta$  3.53 y  $\delta$  3.35, que se podrían corresponder con tres protones de alcoholes relacionados con los últimos eslabones citados.

Por tanto se tendría una molécula con dos subunidades, la primera un heterociclo con dos heteroátomos, y la segunda en ciclo de 5 eslabones con un oxígeno y 3 alcoholes (Figura 26).

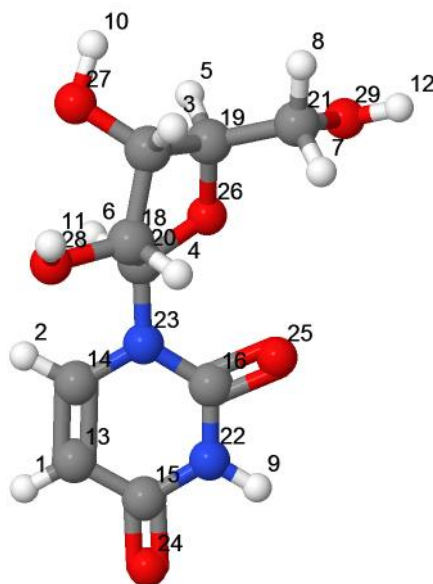




*Figura 26.- Estructura final del compuesto PVBA/10/1.*

Esta estructura se corresponde con  $\beta$ -D-ribofuranosil uracilo, conocida como uridina.

De nuevo comparamos los resultados obtenidos con la base de datos BMRB (Figura 27 y Tabla 24).



*Figura 27.- Estructura de la uridina.*

Shift ID	Atom ID	Chemical shift	Ambiguity	Theoretically calculated chemical shifts		
1	H1	5.887	1			
2	H2	7.878	1	Shift ID	Atom ID	Value
3	H3	4.222	1	1	H1	6.826
4	H4	4.344	1	2	H2	8.222
5	H5	4.126	1	3	H3	4.368
6	H6	5.908	1	4	H4	5.767
7	H7	3.907	2	5	H5	4.963
8	H7	3.800	2	6	H6	5.794
9	H8	3.907	2	7	H7	4.791
10	H8	3.800	2	8	H8	4.485
				9	H9	7.364
				10	H10	0.862
				11	H11	2.839
				12	H12	2.776

Tabla 24.- Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  experimentales y teóricos en la uridina.

La presencia de uridina en los alimentos también se ha relacionado con efectos beneficiosos para la salud. Varios ensayos clínicos con pacientes con cáncer indican que la suplementación con este compuesto puede ayudar a contrarrestar los efectos tóxicos de la quimioterapia. A su vez, muestra efectos beneficiosos nootrópicos que incluyen la mejora de la memoria de trabajo y la inteligencia fluida, lo que puede conducir a la reducción del estrés, la ansiedad, y posiblemente síntomas de los trastornos obsesivos compulsivos (Nagar et al. 2006).

#### 8.6.4. Fracción PVBA/11/1.

El estudio de la fracción PVBA/11/1, proveniente de la cromatografía en fase inversa C-18 realizada sobre la fracción PVBA/6 (Tablas 3 y 14) se realizó con  $\text{CD}_3\text{OD}$ , metanol deuterado. Se obtuvo el espectro NMR  $^1\text{H}$  indicado en la Figura 28.

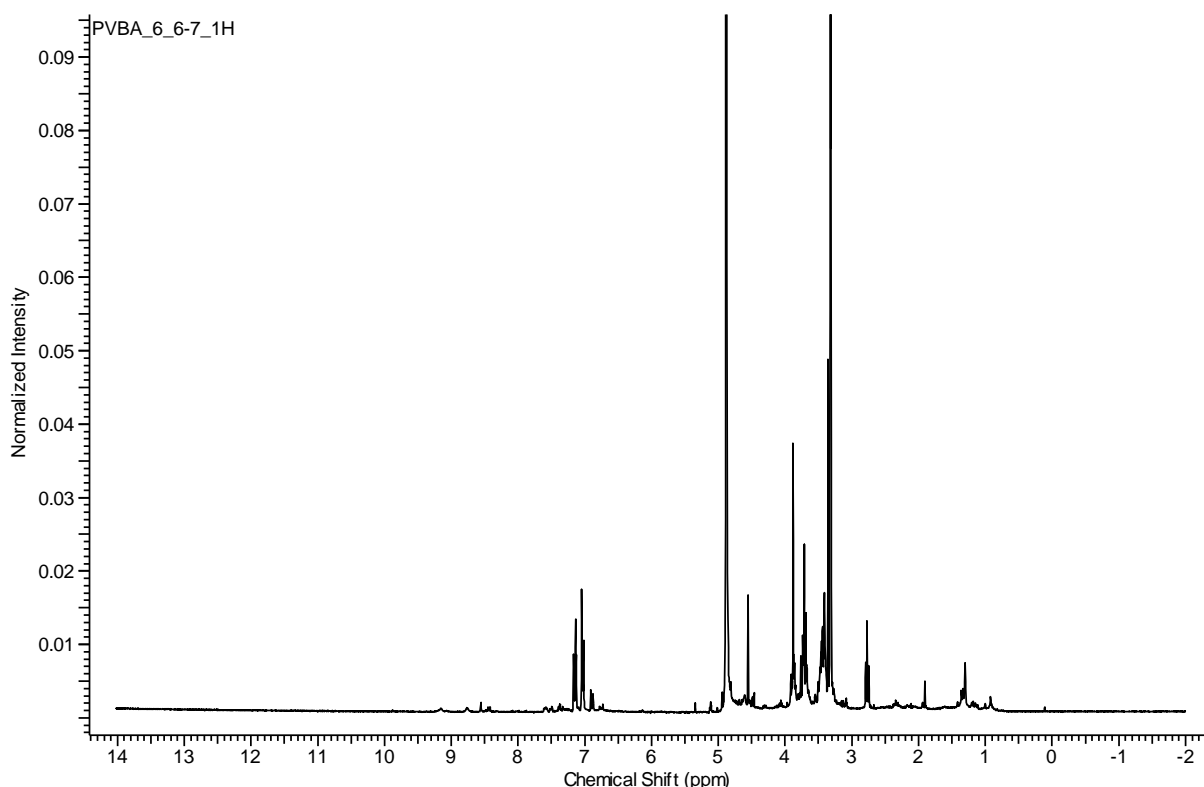
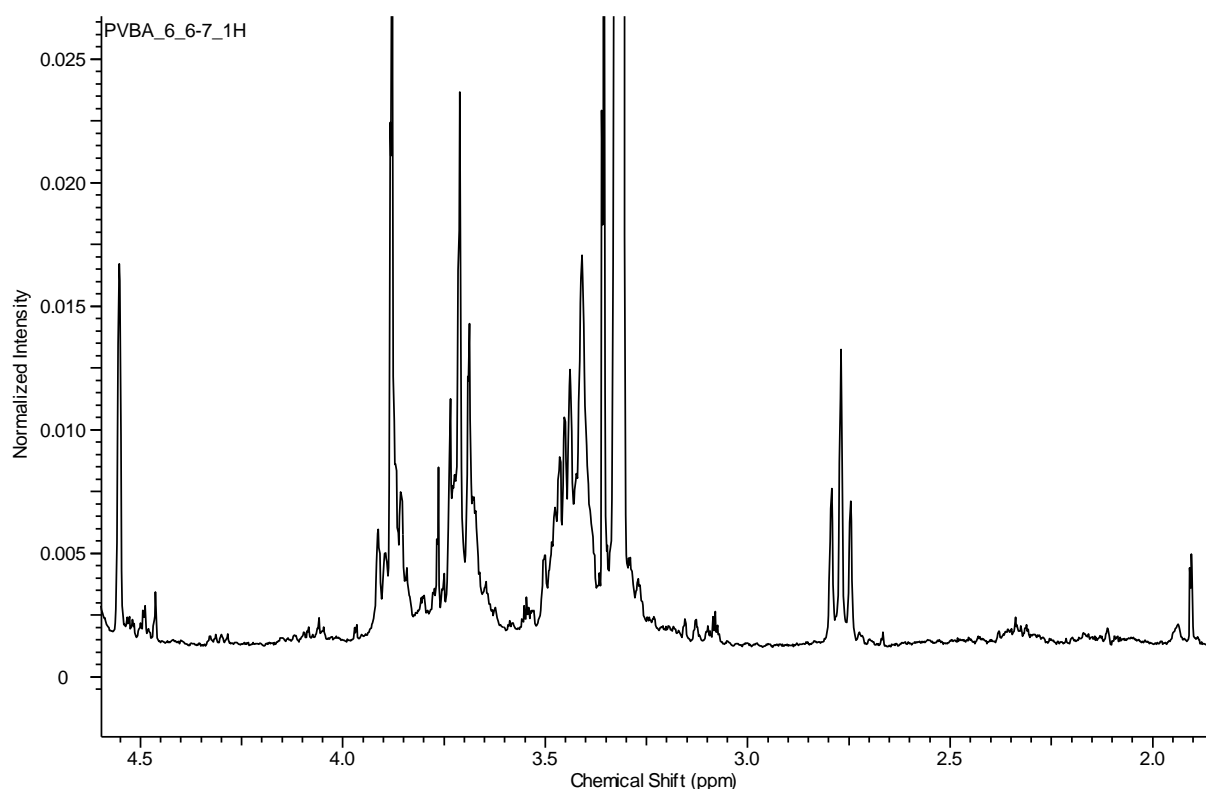


Figura 28.- Espectro NMR protónico general de la fracción PVBA/11/1.

Observamos varias señales aromáticas en  $\delta$  7.03 y  $\delta$  7.14, identificables como 3 protones, referentes a un ciclo aromático trisustituido, debido a la diferencia entre las señales, una más separada de las otras dos, será una sustitución 1, 2, 4. A desplazamientos inferiores de  $\delta$  2.00 se observan señales correspondientes a protones OH.

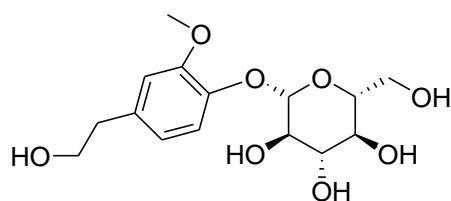
Ampliando el espectro (Figura 29), observamos tres tripletes, señales de dos protones metilénicos cada una de ellas, el primero  $\text{CH}_2$  de ellos a  $\delta$  3.88 sin relación ninguna con los otros dos. De la misma forma, las señales en  $\delta$  4.55 y los multipletes que se perciben entre  $\delta$  3.90 y  $\delta$  3.30, correspondientes a varios protones correlacionados entre ellos son característicos de la glucosa. Por tanto el primer  $\text{CH}_2$ , corresponde con el carbono metilénico de dicha glucosa.



*Figura 29.- Ampliación del espectro NMR protónico de la fracción PVBA/11/1.*

Los otros dos tripletes a  $\delta$  3.71 y  $\delta$  2.77 tienen la misma constante de acoplamiento, por tanto formarán parte de la misma cadena, un etanol debido al alto desplazamiento.

Con estos datos se llega a un anillo aromático trisustituido, por un lado mediante un enlace glucosídico, por otro etanólico y por ultimo a través de un radical éter, debido al carácter radical de estas moléculas (Figura 30). Por tanto la estructura corresponde a un glucósido fenólico.



*Figura 30.- Estructura final del compuesto PVBA/11/1.*

Los glucósidos fenólicos, debido a su actividad antioxidante, presentan efectos beneficiosos sobre enfermedades crónicas e infecciosas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y tumorales (Leborgne et al. 2002).

## 9. CONCLUSIONES

1. Mediante varias extracciones y cromatografías, a partir de la piel de melocotón se han obtenido diversas fracciones que contienen fitoquímicos.
2. Por medio de técnicas cromatográficas en columna y en placa se han conseguido aislar cuatro de los fitoquímicos presentes en la piel de melocotón.
3. A través de diversas técnicas espectroscópicas RMN se han identificado los siguientes compuestos aislados: bencil- $\beta$ -D-gentiobiosido, fenilalanina, uridina y un glucósido fenólico.
4. El estudio de extractos de plantas comestibles como el melocotón, tiene gran importancia para identificar compuestos con una gran diversidad de actividades biológicas, entre ellas la antioxidante, beneficiosas para la salud humana.
5. El melocotón Vesuvio es un alimento funcional, que contiene componentes biológicamente activos que pueden ser beneficiosos para la salud, reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades.

## 10. BIBLIOGRAFIA

**Cantín, C. M.; Moreno, M. A.; Gogorcena, Y.** Evaluation of the Antioxidant Capacity, Phenolic Compounds, and Vitamin C Content of Different Peach and Nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] Breeding Progenies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, 4586-92.

**Carbonaro, M.; Mattera, M.; Nicoli, S.; Bergamo, P.; Cappelloni, M.** Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 5458-62.

**Cefarelli, G.; D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Mastellone, C.; Pacifico, S.; Piscopo V.** Free radical scavenging and antioxidant activities of reddened cv. annurca apple fruits. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 2006, 54, 803–809.

**Dabrio, M. V. y col.** *Cromatografía y electroforesis en columna* 2000, Barcelona, Springer.

*European Food Information Council, EUFIC*

**Fernández-Prida, C.** *Análisis fotoquímico forestal* 1976, Escuela técnica superior de ingenieros de montes.

**Fiorentino, A.; D'Abrosca, B.; Pacifico, S.; Mastellone, C.; Piscopo V.; Caputo, R.; Monaco, P.** Isolation and Structure Elucidation of Antioxidant Polyphenols from Quince (*Cydonia vulgaris*) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008 56, 2660–2667.

**Giménez, J. J.; Expósito, J. M.** *RMN para químicos orgánicos* 1998, Almería.

*Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA.*

**Kim, H.K., Choi, Y.H.; Verpoorte, R.** NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* 2010, 5, 536–549.

**Kim, Y.; Koo, B.; Gong, D.; Lee, Y.; Ko, J.; Kim, C.-H.** Comparative effect of *Prunus persica* L. BATSCH-water extract and tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride) on concentration of extracellular acetylcholine in the rat hippocampus. *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 87, 149-154.

**Leborgne, L.; Mazière, J. C.; Mazière, C.; Andrejak, M.** Oxidative stress, atherogenesis and cardiovascular risk factors. *Arch. Maladies du Coeur et des Vaisseaux* 2002, 95, 805-814.

**Liu, R. H.** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2003, 78, 517–520.

**Lurie, S.; Crisosto, C. H.** Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biol Technol* 2005, 37(3):195–208

**Marcano, D.; Hasegawa, M.** *Fitoquímica Orgánica* 2002, Caracas U.C.V.

**Nagar, S.; Remmel, R, P.** Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cáncer. *Oncogene* 2006, 25, 1659–1672.

**Pickering, W. F.** *Química analítica moderna* 2010, Reverté.

**Piccolella, S.; Fiorentino, A.; Pacifico, S.; D'Abrosca, B.; Uzzo, P.; Monaco, P.** Antioxidant Properties of Sour Cherries (*Prunus cerasus* L.): Role of Colorless Phytochemicals from the Methanolic Extract of Ripe Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 1928–1935.

**Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affoter, C.; Herrera, A.; Martínez, R.** *Determinación estructural de compuestos orgánicos* 2002, Elsevier España.

**Shin, T.Y.; Park, S.B.; Yoo, J.S.; Kim, I.K.; Lee, H.S.; Kwon, T.K.; Kim, M.K.; Kim, J.C.; Kim, S.H.** Anti-allergic inflammatory activity of the fruit of *Prunus persica*: role of calcium and NF-kappaB. *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48, 2797-2802.

**Toshiyuki, F.; Hideyuki, I.; Teruo, M.; Harukuni, T.; Hoyoku, N.; Takashi, Y.** Anti-tumor Promoting Effect of Glycosides from *Prunus persica* Seeds. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, 26(2) 271—273.

**Ulrich, E. L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J. F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y. E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D. E.; Wenger, R. K.; Yao, H.; Markley, J. L.** *Nucleic Acids Research* 36, D402-D408 (2008) doi: 10.1093/nar/gkm957.

**Young Ha, K.; He, E. Y.; Byung, K. P.; Moon, Y. H.; Byoung, K. J.; Hyun Pyo, K.** The extract of the flowers of *Prunus persica*, a new cosmetic ingredient, protects against solar ultraviolet-induced. *J. Cosmet. Sci. (January/February 2002)*, 53, 27-34.



## **11. WEBGRAFIA**

<http://www.agricoltura.regione.campania.it/>

<http://www.bmrw.wisc.edu/>

<http://www.istat.it> (Istat, Istituto nazionale di statistica).

<http://nootriment.com/>

<http://www.rdnatural.es/>

<http://www.shodex.net/>

<http://www.ual.es/>

<http://www.zipmec.com/>