

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**PERFIL FITOQUÍMICO COMPARATIVO DE DOS ESPECIES DE *Vitis vinífera L.*
RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A PATÓGENOS.**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Eliana Karina Prieto Piña, para optar al título de Licenciada en Química.

Caracas, Mayo 2013

Yo Profesora Alírica Suarez Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora María Lupe Márquez Investigadora del Centro de Síntesis Macromolecular y Organometálica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“Perfil fitoquímico comparativo de dos especies de *Vitis vinífera* resistente y susceptible a patógenos”

Que presenta la Br. Eliana Prieto C.I. 16.923.974, para aspirar al título de Licenciado en Química, se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2012 y 2013 y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo 2013.

Dra. Alírica Suarez
(Tutor)

Dra. María Lupe Márquez
(Tutor)

RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe el estudio fitoquímico comparativo de dos especies de *Vitis vinífera* resistente (EPVVR) y susceptible (EPVVS) a patógenos.

Del extracto metanólico que se obtuvo a partir de las hojas de cada especie, se realizaron las particiones para obtenerse los extractos de hexano, cloroformo, acetato de etilo, y acuoso. Una vez obtenido dichos extractos, se llevó a cabo un análisis comparativo a través de la técnica de Cromatografía de Capa Fina tanto en una dimensión como en dos dimensiones. Se separaron a través de Cromatografía en Columna, los extractos de cloroformo de ambas especies.

Se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de cada uno de los extractos obtenidos por partición. En los resultados de los ensayos biológicos se evidenció que no hubo una diferencia considerable en la actividad para cada uno de los extractos analizados entre las dos especies. Sin embargo, los extractos acuosos presentaron una modesta actividad frente a una bacteria distinta; en vista de ello se procedió a separar por Cromatografía en Columna en fase reversa el extracto acuoso de la especie susceptible (EPVVSA) y el extracto acuoso de la especie resistente (EPVVRA). Al ser analizadas por RMN las muestras obtenidas por Cromatografía en Columna de los extractos acuosos, se encontró en el extracto acuoso de la especie susceptible la presencia de dos sacáridos (tetrasacárido y un trisacárido). De igual manera en el extracto acuoso de la especie resistente se aisló una estructura de tipo trisacárido.

En vista de todos los análisis que se realizaron, no observamos diferencias considerables desde el punto de vista químico y biológico entre ambas especies de *Vitis vinífera* (resistente y susceptible).

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: “Perfil fitoquímico comparativo de dos especies de *Vitis vinífera* resistente y susceptible a patógenos”, presentado por la Br. Eliana Karina Prieto Piña, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.

Dra. Alírica Suárez
(Tutora)

Dra. María Lupe Márquez
(Tutora)

Dra. María Rodríguez
(Jurado)

Dra. Beth Díaz
(Jurado)

Dedicatoria

A mis padres, hermanos y sobrinos

Los quiero muchísimo y son mi Vida...

También dedicada al Prof. Armando Ramírez

Eliana K Prieto P

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar por agradecerle a Dios quien me ha guiado a lo largo de mi carrera brindándome sabiduría y confianza de que este gran día llegaría a mi vida. A mis Padres Mercedes y Domingo, quienes me dieron su apoyo incondicionalmente desde el primer día que comencé mi carrera, además de brindarme su ayuda. Sin ellos no sería lo que hoy en día soy. Los amo!

También agradecer a mis hermanos Erika y Argenis que también están en la dedicatoria de mi tesis, ya que siempre estuvieron allí para todo lo que necesitara, dándome ánimos en cada semestre para aprobar mis materias. A mis bellos sobrinos Barbra, Sophia, Sarah y Sergio que son mi gran alegría.

A mi novio Rubén gracias por tus consejos, compañía, ayuda incondicional, por sobretodo formar parte de tu vida, y tener fé en mí. Gracias mi calvito bello. Te amo!

A mis amigos José Cornejo, Yosmar, Leidy, Luisa y Jóeneth (CSP), Dhayezka, Alejandra, Luimar, Mónica, Betzabet, Mimi por estar pendiente en todo momento de mi carrera y compartir tanto alegrías como tristezas juntos, y a mi gran amigo David (Miguelucho). Con ellos me reí hasta el cansancio y compartí momentos inolvidables. Los quiero mucho.

Gracias a la ilustre Universidad Central de Venezuela, que sin lugar a duda es una gran Casa de Estudios, y por tanto me siento muy orgullosa de haberme formado en ella. Aunque me vaya podré decir a donde vaya que soy una ucevista con mucho orgullo y felicidad.

Al profesor Armando Ramírez, que lamentablemente hoy no está con nosotros. Él me aceptó en una tesis que lamentablemente no pudo ser llevada a cabo. Hoy en día le dedico también a él esta nueva tesis con muchísimo cariño.

Esta tesis ha sido lograda gracias a la dedicación y al apoyo de mi Tutora principal Alírica Suárez, quien desde que me brindó tesis en su lugar de trabajo, me ayudó muchísimo con sus enseñanzas y consejos para llevar a cabo la culminación de mi tesis. No olvidaré esos momentos bonitos que compartimos juntas en el laboratorio.

De igual manera a mi segunda tutora María Lupe Márquez quien también me brindó su apoyo y gran ayuda. Gracias por estar allí.

A la Dra Beth y a la Dra Katy quienes me brindaron incondicionalmente su ayuda y estuvieron siempre a la orden para cualquier duda que surgiera a lo largo de mi tesis. Con ellas me reí muchísimo en el laboratorio, y compartí momentos muy lindos.

Tampoco olvido a las personas que conocí en la Universidad, quienes me brindaron risas, y momentos especiales.

Gracias !!!

ÍNDICE GENERAL.

Resumen.....	iii
Agradecimientos.....	vi
Índice de figuras.....	xi
Índice de esquemas.....	xiii
Índice de tablas.....	xiv
Índice de Anexos.....	xv
Lista de Abreviaturas y Símbolos.....	xvi
I. Introducción.....	1
I.1 Familia Vitaceae.....	3
I.1.1 Clasificación taxonómica.....	4
I.2 Género <i>Vitis</i>	5
I.3 Enfermedades de la Vid.....	5
I.3.1 Podredumbre Gris de la Uva (<i>Botrytis cinerea</i>).....	6
I.3.2 Oídio (<i>Uncinula necator</i>).....	7
I.3.3 Mildiu (<i>Plasmopara vitícola</i>).....	9
I.3.4 Eutipiosis (<i>Eutypa lata</i>).....	11
I.3.5 Yesca (<i>Phellinus igniarius</i> y <i>Stereum hirsutum</i>).....	13
II. Antecedentes.....	14
II.1 Componentes activos.....	14
II.2 Aplicaciones Terapéuticas.....	22
II.3 Aplicaciones Culinarias.....	23
II.4 Resistencia y susceptibilidad a patógenos en <i>Vitis vinífera</i>	24

III. Justificación.....	30
IV. Objetivos.....	31
IV.1 Objetivo General.....	31
IV.2 Objetivos Específicos.....	31
V. Parte Experimental.....	32
V.1 Equipos.....	32
V.2 Materiales y reactivos.....	32
V.3 Procedimiento Experimental.....	33
V.3.1 Colecta del material vegetal.....	33
V.3.2 Extracción.....	33
V.3.3 Evaporación.....	35
V.3.4 Particiones.....	35
V.3.5 Cromatografía de Capa Fina (CCF).....	38
V.3.6 Cromatografía en Columna (CC).....	38
V.3.7 Ensayos Biológicos.....	38
V.4 Resultados y Discusión.....	39
V.4.1 Porcentajes p/p de los extractos obtenidos para cada especie.....	39
V.4.2 CCF para determinar las condiciones de separación.....	40
V.4.2.1 Extractos de Hexano.....	40
V.4.2.2 Extractos de Cloroformo.....	42
V.4.2.3 Extractos de Acetato de Etilo.....	44
V.4.2.4 Extractos Acuosa.....	45

V.4.3 CCF comparativos de las especies resistente y susceptible en una y dos dimensiones.....	47
V.4.3.1 Para los extractos de Hexano: EPVVRH y EPVESH En 1 Dimensión.....	47
En 2 Dimensiones.....	49
V.4.3.2 Para los extractos de Cloroformo: EPVVR y EPVSC En 1 Dimensión.....	50
En 2 Dimensiones.....	54
V.4.4 Cromatografía en Columna (CC) para los extractos de Cloroformo de la especie resistente y de la especie susceptible (EPVVR y EPVSC).....	57
V.4.4.1 Para la especie susceptible (EPVSC).....	57
V.4.4.2 Para la especie resistente (EPVVR).....	58
V.4.4.3 CCF comparativo para las muestras obtenidas tanto en la especie susceptible como en la especie resistente.....	60
V.4.5 Ensayos Biológicos.....	62
V.4.6 Cromatografía en Columna (CC) en fase reversa, para los extractos acuosos de la especie resistente y de la especie susceptible. (EPVVR y EPVSA).....	64
V.4.6.1 Para la especie susceptible (EPVSA).....	65
V.4.6.2 Para la especie resistente (EPVVR).....	70
VI.- Conclusiones.....	74
VII. Recomendaciones.....	75
VIII. Bibliografía.....	76

Índice de figuras

Figura 1. Hojas de <i>Vitis vinífera</i>	3
Figura 2. Planta de <i>Vitis vinífera</i>	4
Figura 3. Racimo infectado por <i>Botrytis cinerea</i>	7
Figura 4. Racimo infectado por <i>Uncinula necator</i>	8
Figura 5. Hojas infectadas por <i>Uncinula necator</i>	8
Figuras 6 y 7. Daño en el fruto, ocasionado por <i>Plasmopara vitícola</i>	10
Figura 8. Hojas infectadas por <i>Plasmopara vitícola</i>	10
Figura 9. Hojas infectadas por <i>Eutypa lata</i>	12
Figura 10. Ramas muertas de la vid a causa de <i>Eutypa lata</i>	12
Figuras 11 y 12. Hojas y troncos afectados por la enfermedad Yesca.....	14
Figura 13. Medicamento a base de resveratrol y <i>Vitis vinífera</i>	23
Figura 14. Comida turca con hojas de <i>Vitis vinífera</i>	24
Figura 15. Rotavapor.....	35
Figura 16. CCF de los extractos de hexano de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: hexano.....	40
Figura 17. CCF de los extractos de hexano de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: 7:3 Hexano/Cloroformo.....	41
Figura 18. CCF de los extractos de hexano de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: Cloroformo.....	42
Figura 19. CCF de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: Cloroformo.....	43
Figura 20. CCF de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: 99:1 Cloroformo/Metanol.....	43
Figura 21. CCF de los extractos de Acetato de Etilo de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: 9:1 Acetato de Etilo/Metanol.....	44

Figura 22. CCF en fase reversa de los extractos de Acetato de Etilo de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: 8:2 Acetato de Etilo/Metanol.....	45
Figura 23. CCF del extracto Acuoso de la especie resistente, con fase móvil: Acetato de Etilo/Metanol y revelador: p-anisaldehído.....	45
Figura 24. CCF del extracto Acuoso de la especie susceptible, con fase móvil: 9:1 Acetato de Etilo/Metanol y revelador: p-anisaldehído.....	46
Figura 25. CCF comparativo de los extractos de Hexano de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: 7:3 Hexano/Cloroformo.....	48
Figura 26. CCF del extracto de hexano de la especie resistente (EPVVRH) en 2D.....	49
Figura 27. CCF del extracto de hexano de la especie susceptible (EPVVSH) en 2D.....	50
Figura 28. CCF comparativo de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: Cloroformo y revelador: flavonoides.....	51
Figura 29. CCF comparativo de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: Cloroformo y revelador: p-anisaldehído.....	52
Figura 30. CCF comparativo de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con fase móvil: Cloroformo y revelador: vainillina.....	53
Figuras 31 y 32. CCF comparativo en 2D de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible.....	54
Figura 33. CCF en 2D del extracto de Cloroformo de la especie resistente con fase móvil 8:2 Cloroformo/Hexano y revelador: p-anisaldehído.....	55
Figura 34. CCF en 2D del extracto de Cloroformo de la especie susceptible con fase móvil 8:2 Cloroformo/Hexano y revelador: p-anisaldehído.....	56
Figuras 35 y 36. CCF comparativo de las muestras obtenidas en CC del extracto EPVVRC y EPVVSC.....	61
Figura 37. Muestra del extracto acuoso de la especie susceptible EPVVSA.....	65
.	
Figura 38. Muestra del extracto acuoso de la especie resistente EPVVRA.....	70

Índice de Esquemas:

Esquema 1. Extracción de las hojas de la especie resistente de <i>Vitis vinífera</i>	34
Esquema 2. Extracción de las hojas de la especie susceptible de <i>Vitis vinífera</i> ...	34
Esquema 3. Esquema de Separación para las particiones del extracto metanólico de la especie Resistente.....	36
Esquema 4. Esquema de Separación para las particiones del extracto metanólico de la especie Susceptible.....	37

Índice de tablas

Tabla 1. Masa y porcentajes p/p de los extractos obtenidos a partir de la especie resistente.....	39
Tabla 2. Masa y porcentajes p/p de los extractos obtenidos a partir de la especie susceptible.....	39
Tabla 3. Fracciones combinadas en muestras para el extracto de cloroformo de la especie susceptible (EPVVSC).....	58
Tabla 4. Muestras y masas del extracto de cloroformo de la especie susceptible (EPVVSC).....	58
Tabla 5. Fracciones combinadas en muestras para el extracto de cloroformo de la especie resistente (EPVVRC).....	59
Tabla 6. Muestras y masas del extracto de cloroformo de la especie resistente (EPVVRC).....	60
Tabla 7. Resultados de la acción antifúngica. Diámetros (Medida en mm) / (-) sin efecto.....	62
Tabla 8. Resultados de la acción antibacteriana. Diámetros (Medida en mm) / (-) sin efecto.....	63
Tabla 9. Fracciones combinadas en muestras para el extracto acuoso de la especie susceptible (EPVVSA).....	66
Tabla 10. Muestras y masas del extracto acuoso de la especie susceptible (EPVVSA)...	66
Tabla 11. Desplazamientos químicos experimentales y reportados de las señales de RMN 1H y RMN ¹³ C para la molécula de la glucosa de la muestra (d) del extracto acuoso de la especie susceptible.....	68
Tabla 12. Desplazamientos químicos experimentales y reportados de las señales de RMN 1H y RMN ¹³ C para la molécula de la glucosa de la muestra (c) del extracto acuoso de la especie susceptible.....	69
Tabla 13. Muestras y fracciones combinadas para el extracto acuoso de la especie resistente (EPVVRA).....	71
Tabla 14. Muestras y masas del extracto acuoso de la especie resistente (EPVVRA).....	71
Tabla 15. Desplazamientos químicos experimentales y reportados de las señales de RMN 1H y RMN ¹³ C para la molécula de la glucosa de la muestra c del extracto acuoso de la especie resistente.....	73

Índice de espectros

Espectro 1. Espectro de RMN de protones para la muestra EPVVSA (d).....	82
Espectro 2. Ampliación del Espectro de RMN de protones para la muestra EPVVSA (d).....	83
Espectro 3. Espectro de RMN de carbono 13 para la muestra EPVVSA (d).....	84
Espectro 4. Espectro de RMN de carbono 13 (<i>dept</i>) para la muestra EPVVSA (d).....	85
Espectro 5. Espectro de RMN de protones para la muestra EPVVSA (c).....	86
Espectro 6. Ampliación del Espectro de RMN de protones para la muestra EPVVSA (c).....	87
Espectro 7. Espectro de RMN de carbono 13 para la muestra EPVVSA (c).....	88
Espectro 8. Espectro de RMN de carbono 13 (<i>dept</i>) para la muestra EPVVSA (c).....	89
Espectro 9. Espectro de RMN de protones para la muestra EPVVRA (c).....	90
Espectro 10. Espectro de RMN de carbono 13 para la muestra EPVVRA (c).....	91
Espectro 11. Espectro de RMN de carbono 13 (<i>dept</i>) para la muestra EPVVRA(c).....	92

Lista de Abreviaturas y Símbolos:**Extractos obtenidos:**

EPVVRM Eliana Prieto Vitis Vinífera Resistente Metanol

EPVVSM Eliana Prieto Vitis Vinífera Susceptible Metanol

EPVVRH Eliana Prieto Vitis Vinífera Resistente Hexano

EPVVSH Eliana Prieto Vitis Vinífera Susceptible Hexano

EPVVRC Eliana Prieto Vitis Vinífera Resistente Cloroformo

EPVVSC Eliana Prieto Vitis Vinífera Susceptible Cloroformo

EPVVRAc Eliana Prieto Vitis Vinífera Resistente Acetato de Etilo

EPVVSAc Eliana Prieto Vitis Vinífera Susceptible Acetato de Etilo

EPVVRA Eliana Prieto Vitis Vinífera Resistente Acuoso

EPVVSA Eliana Prieto Vitis Vinífera Susceptible Acuoso

Técnicas:

CCF Cromatografía de Capa Fina.

CC Cromatografía en Columna.

Simbología

C Mezcla de la especie resistente y la especie susceptible.

F Fracción

RMN Resonancia Magnética Nuclear.

RMN ¹³C Resonancia Magnética Nuclear Carbono.

RMN ¹H Resonancia Magnética Nuclear Protón.

DEPT Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

d doblete

dd Doblete de doblete.

J Constante de Acoplamiento.

δ Desplazamiento químico.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina natural ha tenido una gran utilidad a lo largo de muchísimos años, y se debe a que gran parte de las plantas poseen propiedades medicinales, que sirven para tratar y curar diversas enfermedades.

Estas propiedades medicinales, se deben a que las plantas poseen metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son aquellos que son vitales para el crecimiento y desarrollo de la planta: los cuales podrían ser como las vitaminas, ácidos orgánicos, aminoácidos, alcoholes, entre otros. Mientras que los metabolitos secundarios son caracterizados por no intervenir en el crecimiento y reproducción de las plantas, tales como flavonoides que pertenecen a compuestos de tipo fenólicos, los alcaloides que pertenecen a compuestos nitrogenados, entre otros.

La planta de la Vid es conocida científicamente como *Vitis vinífera*; es originaria de la región del Mar Caspio en Asia Menor, y fue introducida luego en Europa y el resto del mundo. Esta planta ha sido utilizada por muchos años para investigaciones y estudios, gracias a sus actividades biológicas y sus numerosas propiedades medicinales; además sus frutos sirven como materia prima para la preparación de los vinos.

La uva conocida generalmente como fruto de la vid, es uno de los frutos más nutritivos, ricos en vitamina C y minerales, tanto para alimento como para medicina natural. Las hojas y los frutos de la Vid constituyen una fuente importante de compuestos fenólicos que tienen propiedades beneficiosas para la salud; en particular los flavonoides, y los taninos; que son responsables del color, el aroma, y la textura¹. También contienen ácidos orgánicos, lípidos y enzimas.

La *Vitis vinífera* tiene una amplia gama de usos medicinales tales como: para el tratamiento de la diarrea, de las varices, para la hepatitis, control de radicales libres, tonificar la circulación, para la inflamación de los ojos, tratamiento de enfermedades cardiovasculares y hasta para mantener en buen estado las capacidades cognitivas de los ancianos ². El zumo de la fruta ayuda también a bajar la fiebre y como antiemético. El aceite de la semilla de la vid, se utiliza como complemento dietético. Las hojas también tienen uso de tipo culinario, para hacer alimentos envueltos con rellenos de carne, siendo una comida muy típica en Turquía, llamada “*sarma*” que significa “envuelto”³.

La salud de las plantas es importante para el buen crecimiento y desarrollo de las mismas. Pueden llegar a sufrir enfermedades, en muchos casos ocasionadas por hongos. Además son capaces de defenderse por sí mismas de hongos y bacterias a través de las *fitoalexinas*.

Las *fitoalexinas* son sustancias producidas por las plantas, como mecanismo de defensa natural, para combatir infecciones.

La *Vitis vinífera*, puede ser afectada, ya que es susceptible a infecciones microbianas, especialmente a hongos como *Botrytis cinerea*, *Uncinula necator* y *Plasmopara vitícola*.

I.1 FAMILIA VITACEAE

Es una familia ampliamente distribuida, pero es más diversa en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta familia comprende 14 géneros, y unas 850 especies. La especie más conocida de esta familia es la Vid (*Vitis vinífera*)⁵. Varias especies del género *Vitis* son de gran importancia comercial como fuente de fruta fresca (uvas), jugo, vino y pasas.

Es una familia que se reconoce por presentar zarcillos opuestos a las hojas⁴, no ramificados o con 1 ó 2 órdenes de ramificación; son de tipo trepadoras o colgantes, de bellas hojas brillantes y muy decorativas. Sus estípulas son usualmente pequeñas y sus hojas son alternas, simples o compuestas.

Las semillas se encuentran encerradas en frutos, de forma acanalada, estriada, con dos intrusiones ventrales hacia el endospermo; embrión muy pequeño. Las flores son diminutas, regulares y nacen al frente de las hojas, ó en la terminación de los tallos, bisexuales, a veces unisexuales (plantas monoicas o polígamas), pequeñas; yemas elipsoides, ovales, o cónicas, a veces esféricas o cilíndricas.

Los frutos son bayas esféricas o elipsoides, epicarpio delgado y cartáceo, o grueso y crustáceo (en frutos elipsoides), mesocarpio carnoso y jugoso, endocarpio adherente a la testa de las semillas, más fibroso que el mesocarpio.⁴



Figura 1. Hojas de *Vitis vinífera*

I.1.1 Clasificación

La especie *Vitis vinifera* tiene la siguiente taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Vitales

Familia: Vitaceae

Género: Vitis

Especie: *Vitis vinifera*

Es la única familia del orden. La familia Vitaceae se divide en dos subfamilias ⁴:

- Leeoideae
- Viticoideae



Figura 2. Planta de *Vitis vinifera*.

I.2 GÉNERO *VITIS*

Son arbustos trepadores con zarcillos, tallo con crecimiento simpodial, nudos hinchados, hojas alternas, simples, con estípulas.⁶

Las flores se agrupan en racimos compuestos, opuestos a una hoja. Cada brazo del racimo se ramifica hasta terminar en un dicasio (una flor terminal con dos flores en su base).

Tanto la flor terminal como sus laterales pueden abortar y el dicasio se reduce entonces a una o dos flores.⁶

Existen 60 especies, pero tan sólo la vinífera es la que proporciona vino (de origen indoeuropeo).⁷ Entre las otras sesenta especies de *Vitis*, se encuentran: la norteamericana *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis aestivalis*, *Vitis rotundifolia*, etc. De todas ellas, tan sólo la *Vitis vinífera* es la que proporciona vino con un sabor aceptado por la mayor parte de las culturas del mundo.

I.3 ENFERMEDADES DE LA VID

Algunas plantas, son susceptibles a enfermedades que pueden ser causadas por patógenos, como por ejemplo: bacterias, hongos, virus y microbios. Estas enfermedades pueden ocasionar deterioro y hasta la muerte de una parte de la planta o de la planta entera.

Las enfermedades más comunes que se han encontrado en *Vitis vinífera* son las siguientes:

I.3.1 Podredumbre Gris de la Uva (***Botrytis cinerea***):

Botrytis es el nombre del hongo que causa esta enfermedad. La infección comienza principalmente por el racimo, y luego se transmite hacia las hojas, pecíolos, tallos y frutos.

Es capaz de destruir por completo las inflorescencias, atacar el tallo y otras partes de la vid, una vez que se haya producido la floración.⁸

Los síntomas de esta enfermedad son:

- ✓ El hongo puede provocar la desecación total del racimo.¹⁰
- ✓ En las flores se manifiesta necrosis del tejido.
- ✓ En las hojas se muestran grandes manchas necróticas, de color pardo rojizo, posteriormente se marchitan y mueren. En muchos casos adquieren la apariencia de quemadas.
- ✓ Los frutos se ven afectados por una pudrición gris, blanda y acuosa, que generalmente se inicia en la zona que rodea el cáliz.
- ✓ En los tallos se observa lesiones necróticas o acuosas.^{8,9}

La infección se extiende con condiciones de temperaturas entre los 15 a 24 °C, y por humedad alta. Este tipo de hongo para infectar necesita heridas en la uva, que pueden generarse por plagas como la polilla del racimo, el granizo o las lluvias muy fuertes.⁹

Para evitar que se siga favoreciendo la infección, se debe eliminar rápidamente los frutos infectados, remover las hojas de las plantas para permitir la circulación de aire dentro del cultivo, evitar además la presencia de humedad sobre el cultivo, y eliminar las hojas y flores secas que sirvan de sustrato para la multiplicación del hongo.⁹



Figura 3. Racimo infectado por *Botrytis cinerea*.

I.3.2 Oídio (*Uncinula necator*):

El hongo es llamado *Uncinula necator*, ataca a las familias *Vitaceae* (*Vitis*, *Ampelopsis*, *Parthenocissus*) siendo la vid europea (*Vitis vinífera*) una de las más susceptibles.

Este hongo tiende a aparecer cuando la temperatura es muy elevada.¹¹

Los síntomas son:

- ✓ En las hojas, se observan manchas blancas-grisáceas, con aspecto pulverulento y consistencia harinosa, generalmente tenue. Las hojas fuertemente atacadas toman un color pardo.⁹
- ✓ En el racimo, la uva se seca y se abre, posteriormente se pudre y finalmente muere.¹²

Este hongo puede afectar todos los tejidos verdes desde la brotación, constituyendo una de las enfermedades más importantes de la vid en todas las zonas donde se cultiva. El ambiente óptimo para el desarrollo de este hongo, se da con una temperatura de 25 °C, y una humedad de 70 al 95%.¹⁰



Figura 4. Racimo infectado por el *Uncinula necator*.

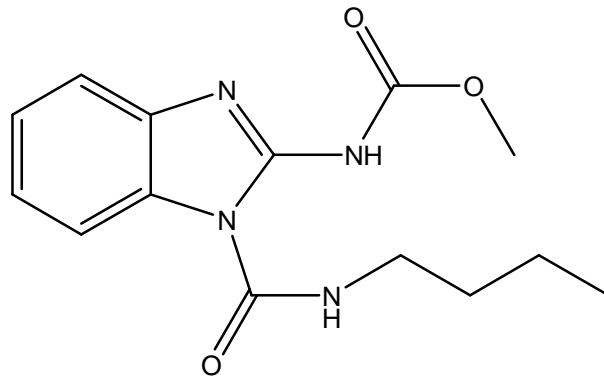


Figura 5. Hojas infectadas por *Uncinula necator*.

Para combatir esta enfermedad se utilizan productos a base de azufre, con buenos resultados pero a partir de los 30 °C, aumenta el riesgo de toxicidad.

Los fungicidas orgánicos tienen la ventaja de que pueden actuar a mayor temperatura que el azufre, sin ser tan fitotóxico; entre ellos se pueden usar algunos del tipo de benzimidazoles como benomilo (1).¹³

Los fungicidas cúpricos, tienen la desventaja de ser más tóxicos y menos efectivos contra esta enfermedad.¹³



1

Para controlar esta enfermedad debe permitirse una buena ventilación e iluminación en la planta. ⁹ Establecer los viñedos en sitios asoleados, eliminar las hojas alrededor de los racimos, permite un secado rápido al aplicarle los fungicidas y facilita su penetración. ¹³

I.3.3 Mildiu (*Plasmopara vitícola*):

Es una enfermedad producida por un hongo llamado *Plasmopara vitícola*. Ataca sobre todo en las hojas y los racimos que estén en vías de crecimiento, es decir, antes de que cambien de color.

Los síntomas de esta enfermedad son:

- ✓ En las hojas se manifiestan manchas amarillas, posteriormente se mueren los tejidos y toman tonos rojizos. ¹⁰ Los ataques fuertes producen una desecación total en las hojas.
- ✓ Los frutos atacados caen, y se secan en todo o parte del racimo.
- ✓ En los racimos al principio de la floración, se forman curvaturas en forma de “S”, y las flores se oscurecen tomando un color castaño oscuro. ¹⁰



Figuras 6 y 7. Daño en el fruto, ocasionado por *Plasmopara viticola*.

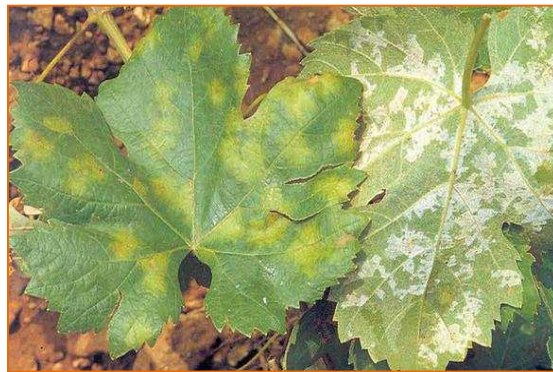


Figura 8. Hojas infectadas por *Plasmopara viticola*.

Para el desarrollo de éste hongo se necesitan temperaturas entre 10 y 20 °C, y humedad en los órganos susceptibles de la vid, por lo que las lluvias son condiciones óptimas.⁹

Para controlar esta enfermedad se debe tener una buena circulación de aire en la planta, y exposición a la luz.

Se puede utilizar tratamientos preventivos a base de cobre para el tratamiento de Mildiu.¹³

También se tienen enfermedades de la madera de la vid:

I.3.4 Eutipiosis (*Eutypa lata*):

Es una enfermedad producida por el hongo *Eutypa lata*. Este hongo ataca todos los órganos verdes de la vid y especialmente a la madera de la vid. Es una de las enfermedades más destructivas de los troncos y brazos de las cepas.¹⁴

Los síntomas más frecuentes de esta enfermedad son:

- ✓ Las hojas son más pequeñas y deformadas. Presentan manchas necróticas en los bordes, que con el paso del tiempo pueden ser de mayor tamaño.¹⁵
- ✓ Decaimiento de los brotes y tallos débiles.
- ✓ Corrimiento de los racimos, que pueden llegar a desaparecer.
- ✓ La madera afectada toma un color marrón más o menos oscuro, de consistencia dura y quebradiza.¹⁵

Las medidas de control frente a esta enfermedad son las siguientes:

- Arrancar las raíces muertas, cortar los brazos atacados hasta encontrar madera sana y quemarlo todo.¹⁶
- Una raíz enferma se puede rehacer dejando brotes en la madera sana del tronco y eliminando el resto.
- Podar con tiempo seco para evitar que la lluvia propague la enfermedad.
- Toda la madera infectada debe ser retirada y destruida.¹⁶

Como fungicida se puede utilizar benomilo (1), carbendazima (2) en pasta, ó metil tiofanato (3), aplicándolo con una brocha en las heridas de poda.¹⁴

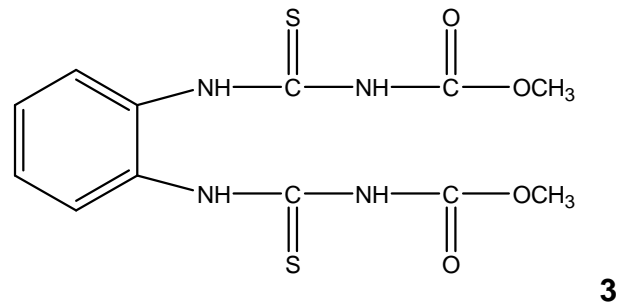
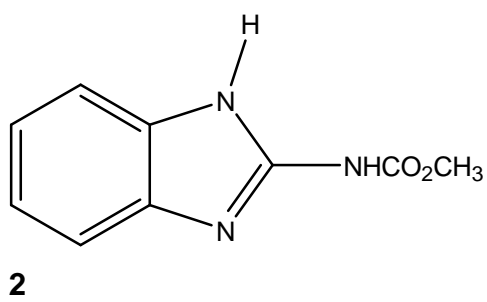


Figura 9. Hojas infectadas por *Eutypa lata*.



Figura 10. Ramas muertas de la vid a causa de *Eutypa lata*.

I.3.5 Yesca (*Phellinus igniarius* y *Stereum hirsutum*):

Es una de las enfermedades más antiguas de la vid. Puede tener una evolución lenta o una evolución rápida.¹⁴

En la forma rápida, los síntomas son:

- ✓ Puede aparecer marchitez fulminante de la planta completa.
- ✓ Las hojas se encuentran completamente secas. Pueden observarse con manchas necróticas y amarillentas.

En la forma lenta, los síntomas son:

- ✓ Se descompone lentamente la madera de los troncos y ramas, en vides adultas de 8 a 10 años, observándose más blanda y esponjosa la madera, por acción de toxinas y enzimas del hongo.
- ✓ Las hojas presentan manchas necróticas, se secan y caen prematuramente.¹⁴
- ✓ Los racimos pierden peso y pueden secarse.

Para el control de esta enfermedad se recomienda:

- Quemar los restos de poda, y madera muerta. Si se realizan cortes sobre madera de varios años, usar un producto protector.
- Los productos que se aconsejan para dar sobre los cortes hechos en madera son: benomilo **(1)**, carbendazima **(2)**, metil-tiofanato **(3)**.



Figuras 11 y 12. Hojas y troncos afectados por la enfermedad Yesca.

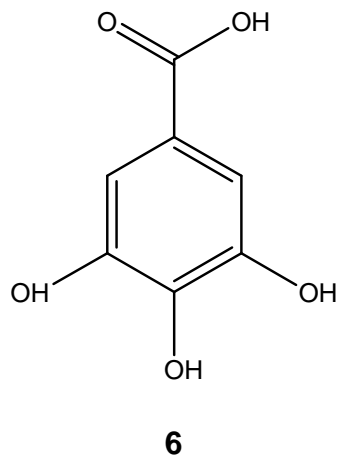
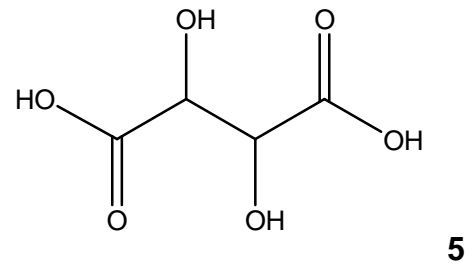
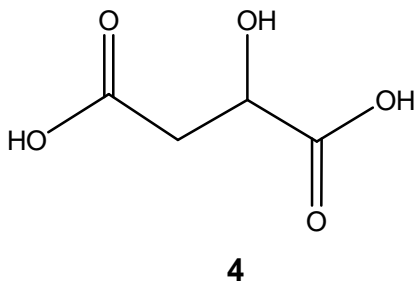
II. ANTECEDENTES

Los antecedentes relacionados a la actividad biológica de *Vitis vinífera*, que se dan a continuación, han dado a conocer tanto sus componentes activos, como sus aplicaciones terapéuticas. También se dará a conocer algunos estudios en cuanto a la resistencia y susceptibilidad a patógenos en *Vitis vinífera*.

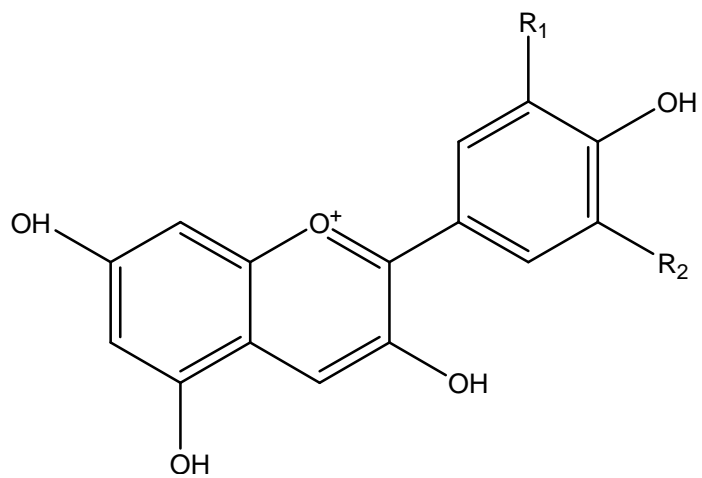
II.1 COMPONENTES ACTIVOS

Los componentes activos de *Vitis vinífera*, son aquellos de tipo flavonoides, estilbenos, ácidos orgánicos, entre otros.

En los zarcillos se encuentra el ácido málico **(4)**, ácido tartárico **(5)** y taninos como el ácido gálico **(6)**.



En las hojas de *Vitis vinifera* se tienen antocianidinas (**7**), flavonoides (**8**), ácidos orgánicos como: oxálico (**9**), fumárico (**10**), ascórbico (**11**), cítrico (**12**), taninos (**6**), y carotenoides como β -caroteno (**13**). Las uvas contienen agua, azúcar, ácido tartárico (**5**) y ácido málico (**4**).

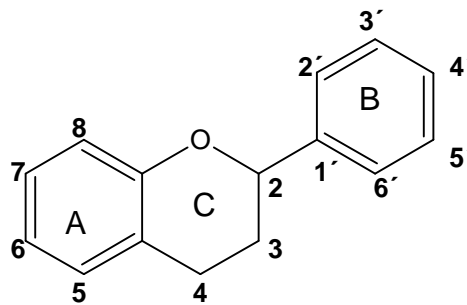


7 (Estructura básica de las antocianidinas).

Ejemplos de antocianidinas presentes en la Vid:

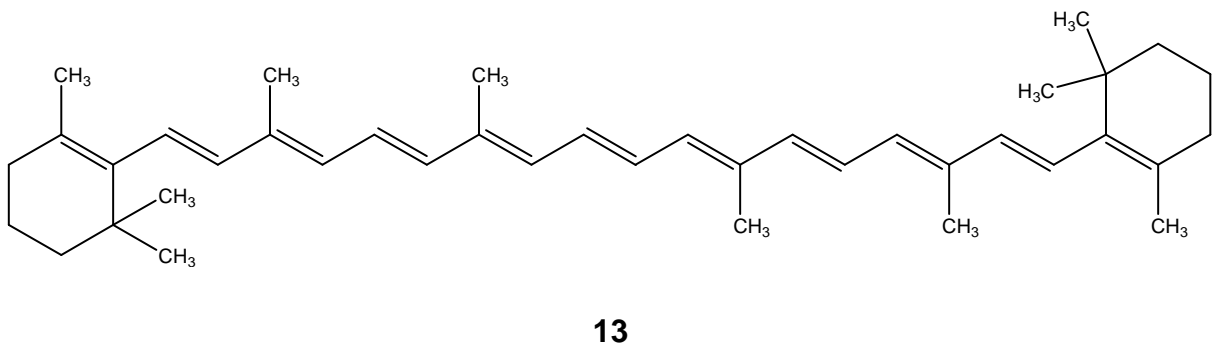
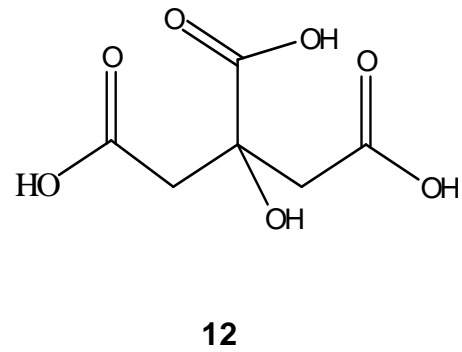
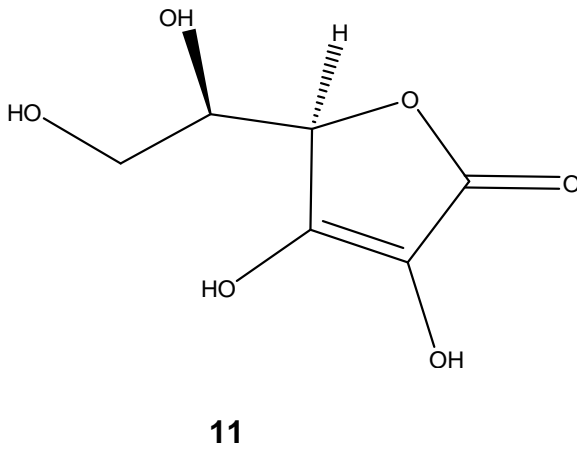
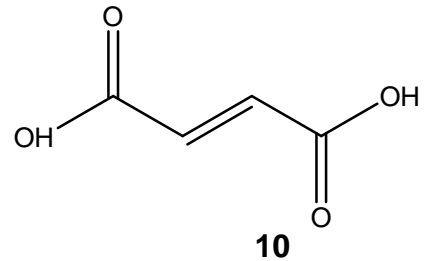
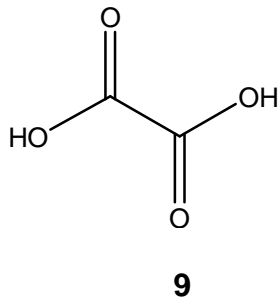
	R ₁	R ₂
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Los flavonoides pertenecen a la familia de compuestos fenólicos y son sustancias naturales que le confieren color a los frutos, semillas y hojas de las plantas. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debidos a su acción antioxidante y eliminador de radicales libres.¹⁷

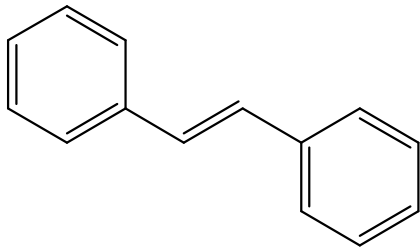


8 (Estructura básica de los flavonoides).

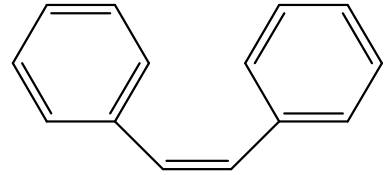
Su esqueleto está representado por dos anillos aromáticos A y B (fenilos), unidos por un puente de 3 carbonos que forma un anillo C heterocíclico oxigenado (pirano) (C6-C3-C6). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran desde el 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' hasta el 6'.¹⁷



Los estilbenos (E)- estilbeno (**14**) y (Z)-estilbeno (**15**), tienen un esqueleto básico de 14 carbonos (C6-C2-C6) y son otro grupo de compuestos fenólicos no flavonoides, cuya función biológica está relacionada con mecanismos de defensa de los frutos de la vid, contra ataques fúngicos. Los compuestos estilbenos, son el principal grupo de *fitoalexinas* en la familia Vitaceae. ¹⁸



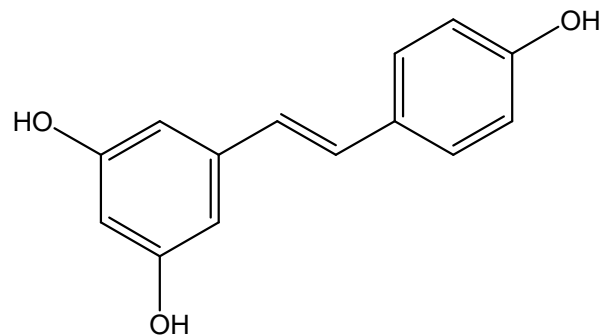
14



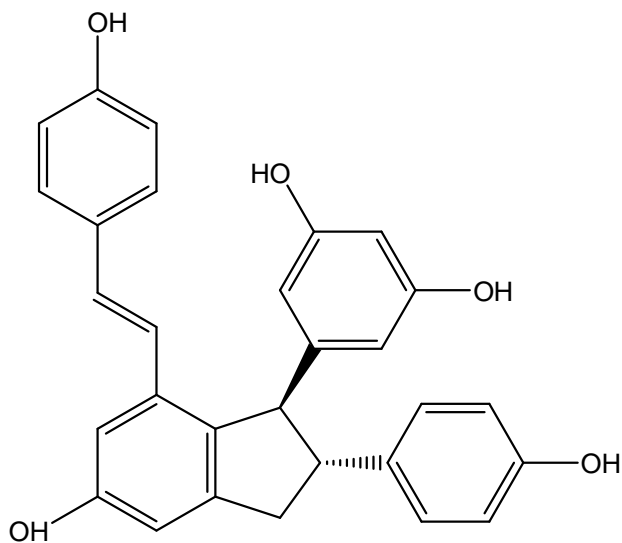
15

Bombardelli y Morazzoni ¹⁹, en 1995 aislaron a partir de los frutos y hojas de *Vitis vinífera*, compuestos de tipo flavonoides (**8**), ácidos orgánicos (**9-12**), vitaminas (**11**), lípidos y enzimas. También aislaron grupos de estilbenos como el resveratrol (**16**) y sus derivados como ϵ -viniferin (**17**) y balanocarpol (**18**).

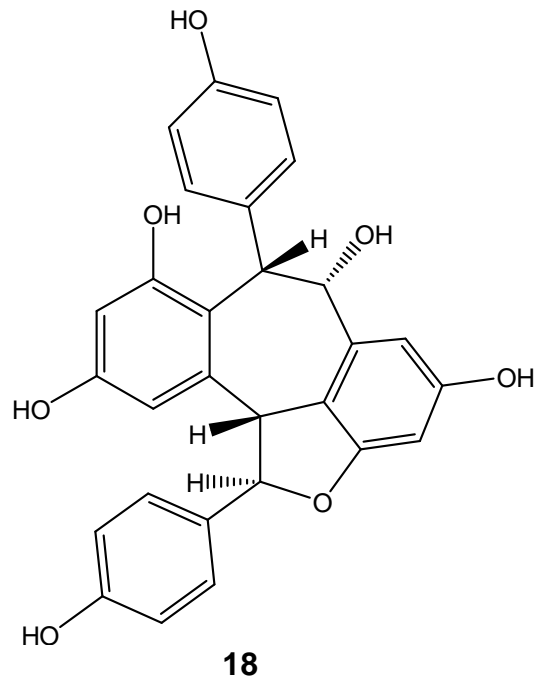
El resveratrol es un compuesto perteneciente a la familia de los estilbenos y es producido de forma natural por algunas plantas cuando son atacadas por patógenos tales como bacterias u hongos, y se encuentra en las semillas y fruto de *Vitis vinífera*.



16

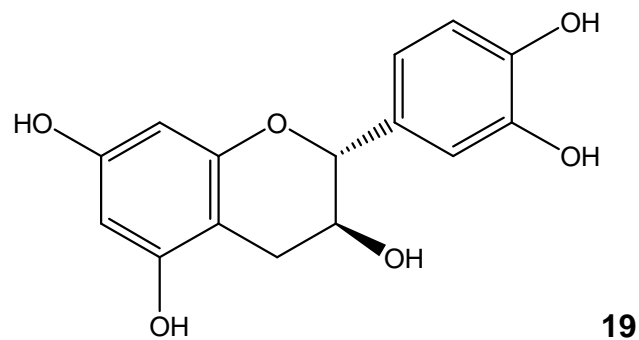


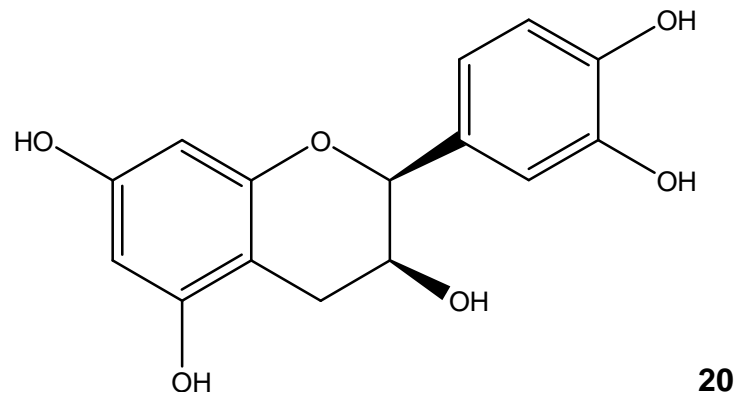
17



En el año 2001, Felicio y Santos²⁰, también aislaron resveratrol (**16**) y sus derivados (**17 y 18**) en los extractos de las hojas de *Vitis vinífera*, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

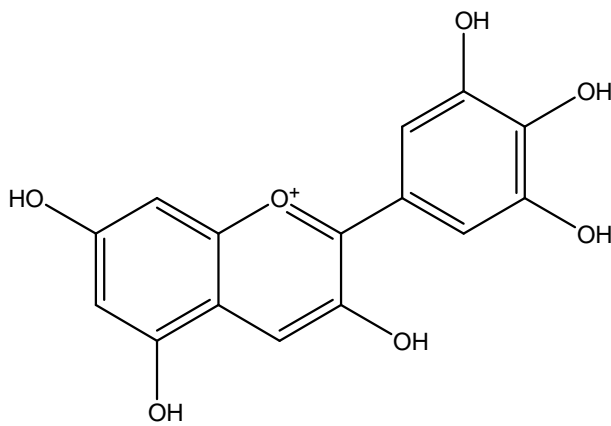
Otro estudio realizado por Mulinaccia, Santamaría y col.²¹ en el año 2008, se demostró la presencia de compuestos tipo flavonoles como (+)-catequina (2R, 3S) (**19**) y (-)-epicatequina (2S, 3S) (**20**), en la piel de la uva en diferentes etapas de maduración.

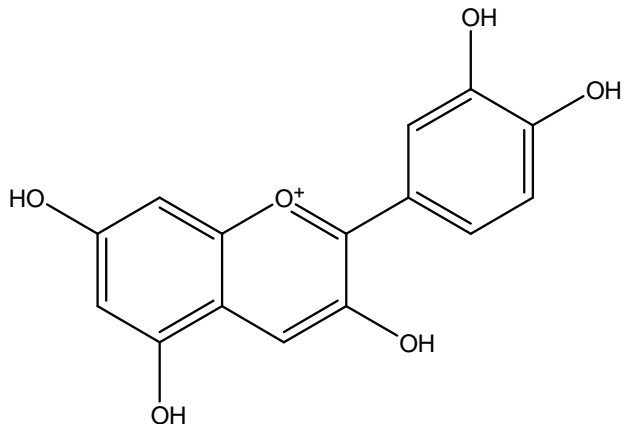
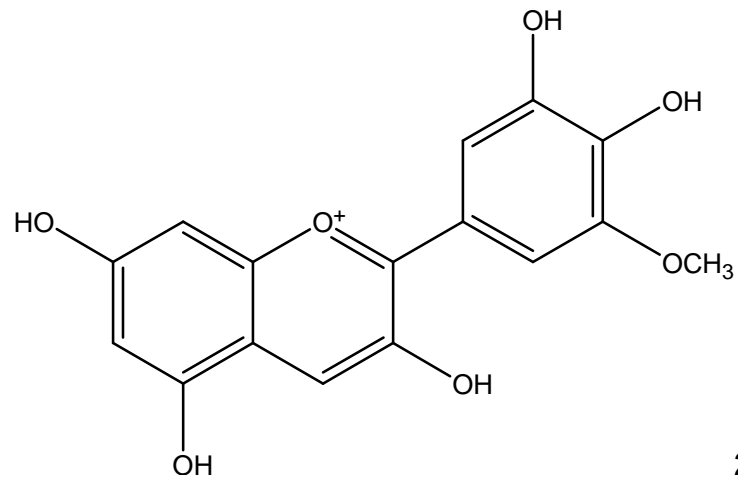
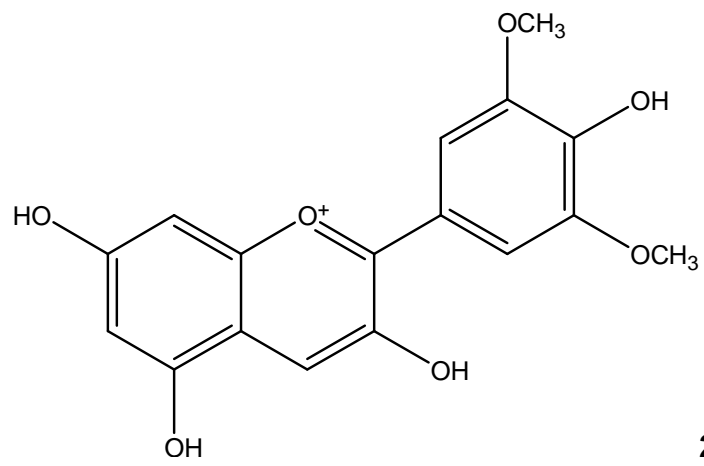




Estos investigadores encontraron un alto contenido de (+)-catequina (2R, 3S) **(19)** en las semillas de las uvas verdes; mientras que las semillas de las uvas maduras se encontró un contenido diez veces menor. ²¹

Aislaron además de esos compuestos, antocianidinas como delphinidina **(21)**, cianidina **(22)**, petunidina **(23)**, y malvidina **(24)**.



**22****23****24**

II.2 APLICACIONES TERAPEÚTICAS

Karaman y Kocabas²² en el año 2001, demostraron que la infusión de las hojas de *Vitis vinífera* puede ser utilizada para el tratamiento de la ictericia, la cual es un síntoma de enfermedades hepáticas como hepatitis y cirrosis, que se caracteriza por presentar una coloración amarillenta en la piel, ojos o mucosas.

Adicionalmente otros autores como Hebash y Peterson²³ en el año 1991, estudiaron que la infusión de las hojas además de ser utilizadas para tratar la hepatitis, varices, hemorroides; también son utilizadas para el dolor de estómago, la diarrea, el estreñimiento y para desintoxicar el cuerpo gracias a sus propiedades astringentes y hemostáticas.

Bombardelli y Morazzoni¹⁹ (1995) encontraron que la infusión de estas hojas se pueden utilizar para el tratamiento de venas varicosas, hemorragias, y para el lavado ocular.

Los frutos, las semillas y las hojas se han utilizado en la medicina ayurvédica en la India, según Kapoor (1990) y Onstad (1996)²⁴.

Este tipo de medicina se basa en primero hacer un diagnóstico al paciente y conocer sus molestias, y una vez obtenido dicho diagnóstico, se procede a tratar la patología por diferentes métodos conocidos como: Shodan (Limpieza y Destoxificación, Shaman (Atenuación), Rasayana (Rejuvenecimiento) y Satvajava (Higiene mental y Curación espiritual).

El resveratrol tiene un gran potencial antioxidante, y puede desempeñar un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares en humanos según Fremont ²⁵. Este autor estudió además que el resveratrol también tiene propiedades antiinflamatorias y anti cancerígenas.

Lorenz Engelman y col. ²⁶(2003), estudiaron que los estilbenos como resveratrol **(16)** y sus derivados **(17 y 18)**, tienen propiedades antioxidantes. Signorelli y Ghidoni ²⁷ notaron que los estilbenos también tienen propiedades antitumorales.



Figura 13. Medicamento a base de resveratrol y *Vitis vinífera*.

II.3 APLICACIONES CULINARIAS

- El zumo de la uva exprimida y sin fermentar, es usado para la elaboración del vino.
- Las uvas secas, las llamadas “uvas pasas”, son usadas para confitería.
- Las hojas de la vid (*Vitis vinífera*), son muy utilizadas en Turquía, para envolver preparados a base de carne picada, siendo una de las comidas típicas de allí.³



Figura 14. Comida turca con hojas de *Vitis vinífera*.

Bartolomé y Monagas ²⁸ en el año 2003, demostraron que compuestos flavonoides, antocianinas, y flavonoles son transferidos de las partes sólidas de la uva (la piel, las semillas y el tallo) para el mosto, durante la elaboración del vino, en donde intervienen procesos de trituración, maceración y fermentación. Estos compuestos son responsables de las propiedades organolépticas del vino, como el color, sabor, astringencia y amargor, así como también los efectos fisiológicos sobre la salud.

II.4 RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PATÓGENOS EN *Vitis Vinífera*.

Un estudio realizado por Boso Alonso y col. ²⁹ en el año 2007, consistió en el análisis de dos genotipos de vid; uno altamente resistente (*Vitis riparia*) y otro altamente susceptible (*Vitis vinífera*), a el hongo *Plasmopara vitícola*.

Observaron que en los genotipos susceptibles, éste hongo desarrolla esporangióforos, sobre la superficie abaxial de las hojas infectadas; mientras que en los menos susceptibles, el hongo produce pocos esporangióforos, y algunas manchas necróticas en los puntos de infección.

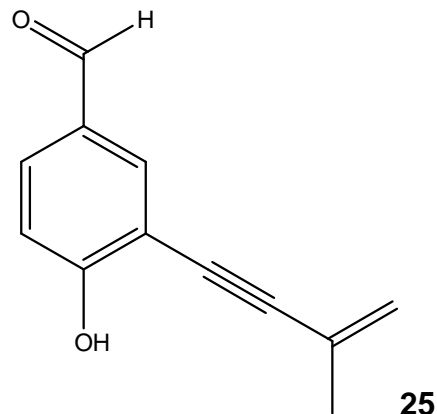
En los genotipos resistentes, encontraron que el hongo provoca una respuesta de hipersensibilidad por parte de la planta, de manera que se interrumpe el desarrollo del hongo, y sólo son evidentes pequeñas manchas necróticas. La respuesta de hipersensibilidad a la que ellos hacen referencia, está relacionada con la muerte de las células alrededor del punto de la hoja en donde se produjo la infección.

Alonso, Martínez y col.³⁰ en el año 2008, realizaron un estudio acerca de los niveles de susceptibilidad de *Plasmopara vitícola*, en diferentes variedades de viníferas altamente susceptibles como: Tempranillo, Touriga Nacional, Albariño, y Cabernet Sauvignon, y *Vitis rupestris* que es considerada altamente resistente.

Afirmaron que la especie poco susceptible fue Cabernet Sauvignon, y las especies más susceptibles fueron: Touriga Nacional, Albariño, y Tempranillo. También observaron que la más resistente fue *Vitis rupestris*. Sus resultados fueron basados al inocular el hongo, a través de 2 metodologías diferentes.

En el estudio de Langcake y Pryce³¹ en el año 1977, se encontró que el resveratrol **(16)** y sus derivados **(17 y 18)** tenían una alta actividad antifúngica en las hojas de *Vitis vinífera*.

Tabacchi³² en el año 1994, afirmó que el hongo *Eutipa Lata* es el responsable de la enfermedad del brazo muerto de la vid, que está causando un problema económico importante en todo el mundo. Aisló por medio de los cultivos de *Eutipa lata* una toxina que identificó por técnicas químicas y espectroscópicas llamada *Eutipina* (4-Hydroxi-3-(3-metil-3-buteno-1-ino) benzaldehído) **(25)**, el cual mostró extrema toxicidad para la vid.



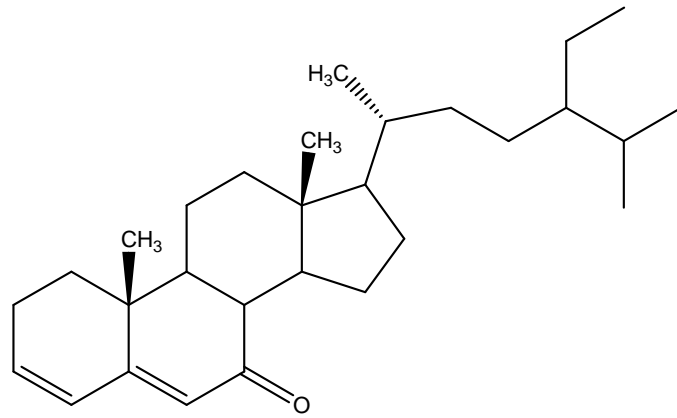
Otro trabajo realizado por Alonso, Voinesco y col.³³ en el año 2011, muestra que diversos cultivos de vid que se inocularon en los órganos con el hongo *Plasmopara vitícola*, son altamente resistentes, gracias a la alta concentración de estilbenos en el sitio de la infección.

Para la especie *Vitis Solaris*, esta concentración de estilbenos se produce en toda la superficie de la inoculación. En la especie *Vitis Muscadinia* concluyeron que es bastante resistente a *Plasmopara vitícola*, ya que encontraron grandes concentraciones de estilbenos en los órganos donde se produjo la inoculación.

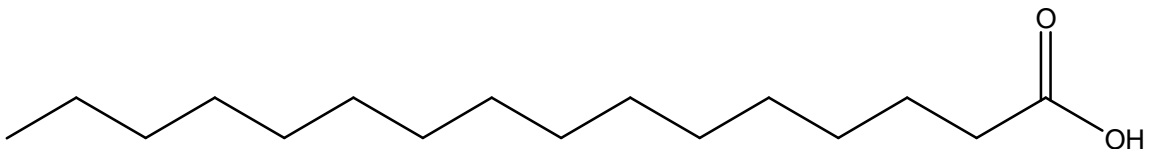
Estos resultados confirman el papel crítico y la eficacia de fitoalexinas como los estilbenos en la resistencia de la vid.

Se encontró en otro estudio, realizado por Ilieva, Todorova y col.³⁴ en el año 2008, la presencia de compuestos en las hojas que hacen a la especie resistente y susceptible a patógenos como: *Botrytis cinerea*, *Plasmopara vitícola* y *Uncinula necator*.

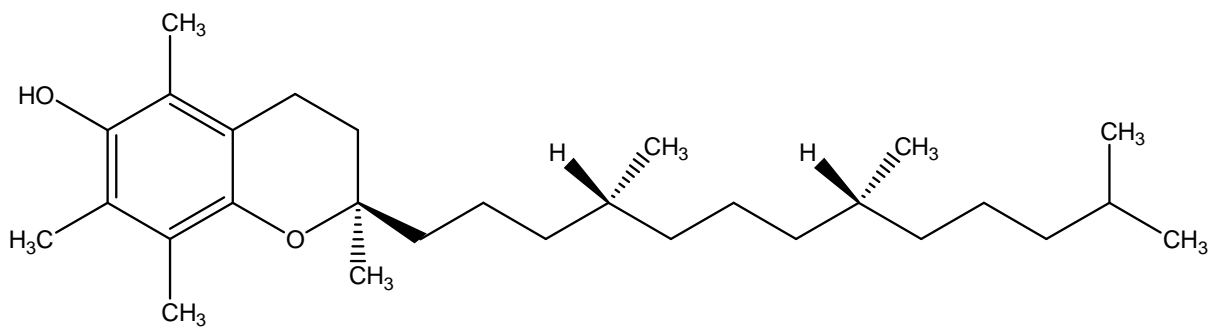
En las hojas de las especies resistentes aislaron compuestos como: ácido málico **(4)**, ácido tartárico **(5)**, una cetona como estigmasta-3,5-dien-7-ona **(26)**, gran cantidad de ácido palmítico **(27)** y escasas cantidades de α -tocoferol **(28)**, y γ -tocoferol **(29)**.



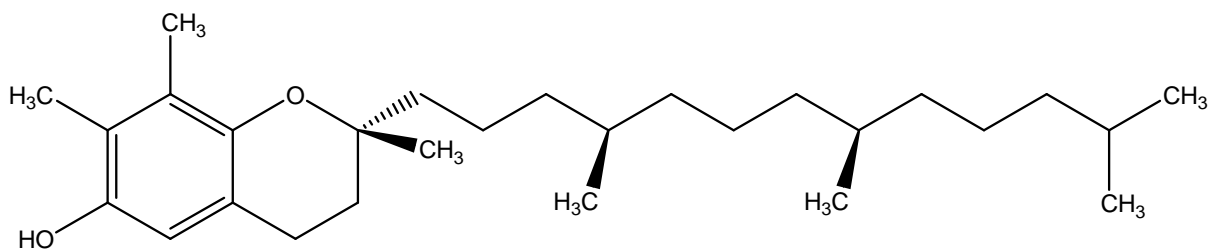
26



27

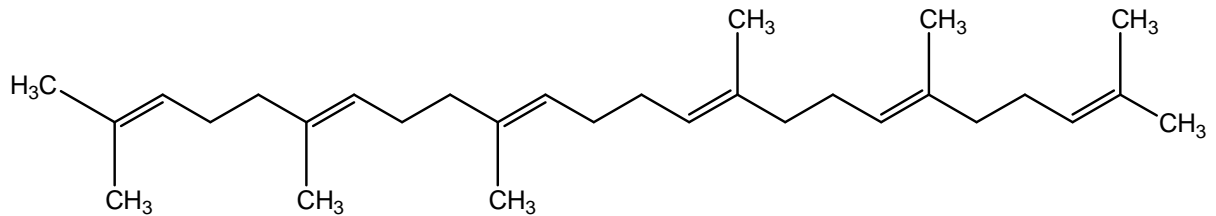


28

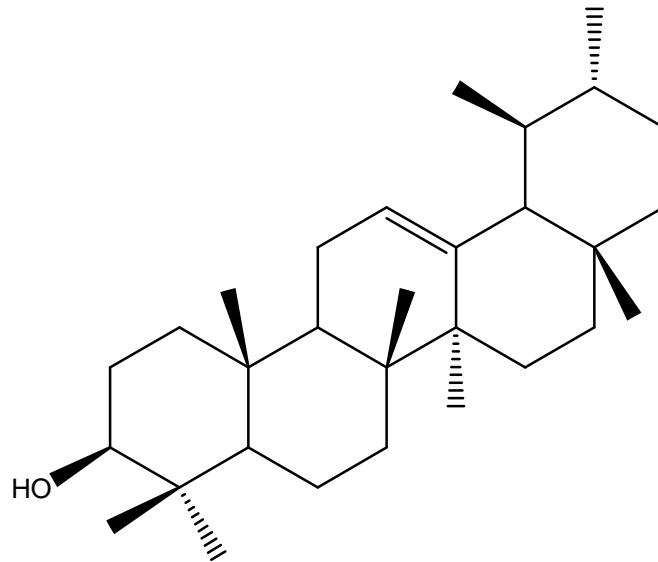


29

En las hojas susceptibles encontraron compuestos como: escualeno (**30**), y α -amirina (**31**).



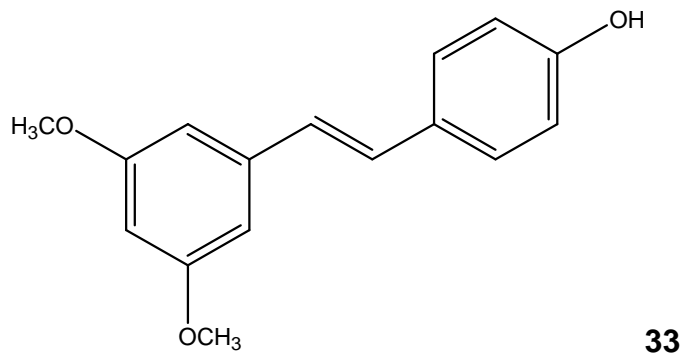
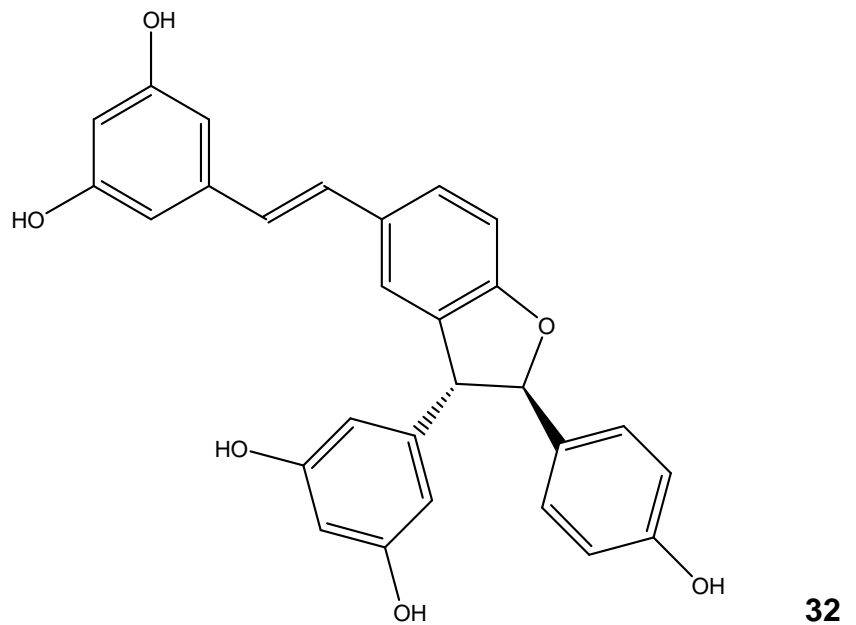
30



31

Con base en estos resultados, plantearon que los dos tocoferoles (**28 y 29**), por presentarse en muy poca proporción en las muestras resistentes, podían ser definidos como biomarcadores de la susceptibilidad de la Vid, y que los ácidos málico, tartárico y palmítico (**4, 5, y 27**), por presentarse en mayor proporción en las hojas resistentes, se podían proponer como biomarcadores de la resistencia de la vid.

En otro estudio realizado por Steimetz, y col. ³⁵ en el año 2012, se determinó la presencia de algunas fitoalexinas en las hojas, que son derivados del resveratrol como: ϵ -viniferin (**17**), y δ -viniferin (**32**), resveratrol (**16**), y pterostilbeno (resveratrol-3,5-dimetil-eter) (**33**), los cuales están asociados a la resistencia de patógenos en la vid.



Los mismos investigadores ³⁵ encontraron concentraciones más altas de ϵ -viniferin (**17**), δ -viniferin (**32**) en las hojas, y menos concentración de resveratrol y pterostilbeno (3,5-dimetil resveratrol) (**33**).

III. JUSTIFICACIÓN

Gran parte de los antecedentes que se tienen de *Vitis vinífera*, corresponden al estudio y caracterización de metabolitos secundarios presentes en dicha planta. Sin embargo, se tienen muy pocos antecedentes de la identificación de fitoalexinas, compuestos que determinan que la planta sea resistente a ciertos patógenos que la parasitan.

En vista de que los estudios acerca de la auto defensa química de la vid, son aún insuficientes, surge el interés por realizar un estudio fitoquímico comparativo de dos especies de *Vitis vinífera*: una especie resistente y otra susceptible a patógenos. Ambas especies son cultivadas en la zona de la Trinidad, en la ciudad de Caracas. Teniendo como objetivo general la identificación de los metabolitos secundarios en las hojas de la planta, que posiblemente puedan diferenciar ambas especies.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Realizar el estudio fitoquímico comparativo de dos especies de *Vitis vinífera* resistente y susceptible a patógenos.

IV.2 Objetivos Específicos

- ❖ Extraer los metabolitos secundarios de las hojas de *Vitis vinífera*, para la especie resistente y para la especie susceptible, utilizando como solvente metanol.
- ❖ Realizar particiones con solventes de diferente polaridad al extracto total de metabolitos secundarios.
- ❖ Someter a análisis comparativo con cromatografía de capa fina los diferentes extractos obtenidos por partición.
- ❖ Evaluar la acción antimicrobiana de cada uno de los extractos sobre hongos y bacterias.
- ❖ Separar a través de cromatografía en columna los metabolitos presentes en los extractos que presentan mejor actividad biológica.
- ❖ Identificar por métodos espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C y Espectrometría de Masas los posibles compuestos responsables de la resistencia.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1 EQUIPOS

- Rotavapor BÜCHI modelo B-480.
- Equipo de extracción Soxhlet.
- Lámpara de UV (λ 254 nm) UVP modelo UVG-11).
- Balanza analítica OHAUS (de apreciación 0.01g).
- Balanza analítica OHAUS (de apreciación 0.0001g).
- Liofilizador.
- Licuadora.
- Espectrómetro de RMN ECLIPSE-JEOL 270 MHz (Laboratorio de RMN, Facultad de Farmacia / UCV).

V.2 MATERIALES Y REACTIVOS

V.2.1 Solventes

- Metanol (MeOH) grado p.a. Aldrich.
- Cloroformo (CH₃Cl₃) grado p.a. Aldrich.
- *n*-Hexano grado p.a. Aldrich.
- Acetato de etilo (AcOEt) grado p.a. Aldrich.

V.2.2 Material para cromatografía

- Sílica gel G60 para cromatografía de columna (CC), 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- Placas de sílica gel para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G-25/UV₂₅₄, 20x20 cm. 0,25 mm de espesor.

V.2.3 Reveladores

- *p*-anisaldehído: se preparó mezclando 0,5 mL de *p*-anisaldehído con 85 mL de EtOH, 5 mL de H₂SO₄ y 10 mL de CH₃COOH glacial.
- Naturstoff (para revelado de flavonoides).
- Vainillina.

V.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

V.3.1 Colecta del material vegetal

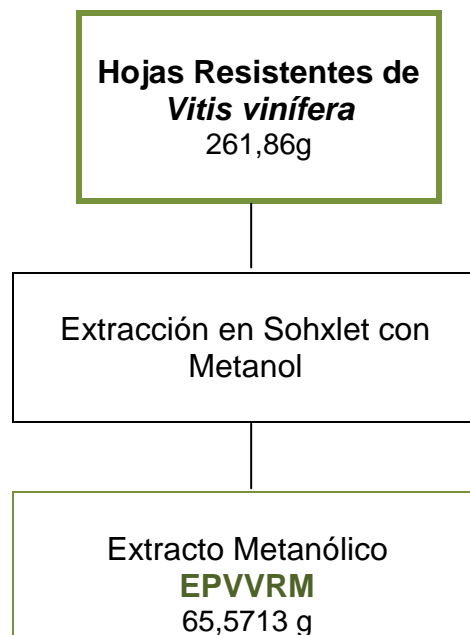
La especie fue colectada en la ciudad de Caracas, en la zona de la Trinidad. Se colectaron hojas de *Vitis vinifera* de la especie resistente a patógenos, y de la especie susceptible que se mostraban atacadas por patógenos.

V.3.2 Extracción

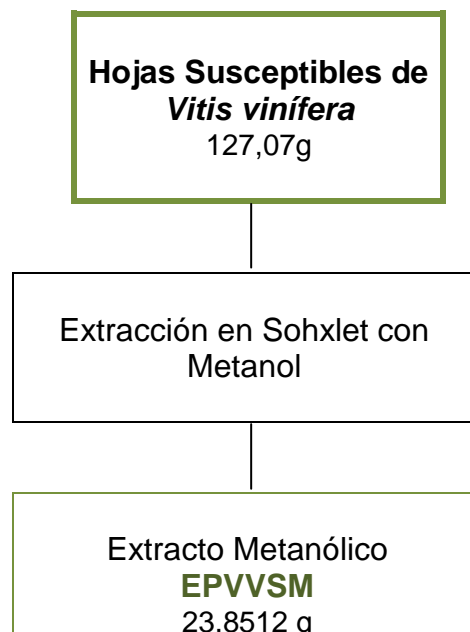
Las hojas de *Vitis vinifera* tanto de la especie resistente como de la especie susceptible, fueron introducidas en una licuadora para triturarlas antes de ser sometidas a un equipo de extracción continua en caliente (Soxhlet), utilizando como solvente metanol para obtener el extracto metanólico.

Este procedimiento fue realizado en un lapso de 24 horas. (Esquemas 1 y 2).

Una vez obtenido ambos extractos metanólicos, se procedió a filtrar por gravedad. A continuación un esquema de la extracción de las hojas para cada especie. Los pesos reflejados en el extracto metanólico son luego de haber filtrado y evaporado el mismo.



Esquema 1. Extracción de las hojas resistentes de *Vitis vinifera* con metanol.



Esquema 2. Extracción de las hojas susceptibles de *Vitis vinifera* con metanol.

V.3.3 Evaporación

El solvente del extracto metanólico de cada especie fue eliminado en un Rotavapor. Previamente a ello se almacenó una pequeña cantidad de cada extracto.



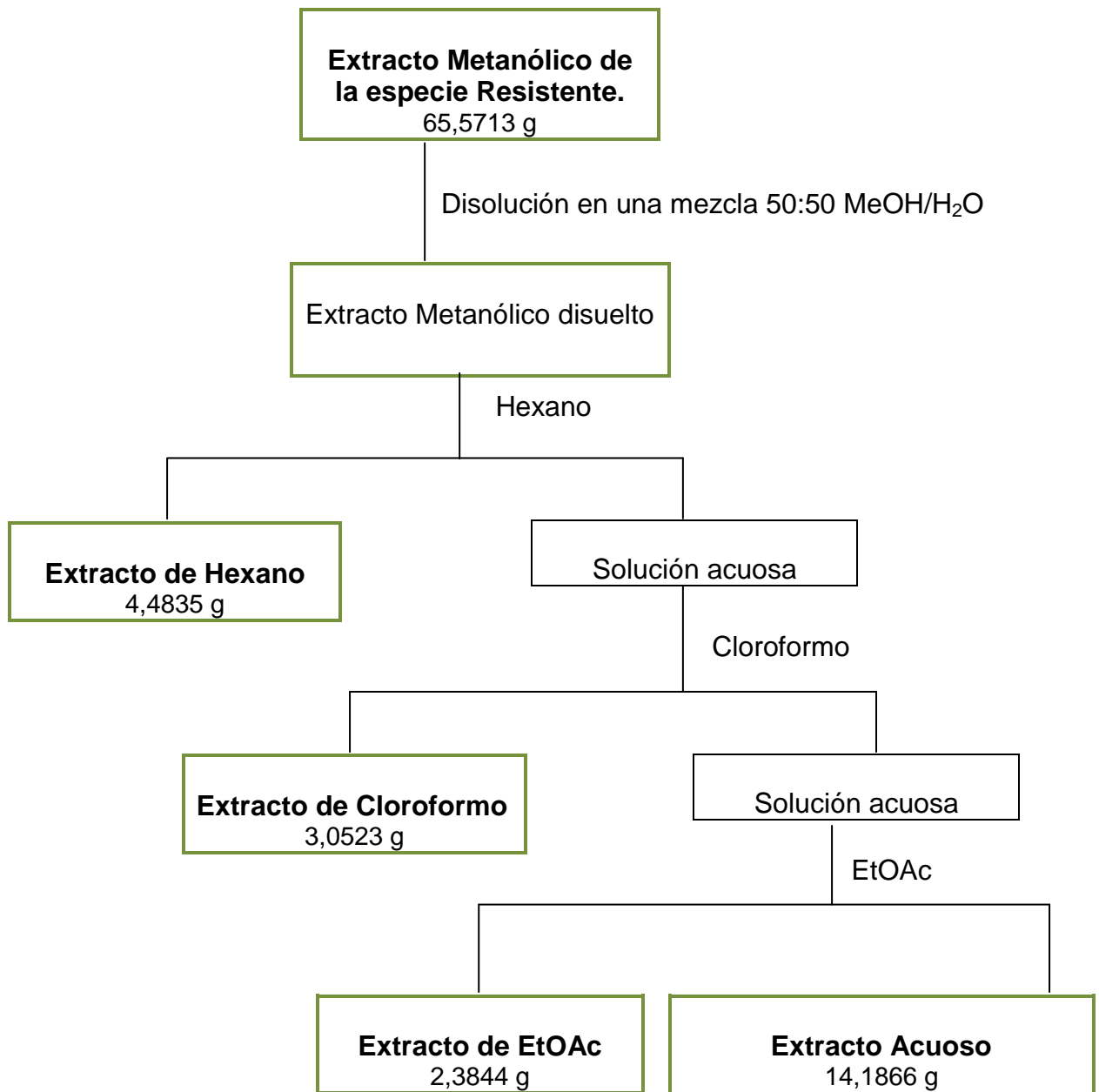
Figura 15. Rotavapor.

V.3.4 Particiones

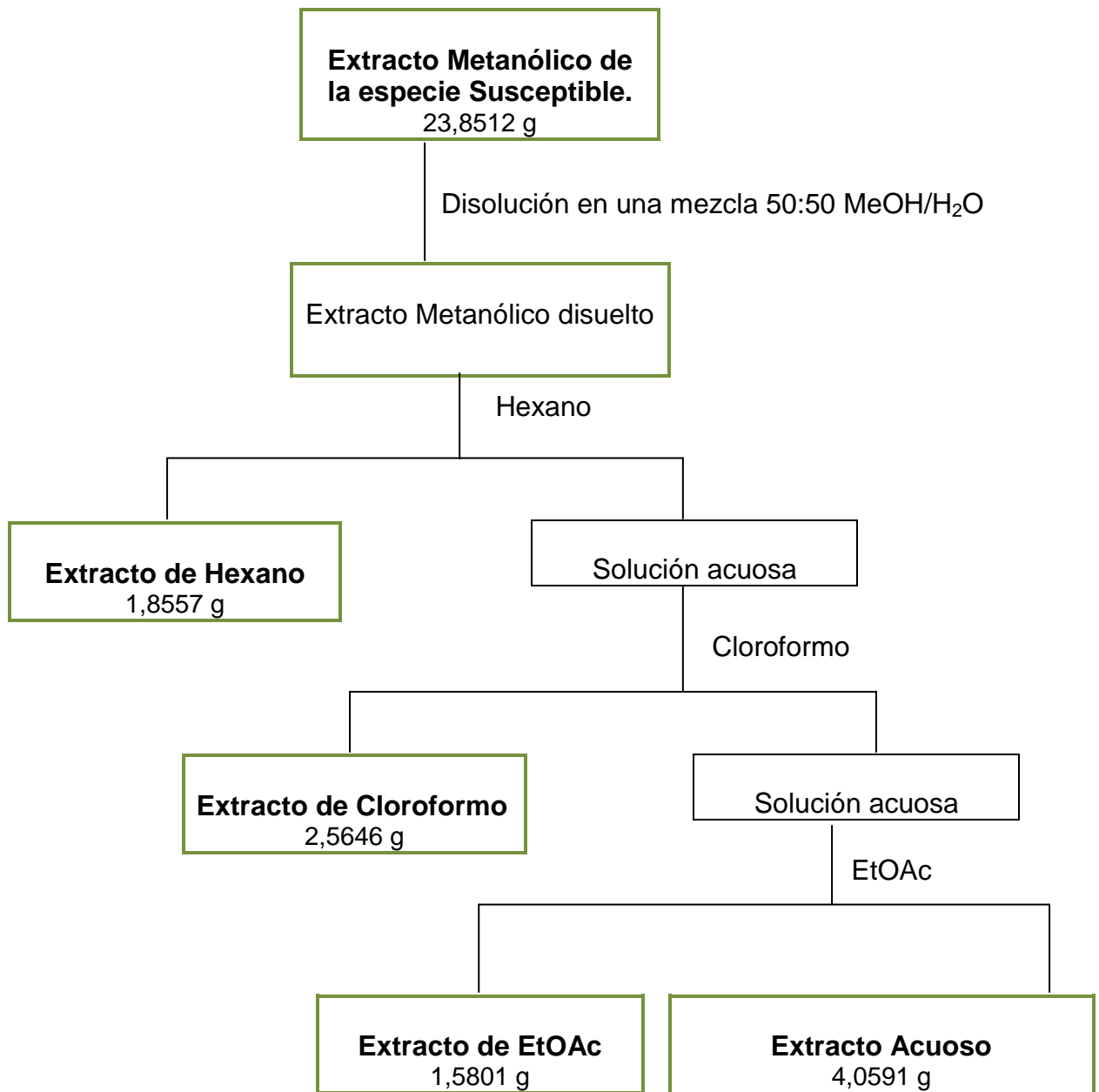
El extracto metanólico de ambas especies se disolvió en una mezcla 50:50 MeOH/H₂O.

Una vez disueltos, se realizaron particiones con solventes de diferente polaridad empezando por hexano, seguidamente cloroformo, y finalmente acetato de etilo; para obtener así los extractos correspondientes y el extracto acuoso como residuo final. (Esquemas 3 y 4).

Cada extracto obtenido se secó con sulfato de magnesio (MgSO₄), luego se filtró y finalmente se evaporó su respectivo disolvente utilizando un Rotavapor.



Esquema 3. Esquema de Separación para las particiones del extracto metanólico de la especie Resistente.



Esquema 4. Esquema de Separación para las particiones del extracto metanólico de la especie Susceptible.

V.3.5 Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Una vez obtenidos los extractos orgánicos de la especie resistente y de la especie susceptible, se hizo uso de la cromatografía de capa fina (CCF) en cada uno de ellos.

Se realizó en placas pequeñas de sílica gel, utilizando diferentes solventes y mezclas de distinta polaridad; determinándose las condiciones necesarias para lograr la separación óptima de los componentes. Estas placas fueron visualizadas mediante luz ultravioleta (UV), posteriormente se hizo uso de reveladores como p-anisaldehído, vainillina, y reactivos para identificación de flavonoides.

Luego de obtener las condiciones para cada extracto, se procedió a realizar otro análisis mediante (CCF) para comparar los extractos de hexano, cloroformo, acetato de etilo y acuoso, de manera de identificar alguna diferencia entre las especies.

También se utilizó CCF en dos dimensiones, para lograr una mejor separación de cada extracto, al comparar las especies resistente y susceptible en algunos de los extractos orgánicos.

V.3.6 Cromatografía en Columna (CC)

Mediante la técnica de cromatografía en columna fueron separados algunos de los extractos orgánicos en donde se observaba mayor cantidad de metabolitos secundarios, utilizando como eluyente diferentes solventes o mezclas de solventes orgánicos.

V.3.7 Ensayos Biológicos

Se evaluó la acción antimicrobiana de cada uno de los extractos sobre hongos y bacterias que parasitan a la planta, mediante el método de difusión sobre placas de agar.

V.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.4.1 Porcentajes p/p de los extractos obtenidos para cada especie

V.4.1.1 Especie Resistente

Masa inicial hojas: 261,86 ± 0,01 g

Masas obtenidas en cada extracto:

	Masa (+/- 0,0001)g	Porcentaje p/p con respecto a la masa inicial de las hojas. (%)
EPVVRM	65,5713	25,04
EPVVRH	4,4835	1,71
EPVVRC	3,0523	1,17
EPVVRAcEt	2,3844	0,91
EPVVRAcuoso	14,1866	5,42

Tabla 1. Masa y porcentajes p/p de los extractos obtenidos a partir de la especie resistente.

V.4.1.2 Especie Susceptible

Masa inicial hojas: 127,07 ± 0,01 g

	Masa (+/- 0,0001)g	Porcentaje p/p con respecto a la masa inicial de las hojas. (%)
EPVVSM	23,8512	18,77
EPVVSH	1,8557	1,46
EPVVSC	2,5646	2,02
EPVVSAcEt	1,5801	1,24
EPVVSAcuoso	4,0591	3,19

Tabla 2. Masa y porcentajes p/p de los extractos obtenidos a partir de la especie susceptible.

Los porcentajes calculados para el extracto metanólico, de hexano, cloroformo, acetato de etilo y acuosos se calcularon de acuerdo a la masa inicial de las hojas para cada especie.

V.4.2 CCF para determinar las condiciones de separación:

Se realizó un análisis comparativo de CCF para los extractos orgánicos de las especies resistente y susceptible, con diferentes fases móviles, para encontrar así la fase móvil que genere una mejor separación de los componentes.

En estas placas de CCF se comparó la especie resistente con la especie susceptible, y éstas a su vez se compararon con la mezcla de ambos extractos (C).

V.4.2.1 Extractos de Hexano

Para los extractos de hexano se utilizaron 3 tipos de fases móviles, para observar cómo se desarrollaba la separación a medida que se variaba la fase móvil.

Para la primera fase móvil se tiene la siguiente placa cromatográfica:

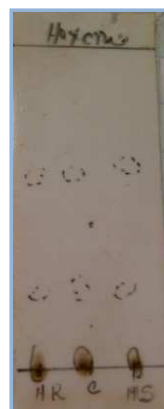


Figura 16. CCF de los extractos de hexano de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: hexano.

Las condiciones para su desarrollo fueron:

Fase móvil: Hexano.

Revelador: *p*-anisaldehído.

En ésta placa (Fig.16), se puede observar las mismas manchas tanto en la especie resistente como en la especie susceptible, pero muy pocos metabolitos secundarios.

Sin embargo al cambiar la fase móvil se observó una mejor separación de los metabolitos secundarios y mayor cantidad de los mismos, como se puede observar en la (Fig. 17). Las condiciones para la segunda placa de CCF fueron:

Fase móvil: 7:3 Hexano/Cloroformo.

Revelador: *p*-anisaldehído.

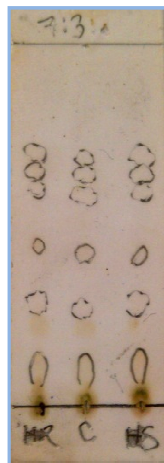


Figura 17. CCF de los extractos de hexano de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: 7:3 Hexano/Cloroformo.

Posteriormente se desarrolló otra placa de CCF variando nuevamente la fase móvil (Fig.18), y se observó que también presentaba buena separación, pero no tanto como en la fase móvil 7:3 hexano/cloroformo; la cual presentó claramente mayor cantidad de metabolitos.

Las condiciones para la siguiente placa de CCF fueron:

Fase móvil: cloroformo.

Revelador: *p*-anisaldehído.

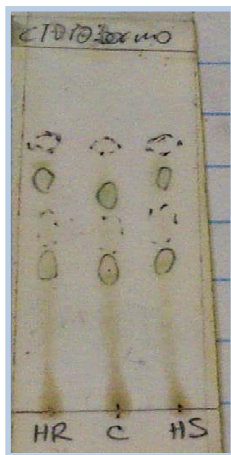


Figura 18. CCF de los extractos de hexano de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: Cloroformo

V.4.2.2 Extractos de Cloroformo

Para los extractos de cloroformo también se variaron las condiciones de fase móvil. La primera placa de CCF se realizó con las siguientes condiciones:

Fase móvil: Cloroformo.

Revelador: *p*-anisaldehído.

Se muestra en la (Fig.19), cómo se logró una buena separación de los metabolitos secundarios presentes en este extracto de la especie resistente y la especie susceptible y en la mezcla de ambos extractos, observándose el mismo número de metabolitos para ambas especies.

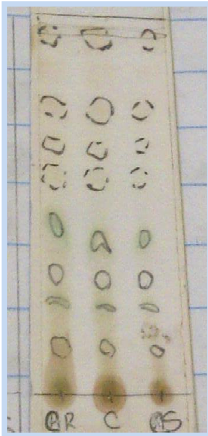


Figura 19. CCF de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: Cloroformo.

Al cambiar la fase móvil en la segunda placa de CCF (Fig.20), se observó que la separación no fue eficiente, como en el caso anterior.

Las condiciones para la fase móvil fueron:

Fase Móvil: 99:1 Cloroformo/Metanol.

Revelador: *p*-anisaldehído.

Estos resultados se pueden apreciar en la siguiente figura 20:

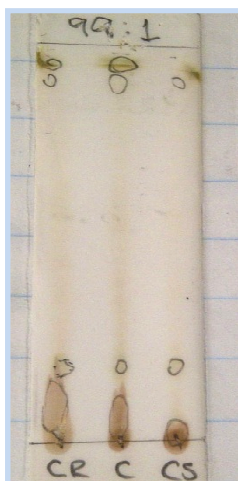


Figura 20. CCF de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: 99:1 Cloroformo/Metanol.

V.4.2.3 Extractos de Acetato de Etilo

Para los extractos de acetato de etilo se desarrolló una placa de CCF, con las siguientes condiciones:

Fase móvil: 9:1 Acetato de Etilo/Metanol

Revelador: *p*-anisaldehído.

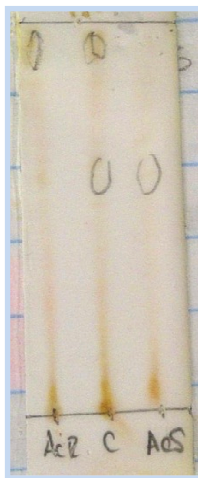


Figura 21. CCF de los extractos de Acetato de Etilo de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: 9:1 Acetato de Etilo/Metanol.

En la (Fig.21), se observa una buena separación, y además la presencia de un metabolito secundario tanto en la especie resistente como en la especie susceptible.

Posteriormente se hizo uso de CCF en fase reversa. Las condiciones fueron:

Fase móvil: 8:2 Acetato de Etilo/Metanol

Revelador: *p*-anisaldehído.



Figura 22. CCF en fase reversa de los extractos de Acetato de Etilo de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: 8:2 Acetato de Etilo/Metanol.

Como se puede observar en la (Fig.22), con la especie susceptible no se visualizó la separación de los metabolitos secundarios; mientras que la especie resistente si muestra separación. Por tanto la mejor condición para separar los metabolitos de los extractos de acetato de etilo fue como se evidenció en la (Fig. 21), donde muestra mejor separación de los metabolitos secundarios en ambas especies.

V.4.2.4 Extractos Acuoso

A continuación se muestra la placa de CCF para la especie resistente del extracto acuoso. Las condiciones fueron:

Fase móvil: 9:1 Acetato de Etilo/Metanol Revelador: *p*-anisaldehído.

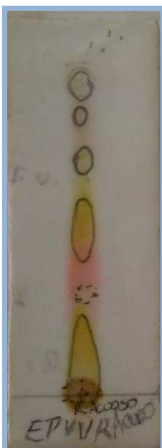


Figura 23. CCF del extracto Acuoso de la especie resistente, con una fase móvil: 9:1 Acetato de Etilo/Metanol y revelador: *p*-anisaldehído.

La placa de CCF para la especie susceptible del extracto acuoso (Fig.24), se realizó con las mismas condiciones.



Figura 24. CCF del extracto Acuoso de la especie susceptible, con una fase móvil: 9:1 Acetato de Etilo/Metanol y revelador: p-anisaldehído.

Al comparar ambas placas de CCF se puede visualizar en la (Fig.23), una buena separación y mayor número de metabolitos; mientras que en la (Fig.24) se observa muy poca separación.

Una vez realizada las placas de CCF para determinar las condiciones de separación, se utilizó adicionalmente la técnica de cromatografía de capa fina en 2D (2 dimensiones) para obtener una mejor resolución en el estudio comparativo entre la especie resistente y la especie susceptible.

Este estudio en 2D, se realizó para algunos de los extractos orgánicos y se compararon a su vez con las placas de CCF en una dimensión.

V.4.3 CCF comparativos de las especies resistente y susceptible en una y dos dimensiones.

V.4.3.1 Para los extractos de Hexano: EPVVRH y EPVVSH

En 1 Dimensión:

Se utilizó una placa de CCF 20 x 20 cm comparativo de las especies resistente y susceptible de hexano, con las siguientes condiciones:

Fase Móvil: 7:3 Hexano/Cloroformo.

Revelador: *p-anisaldehído*.

Se muestra a continuación en la (Fig.25), una buena separación para esa fase móvil utilizada.

Sin embargo al comparar ambas especies se observa que hay un metabolito secundario en el extracto de la especie resistente que no se observa para la especie susceptible; lo cual establece una diferencia entre ambas especies.

De manera general se ven los mismos metabolitos para ambas especies, exceptuando la presencia del metabolito mencionado inexistente en el extracto de la de la especie susceptible.

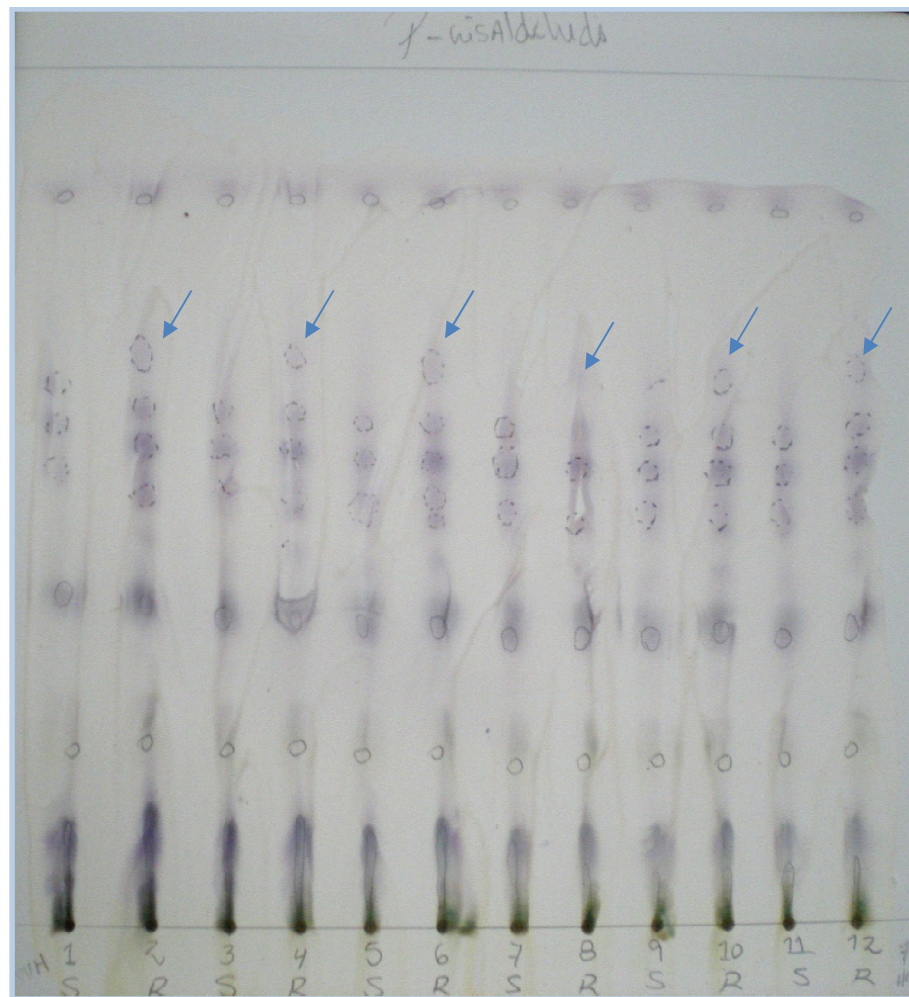


Figura 25. CCF comparativo de los extractos de Hexano de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: 7:3 Hexano/Cloroformo.

Adicionalmente se compararon otras placas de CCF en 2D para ambas especies por separado, para visualizar mejor las manchas respectivas.

En 2 Dimensiones:

Se utilizó una placa de CCF en 2D 6 x 6 cm del extracto **EPVVRH**, con las siguientes condiciones:

Primera cámara de desarrollo (1era fase móvil): Cloroformo.

Segunda cámara de desarrollo (2da fase móvil): 7:3 hexano/cloroformo.

Revelador: *p-anisaldehído*.

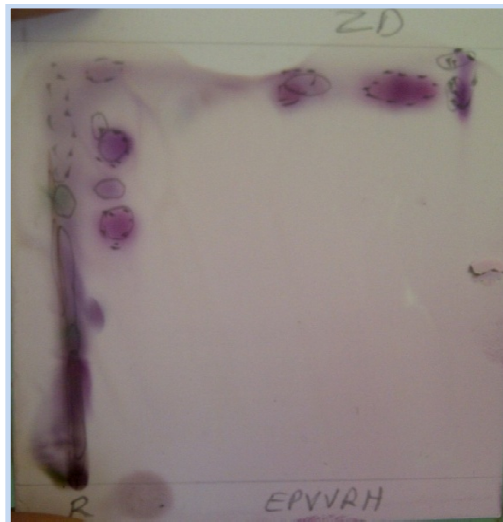


Figura 26. CCF del extracto de hexano de la especie resistente (EPVVRH) en 2D, con una primera fase móvil: cloroformo y una segunda fase móvil: 7:3 hexano/cloroformo.

En esta placa (Fig.26), se puede observar que en la primera mancha hay presencia de 4 metabolitos secundarios.

Posteriormente se realizó la misma placa en 2D pero para el extracto **EPVSSH**, con las mismas condiciones:

Primera cámara de desarrollo (1era fase móvil): Cloroformo.

Segunda cámara de desarrollo (2da fase móvil): 7:3 hexano/cloroformo.

Revelador: *p-anisaldehído*.

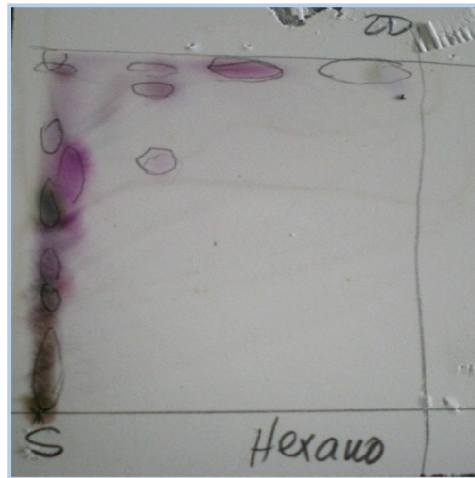


Figura 27. CCF del extracto de hexano de la especie susceptible (EPVVSH) en 2D, con una primera fase móvil: cloroformo y una segunda fase móvil: 7:3 hexano/cloroformo.

Como se puede mostrar en la (Fig.27) la primera mancha también presenta los mismos metabolitos secundarios que se observan en la especie resistente (Fig. 26); por lo tanto no hay diferencias entre ambas placas.

V.4.3.2 Para los extractos de Cloroformo: **EPVVRC** y **EPVVSC**

En 1 Dimensión:

Se utilizó una placa de CCF 20 x 20 cm comparativo de la especie resistente y la especie susceptible, con las siguientes condiciones:

Fase Móvil: Cloroformo

Revelador: Naturstoff (para Flavonoides).

Se observa en la (Fig.28) que la especie resistente presenta mayor cantidad de metabolitos secundarios.

La especie susceptible fue sembrada en la misma concentración que la especie resistente. No obstante se observa en la placa un menor número de metabolitos secundarios en comparación con la especie resistente.

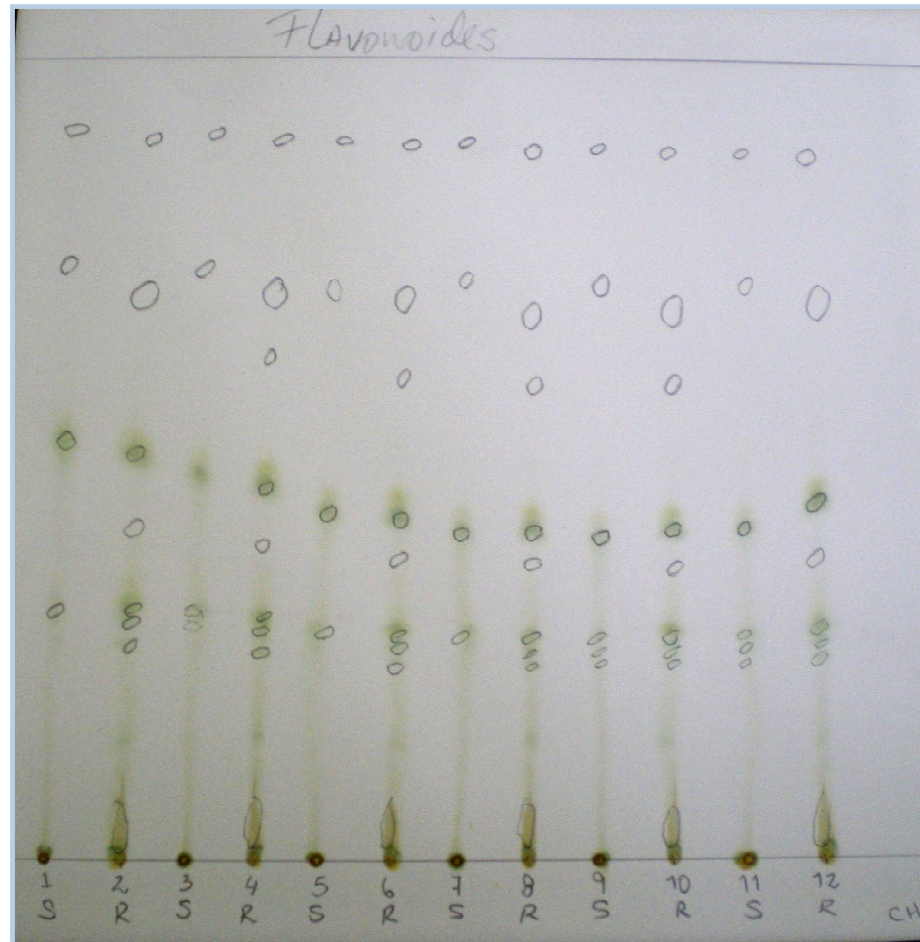


Figura 28. CCF comparativo de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: Cloroformo y revelador: Naturstoff.

Adicionalmente, se desarrolló otra placa de CCF (Fig.29), con una fase móvil de Cloroformo, y se visualizó con otro revelador como el *p-anisaldehído*.

Al cambiar de revelador se observó mayor cantidad de metabolitos secundarios. Por otro lado, se sigue observando en la especie resistente mayor cantidad de metabolitos secundarios en comparación con la especie susceptible.



Figura 29. CCF comparativo de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: Cloroformo y revelador: p-anisaldehído.

Posteriormente se realizó una última placa de CCF con la misma fase móvil pero cambiando nuevamente de revelador el cual fue Vainillina.

En la (Fig.30) se muestra la placa y se observa en ella los mismos metabolitos secundarios tanto en la especie resistente como en la especie susceptible, con la única diferencia que la especie resistente se sigue observando como en los casos anteriores con mayor proporción que la especie susceptible.

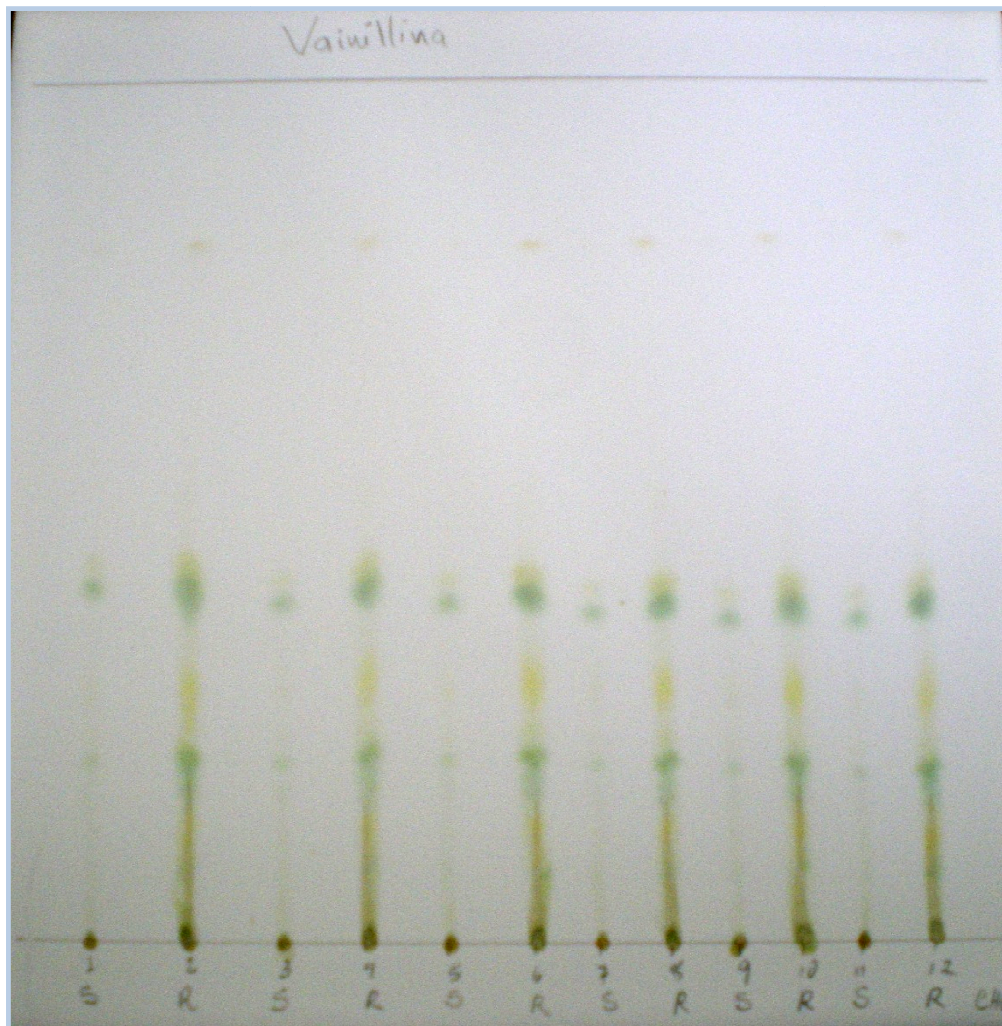
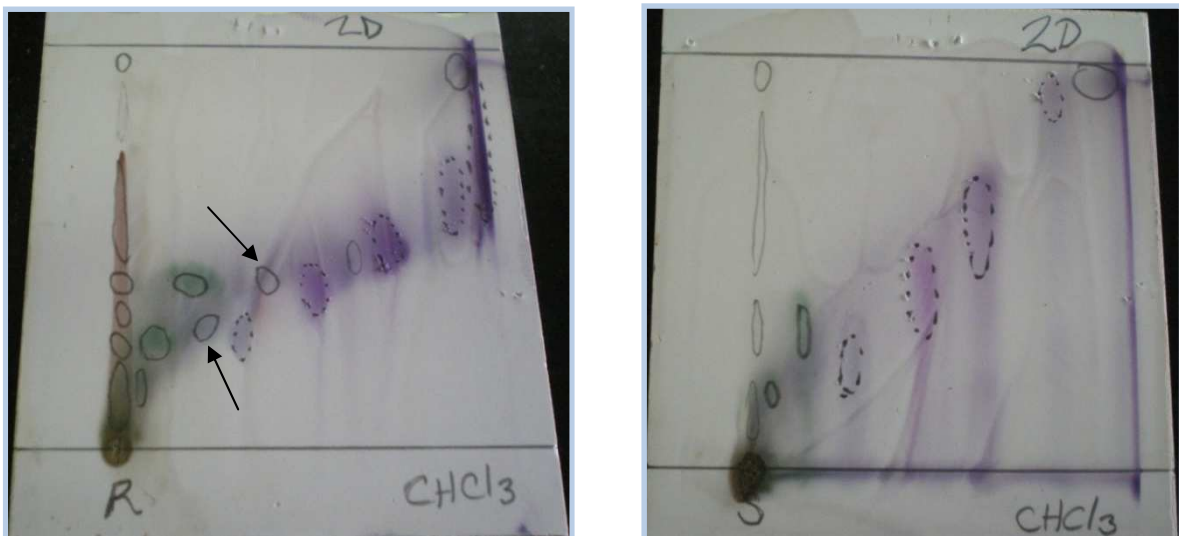


Figura 30. CCF comparativo de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con una fase móvil: Cloroformo y revelador: vainillina.

De los tres reveladores utilizados, el *p-anisaldehído* fue el que reveló mejor los metabolitos secundarios presentes en ambas especies, y además de visualizarse mayor cantidad de metabolitos para la especie resistente.

En 2 Dimensiones:

Se utilizaron placas de CCF 6 x 6 cm para ambas especies; la primera cámara de desarrollo fue con una fase móvil: cloroformo y para la segunda cámara de desarrollo fue con una fase móvil de 8:2 Cloroformo/Hexano. El revelador utilizado fue el *p-anisaldehído*.



Figuras 31 y 32. CCF comparativo en 2D de los extractos de Cloroformo de la especie resistente y susceptible, con una primera fase móvil: cloroformo y una segunda fase móvil: 8:2 Cloroformo/Hexano.

En las figuras 31 y 32 se muestra ambas placas, y se observa que en la especie resistente hay 2 metabolitos secundarios que en la especie susceptible no se evidencian. Por tanto en dos dimensiones se visualiza mejor este resultado.

Debido a esta observación se procedió a desarrollar otra placa de CCF en 2D pero utilizando una placa de CCF 20 x 20 cm para tener una mejor visualización.

Tanto para la especie resistente como para la especie susceptible se utilizaron las mismas condiciones de la placa anterior.

Como se puede visualizar en la (Fig.33) la especie resistente muestra los metabolitos secundarios separados, observándose además algunos con mayor proporción que otros.



Figura 33. CCF en 2D del extracto de Cloroformo de la especie resistente con una primera fase móvil: cloroformo y una segunda fase móvil: 8:2 Cloroformo/Hexano y revelador: p-anisaldehído.



Figura 34. CCF en 2D del extracto de Cloroformo de la especie susceptible con una primera fase móvil: cloroformo y una segunda fase móvil: 8:2 Cloroformo/Hexano y revelador: p-anisaldehído.

En la (Fig.34) se puede evidenciar que la especie susceptible presenta los metabolitos secundarios más separados comparándolo con la (Fig.33) de la especie resistente.

Al comparar ambas especies se puede observar que la especie resistente presenta mayor cantidad de metabolitos secundarios; mientras que la especie susceptible tiene menor cantidad de los mismos.

Es importante mencionar que el extracto que presenta mejor actividad en los resultados de los ensayos biológicos se separaría por Cromatografía en Columna y posteriormente se identificaría mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

Sin embargo, aún sin conocer los resultados de los ensayos biológicos, se procedió a separar a través de la técnica de Cromatografía en Columna (CC), los metabolitos que pudiesen estar presentes en el extracto de Cloroformo; ya que fue el extracto que presentó en cromatografía de capa fina (CCF) algunas diferencias entre las especies.

V.4.4 Cromatografía en Columna (CC) para los extractos de Cloroformo de la especie resistente y de la especie susceptible (EPVVRC y EPVVSC).

V.4.4.1 Para la especie susceptible (EPVVSC):

Para el empacado de la columna en fase normal, se utilizaron las siguientes condiciones:

50 g de Sílica.

Muestra introducida: 1,0226 g \pm 0,0001 g de extracto EPVVSC.

Mezcla de Elución: 7:3 Hexano/cloroformo.

Luego de desarrollarse la columna, se recogieron en total 24 fracciones.

De las cuales se le aplicó a cada una de ellas CCF para observar las diferencias y/o similitudes y dependiendo de ello, se unieron algunas de ellas ya que presentaban las mismas manchas en CCF ó en su defecto no se observaba ninguna mancha en algunas fracciones.

Las fracciones se unieron de la siguiente manera:

Muestra	Fracciones Combinadas
a	(1-5)
b	(6-9)
c	(10-13)
d	(14-17)
e	(18-21)
f	(22-24)

Tabla 3. Fracciones combinadas en muestras para el extracto de cloroformo de la especie susceptible (EPVVSC).

La masa obtenida para cada muestra del extracto EPVVSC se tabula a continuación:

Muestra	Masa (g) \pm (0,0001) g
a	0,0208
b	0,0264
c	0,0599
d	0,0576
e	0,5908
f	0,4569

Tabla 4. Muestras y masas del extracto de cloroformo de la especie susceptible (EPVVSC).

V.4.4.2 Para la especie resistente (**EPVVRC**):

Para el empacado de la columna se utilizaron las siguientes condiciones:

50 g de Sílica.

Muestra introducida: 0,7370 g \pm 0,0001 g de extracto EPVVRC

Tres solventes de elución: 50:50 Hexano/cloroformo, 8:2 Cloroformo/Hexano y Cloroformo.

Adicionalmente se incrementó la polaridad de la mezcla eluyente; ya que se necesitaba que los componentes más polares pudiesen separar más efectivamente.

Al desarrollarse la columna, se recogieron en total 21 fracciones. De las cuales se le aplicó a cada una de ellas CCF para observar las diferencias y/o similitudes.

Las fracciones se unieron de la siguiente manera:

Muestra	Fracciones Combinadas
a	(1)
b	(2-4)
c	(5-8)
d	(9-11)
e	(12-13)
f	(14)
g	(15-16)
h	(17-19)
i	(20)
j	(21)

Tabla 5. Fracciones combinadas en muestras para el extracto de cloroformo de la especie resistente (EPVVR).C).

La masa obtenida para cada muestra del extracto EPVVRG se tabula a continuación:

Muestra	Masa (g) \pm (0,0001) g
a	0,1357
b	0,0866
c	0,0422
d	0,0067
e	0,0238
f	0,0326
g	0,1374
h	0,0596
i	0,0073
j	0,1139

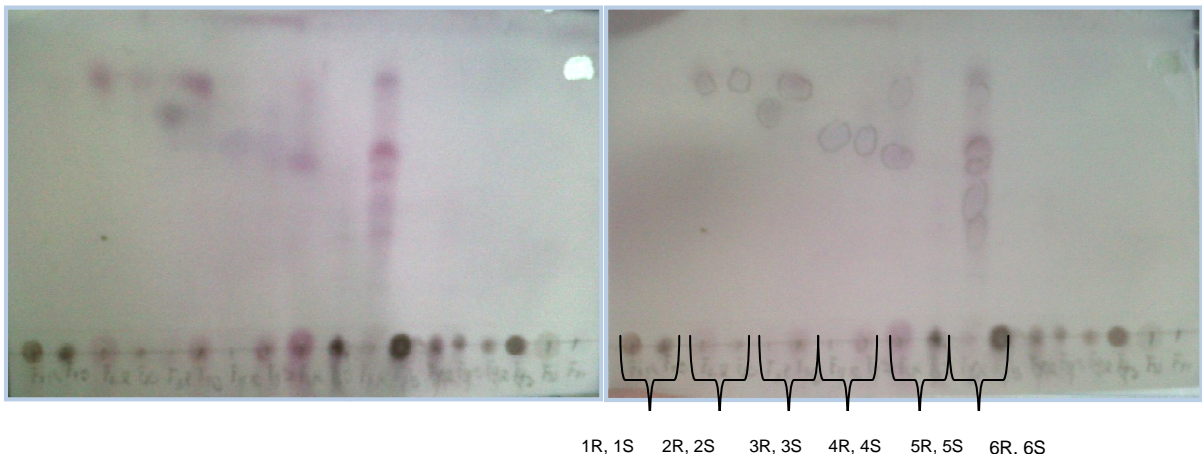
Tabla 6. Muestras y masas del extracto de cloroformo de la especie resistente (EPVVRG).

La caracterización de los compuestos presentes en estas muestras no se llevó a cabo, ya que en los resultados de los ensayos biológicos no se presentó una diferencia significativa en la actividad.

V.4.4.3 CCF comparativo para las fracciones obtenidas tanto en la especie susceptible como en la especie resistente.

Se compararon las fracciones obtenidas para ambas especies; comenzando con la fracción 1 de la especie resistente, seguidamente la fracción 1 de la especie susceptible y así sucesivamente hasta llegar a la fracción 9, utilizando como mezcla de elución: 7:3 hexano/cloroformo.

Se muestra a continuación en las figuras 35 y 36 la placa de CCF de estas muestras.



Figuras 35 y 36. CCF comparativo de las fracciones obtenidas en CC del extracto EPVVRC y EPVVSC, con mezcla de elución: 7:3 hexano/cloroformo.

- ✓ En las fracciones 1 de ambas especies no se observa la separación de metabolitos secundarios con la fase móvil utilizada, quedan retenidos en el punto de siembra.
- ✓ En las fracciones 2 se observa el mismo metabolito secundario en ambas especies.
- ✓ En las fracciones 3 se puede observar un metabolito secundario distinto en ambas especies.
- ✓ En las fracciones 4 pasa lo mismo como en la fracción 2; el mismo metabolito secundario en ambas especies.
- ✓ En las fracciones 5 se observa sólo en la especie resistente la presencia de 2 metabolitos secundarios; mientras que en la especie susceptible no se observa separación.
- ✓ En las fracciones 6 se observa gran cantidad de metabolitos secundarios en la especie resistente; mientras que en la especie susceptible no se observa separación.
- ✓ En las fracciones 7, 8 y 9 no se observa separación de los metabolitos, ya que quedan todos retenidos en el punto de siembra.

V.4.5 Ensayos Biológicos

Se evaluó la acción antimicrobiana de cada uno de los extractos sobre hongos y bacterias mediante el método de difusión sobre placas de agar.

➤ Los hongos estudiados fueron:

Aspergillus flavus, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*.

➤ Además de bacterias como:

Bacillus cereus, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El análisis fue realizado en el departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En los hongos:

Tabla 7. Resultados de la acción antifúngica. Diámetros (Medida en mm) (-) sin efecto

Muestra	10 mg/ml	<i>A.flavus</i>	<i>T.harzianum</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>B.cinerea</i>
Resistente	Hexano	-	-	-	-
	CHCl₃	-	-	12	-
	AcEt	-	-	-	-
	Acuoso	-	-	-	-
Susceptible	Hexano	-	-	-	-
	CHCl₃	-	-	-	-
	AcEt	-	-	-	-
	Acuoso	-	-	-	-
Controles	Negativo	-	-	-	-
	Nistatina	25	23	26	-

En las bacterias:

Tabla 8. Resultados de la acción antibacteriana. Diámetros (Medida en mm) / (-) sin efecto

Muestra	10 mg/ml	<i>B.cereus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Resistente	Hexano	7	7	8	6
	CHCl₃	-	6	7	8
	AcEt	6	7	-	7
	Acuoso	-	7	-	-
Susceptible	Hexano	7	7	6	13
	CHCl₃	-	6	6	10
	AcEt	-	-	-	8
	Acuoso	-	-	-	8
Controles	Negativo	-	-	-	-
	Ofloxacina	30	27	38	-
	Amikacina	23	15	26	-
	Estreptomina	20	11	10	-
	Gentamicina	18	18	19	-

En las Tablas 7 y 8 se puede visualizar los resultados de los ensayos biológicos evaluados frente a hongos y bacterias.

En la tabla 7 se tienen los resultados frente a hongos, y se observa que el extracto de cloroformo de la especie resistente fue el único que presentó cierta actividad en el hongo *Fusarium oxysporum*.

Respecto a las bacterias en la Tabla 8 se puede mostrar que tanto la especie resistente como la especie susceptible presentan una modesta actividad.

Por otro lado al comparar cada especie con las bacterias estudiadas; se tiene que los extractos no difieren significativamente en la actividad que presentan.

También hay que destacar que el extracto acuoso presenta poca actividad en la especie resistente frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* y la especie susceptible tiene aún más actividad frente a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Dada las características físicas de los extractos; las cuales sugerían la presencia de azúcares en los mismos, lo cual fue confirmado con la prueba del reactivo de Molish, se procedió a separar estos extractos utilizando cromatografía de fase reversa.

A continuación se describe esta separación y la caracterización de las muestras más importantes obtenidas de ellos.

V.4.6 Cromatografía en Columna (CC) en fase reversa, para los extractos acuosos de la especie resistente y de la especie susceptible. (EPVVRA y EPVISA).

Antes de llevarse a cabo la CC, se realizaron varias placas de CCF en fase normal variando la fase móvil para observar en cual separaba mejor.

Las fases móviles fueron:

8:2 Cloroformo/Metanol	8:2 Acetato de Etilo/Metanol
1:1 Acetato de Etilo/Metanol	9:1 Acetato de Etilo/Metanol
9:1 Acetato de Etilo/Trietilamina	9:1 Metanol/Trietilamina

Con fase normal no se observaba una eficiente separación; ya que los componentes son muy polares. Por tanto se procedió a utilizar placas de CCF en fase reversa en donde si se observaba una mejor separación de los componentes.

La mejor condición obtenida de la fase móvil en fase reversa fue de 1:1 Metanol/Agua; ya que al ser éstos más polares se logró separar eficazmente los componentes de los extractos acuosos de las especies resistente y susceptible.

V.4.6.1 Para la especie susceptible (EPVVSA):

El extracto acuoso de la especie susceptible fue un sólido de color caramelo y de aspecto higroscópico, como se puede observar en la siguiente figura.



Figura 37. Muestra del extracto acuoso de la especie susceptible EPVVSA.

El extracto acuoso de la especie susceptible (EPVVSA) se disolvió en metanol y se sembró de muestra aproximadamente 1,0201 g. en una columna de RP-18 la cual fue eluida con una mezcla metanol/agua (1:1), se obtuvo un total de diez fracciones. Las mayoritarias fueron sometidas a análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C .

El extracto al disolverse en metanol quedó una parte insoluble en el fondo del tubo de ensayo. Por tanto se añadió a la columna la fase soluble que fue un peso de 0,7034 g finalmente.

Luego de desarrollarse la columna se hizo uso de CCF para observar detalladamente las fracciones y conocer cuales se podían unir. Las fracciones a unir quedaron de la siguiente manera:

Muestra	Fracciones Combinadas
a	(1-3)
b	(4)
c	(5-6)
d	(7-8)
e	(9-10)

Tabla 9. Fracciones combinadas en muestras para el extracto acuoso de la especie susceptible (EPVVSA).

La masa obtenida para cada muestra del extracto acuoso de la especie susceptible (EPVVSA) se tabula a continuación:

Muestra	Masa (g) \pm (0,0001) g
a	0,0009
b	0,0122
c	0,2028
d	0,1610
e	0,0359

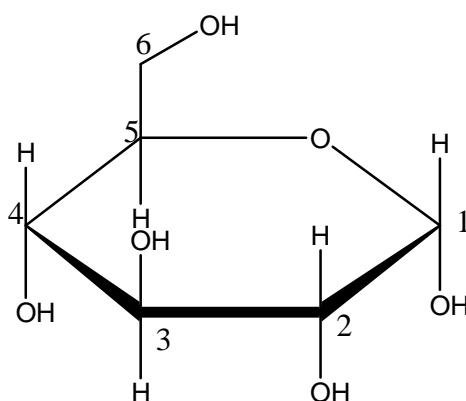
Tabla 10. Muestras y masas del extracto acuoso de la especie susceptible (EPVVSA).

Las muestras c y d, de las cuales se obtuvo una masa relativamente alta se sometieron a un análisis por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para ser identificados los componentes de ambas fracciones.

La muestra identificada como EPVVSA (d) de 0.161g, mostró señales características de compuestos glicosilados, observándose un grupo de señales bastante complejas en la zona entre 3.03 y 5.24 ppm. (Ver Espectro # 1).

Era evidente la presencia de una glucosa en el polisacárido al presentar una señal con un desplazamiento químico de 5.18 ppm (doblete, $J = 7.3$ Hz), así como el doblete de doblete a un desplazamiento químico de 4.00 ppm. (Ver espectro #2).

A continuación se muestra la estructura de la glucosa **(33)**:



33

El análisis de RMN de ^{13}C (espectro # 3) el cual fue analizado conjuntamente con un experimento DEPT (Espectro # 4), corroboró la presencia de la glucosa como parte de ese polisacárido aislado, la señal a δ 101.9 es característica del carbono anomérico de ese azúcar.

El número de carbonos observados en el espectro de carbono trece, pareciera indicar la presencia de un tetrasacárido, cuya estructura fundamental lo constituye la glucosa. No contamos para el momento de describir estos resultados con análisis de espectrometría de masas que nos permitirían una mejor caracterización del polisacárido presente en esta muestra.

A continuación se tabulan los desplazamientos químicos obtenidos en el espectro de protones y en el espectro de carbono trece para la molécula de la glucosa y los desplazamientos químicos reportados en la literatura³⁸.

H/C	δ (ppm) ^1H [m; J (Hz)] (Exp.)	δ (ppm) ^1H [m; J (Hz)] (Rep.)	δ (ppm) ^{13}C (Exp.)	δ (ppm) ^{13}C (Rep.)
1	5.18 (d;7.3)	5.20 (d;7.8)	101.9	100.6
2	4.02(dd)	4.01(dd)	74.5	74.5
3	4.55(d;6.3)	4.30 (d;8.3)	76.3	78.3
4	***	4.22 (t;9.3)	71.8	71.7
5	3.99	3.98 (m)	80.0	78.0
6	4.52	4.52 (dd;12,2)	62.9	62.8

Tabla 11. Desplazamientos químicos experimentales y reportados de las señales de RMN ^1H y RMN ^{13}C para la molécula de la glucosa de la muestra (d) del extracto acuoso de la especie susceptible.

Una segunda muestra analizada en el extracto acuoso de la especie susceptible, identificada como EPVISA (c), presentó características muy similares a las previamente descritas para la muestra EPVISA (d), tanto en el espectro de RMN de protones (espectro # 5) como en el de carbono trece (Espectro # 6) se identificaron señales características de polisacáridos.

A continuación se tabulan los desplazamientos químicos obtenidos en el espectro de protones y en el espectro de carbono trece para la molécula de la glucosa.

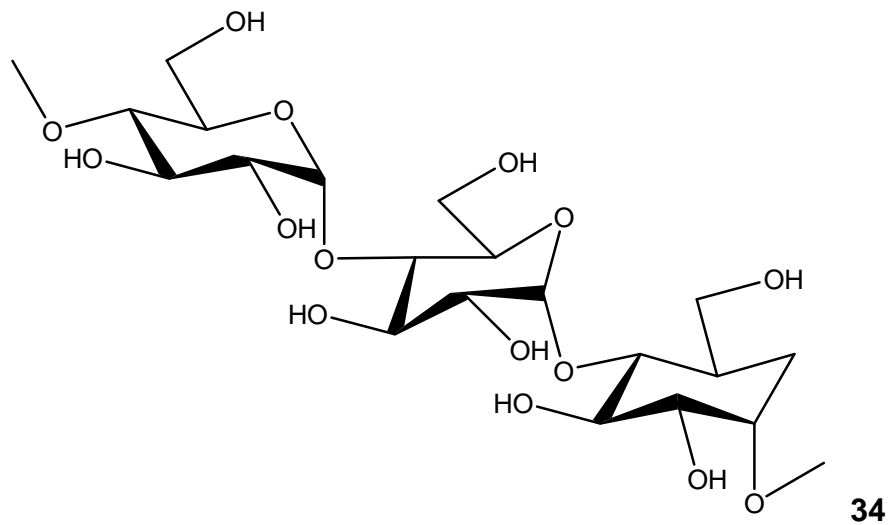
H/C	δ (ppm) ^1H [m; J (Hz)] (Exp.)	δ (ppm) ^1H [m; J (Hz)] (Rep.)	δ (ppm) ^{13}C (Exp.)	δ (ppm) ^{13}C (Rep.)
1	5.13 (d;9.7)	5.20 (d;7.8)	***	100.6
2	4.00	4.01(dd)	74.5	74.5
3	***	4.30 (d;8.3)	***	78.3
4	***	4.22 (t;9.3)	71.7	71.7
5	3.98	3.98 (m)	***	78.0
6	4.52	4.52 (dd;12,2)	62.8	62.8

Tabla 12. Desplazamientos químicos experimentales y reportados de las señales de RMN ^1H y RMN ^{13}C para la molécula de la glucosa de la muestra (c) del extracto acuoso de la especie susceptible.

No fue evidente como en el anterior la presencia del carbono anomérico de la glucosa, aunque se identificaron varios grupos CH_2 , típicos de ese azúcar a un desplazamiento químico de 62.8 ppm (espectro # 7). El número de carbonos observados pareciera sugerir un trisacárido.

La estructura que se muestra a continuación es un ejemplo de un trisacárido llamado amilosa³⁹, el cual contiene tres unidades de glucosa unidos a enlaces α -1,4'-glicosídicos **(34)**.

Tal como se mencionó en el caso anterior, se requiere por lo menos de un espectro de masas para corroborar esta afirmación.



V.4.6.2 Para la especie resistente (EPVVRA):

El extracto acuoso obtenido de la especie resistente se mostró de color caramelo oscuro, también higroscópico, y de aspecto pegajoso y pastoso.



Figura 38. Muestra del extracto acuoso de la especie resistente EPVVRA.

Un procedimiento similar al descrito con el extracto acuoso de la especie susceptible fue realizado con la especie resistente, utilizándose de muestra alrededor de 0,5232 g.

La muestra a sembrar fue más difícil para disolver en metanol y hubo problemas a la hora de eluir la columna, siendo necesario cambiar la composición de la misma para poder eluir lo sembrado inicialmente. La columna inicialmente se desarrolló con una primera fase móvil 50:50 metanol/agua, y luego se utilizó metanol como segunda fase móvil.

Se recogieron en total 10 fracciones, de las cuales se unieron de la siguiente manera:

Muestra	Fracciones Combinadas
a	(1-3)
b	(4)
c	(5-6)
d	(7-10)

Tabla 13. Fracciones combinadas en muestras para el extracto acuoso de la especie resistente (EPVVRA).

La masa obtenida para cada muestra del extracto acuoso de la especie resistente (EPVVRA) se tabula a continuación:

Muestra	Masa (g) \pm (0,0001) g
a	0,0046
b	0,0105
c	0,0756
d	0,2956

Tabla 14. Muestras y masas del extracto acuoso de la especie resistente (EPVVRA).

Luego de analizar por CCF las diferentes muestras, se observó dos muestras mayoritarias y otras muy pequeñas respecto a la masa. Las dos mayoritarias fueron c y d. Sin embargo, la muestra (d) no fue sometida a un análisis de RMN, ya que su consistencia fue muy pegajosa, por tanto difícil de trabajar. En vista de ello, se sometió a análisis por RMN a la muestra (c).

Dicho análisis por RMN de esa muestra a la cual se identificó como EPVVRA (c), tal como con las muestras analizadas para la especie susceptible, señaló la presencia de azúcares en la misma.

Se identificó igualmente la presencia de la glucosa como parte de la estructura analizada a un desplazamiento químico característico del carbono anomérico (δ 102 ppm). El número de carbonos pareciera indicar un trisacárido pero igualmente tal como fue discutido con la especie susceptible, otro tipo de análisis se hacen necesarios para caracterizar completamente esta fracción. (Ver espectros # 9,10 y 11).

A continuación una tabla comparativa de los desplazamientos químicos experimentales y reportados de la glucosa analizados para la muestra c del extracto acuoso de la especie resistente.

H/C	δ (ppm) ^1H [m; J (Hz)] (Exp.)	δ (ppm) ^1H [m; J (Hz)] (Rep.)	δ (ppm) ^{13}C (Exp.)	δ (ppm) ^{13}C (Rep.)
1	5.33 (d;8.1)	5.20 (d;7.8)	102	103.8
2	4.01	4.01(dd)	76.2	76.1
3	***	4.30 (d;8.3)	77.5	78.3
4	***	4.22 (t;9.3)	71.3	71.3
5	3.99	3.98 (m)	77.5	78.0
6	4.70	4.56	63.9	62.8

Tabla 15. Desplazamientos químicos experimentales y reportados de las señales de RMN ^1H y RMN ^{13}C para la molécula de la glucosa de la muestra (c) del extracto acuoso de la especie resistente.

La búsqueda de la literatura nos arrojó el reporte de polisacáridos de tipo hemicelulosa³⁷, los cuales están compuestos por repetidas unidades de pentosas de tipo D-xylosa y L-arabinosa en los frutos de la *Vitis vinífera*, más no se logró información de reporte alguno en las hojas de dicha planta. Futuros trabajos en nuestro grupo de investigación serán dedicados a la caracterización completa de los polisacáridos descritos en esta investigación.

VI.- Conclusiones

Se realizó el estudio fitoquímico comparativo de dos especies de *Vitis vinifera* resistente y susceptible a patógenos, de lo cual se concluye lo siguiente:

- El análisis comparativo de Cromatografía de Capa Fina (CCF) que se realizó fue de vital importancia ya que permitió observar diferencias y/o similitudes en los extractos obtenidos por partición de ambas especies (resistente y susceptible).
- La técnica de cromatografía de capa fina en 2D (2 dimensiones) que se utilizó adicionalmente en el estudio comparativo de la especie resistente y de la especie susceptible, permitió obtener una mejor resolución en la separación de los metabolitos secundarios.
- En los análisis de la actividad antibacteriana y antifúngica no se evidenció diferencias considerables, a excepción de los extractos acuosos quienes presentaron una modesta actividad frente a una bacteria distinta.
- Mediante la técnica de cromatografía en columna (CC) se llevó a cabo la separación de 2 polisacáridos para la especie susceptible del extracto acuoso (EPVVSA) y de un polisacárido para la especie resistente también del extracto acuoso (EPVVRA).
- Los polisacáridos aislados contienen como unidad monomérica principal a la glucosa.
- El único compuesto de la especie resistente del extracto acuoso fue obtenido en la muestra identificada como EPVVRA (c), también señaló la presencia de azúcares en la misma como se reflejó en las muestras analizadas para la especie susceptible. El número de carbonos también pareciera indicar un trisacárido.
- La caracterización completa de estos polisacáridos aislados requiere de otras técnicas espectrométricas con las cuales no se contó a la hora de exponer nuestros resultados.
- En los análisis comparativos realizados en el estudio fitoquímico de las dos especies de *Vitis vinifera* (resistente y susceptible), no se evidenció diferencias significativas en la composición de los metabolitos de dichas especies.

VII. Recomendaciones

- ✓ Continuar con futuros trabajos de investigación de *Vitis vinífera* para que sean dedicados a la caracterización completa de los metabolitos separados según el esquema logrado en este trabajo.
- ✓ Realizar estudios de tipo cuantitativo comparativo relacionados a este trabajo de investigación. La comparación de la composición de los extractos que se obtendrían de ambas especies, sería muy interesante.

VIII. Bibliografía

1. Zanabria, M. Enero (2009). Monografía 093. Ficha técnica Uva, *Vitis vinífera*. Publicación Virtual Red peruana de alimentación y nutrición. Lima, Perú.
2. Orhan, D; Orhan, N; Ozcelik, B; Ergun, F (2009). Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves. Turk J Biol 33 (341-348).
3. Orhan, D; Orhan, N; Ozcelik, B; Ergun, F. (2007) .Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. Journal of Ethno-pharmacology 112 (145–151).
4. Souza, M. Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares. www.thecompositaehut.com (9/12/2013).
5. Vargas, W. (2002). Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales. Centro Editorial. Primera Edición. Pág. 660.
6. Lúquez, C; Formento, J. (2002). Flor y fruto de la vid (*Vitis vinifera* L.). Micrografía aplicada a Viticultura y Enología. Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXIV. N° 1.
7. Casares, A. (2010). Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Proyecto final de carrera, Departamento en Química. Universidad Politécnica de Catalunya. Volumen IV.

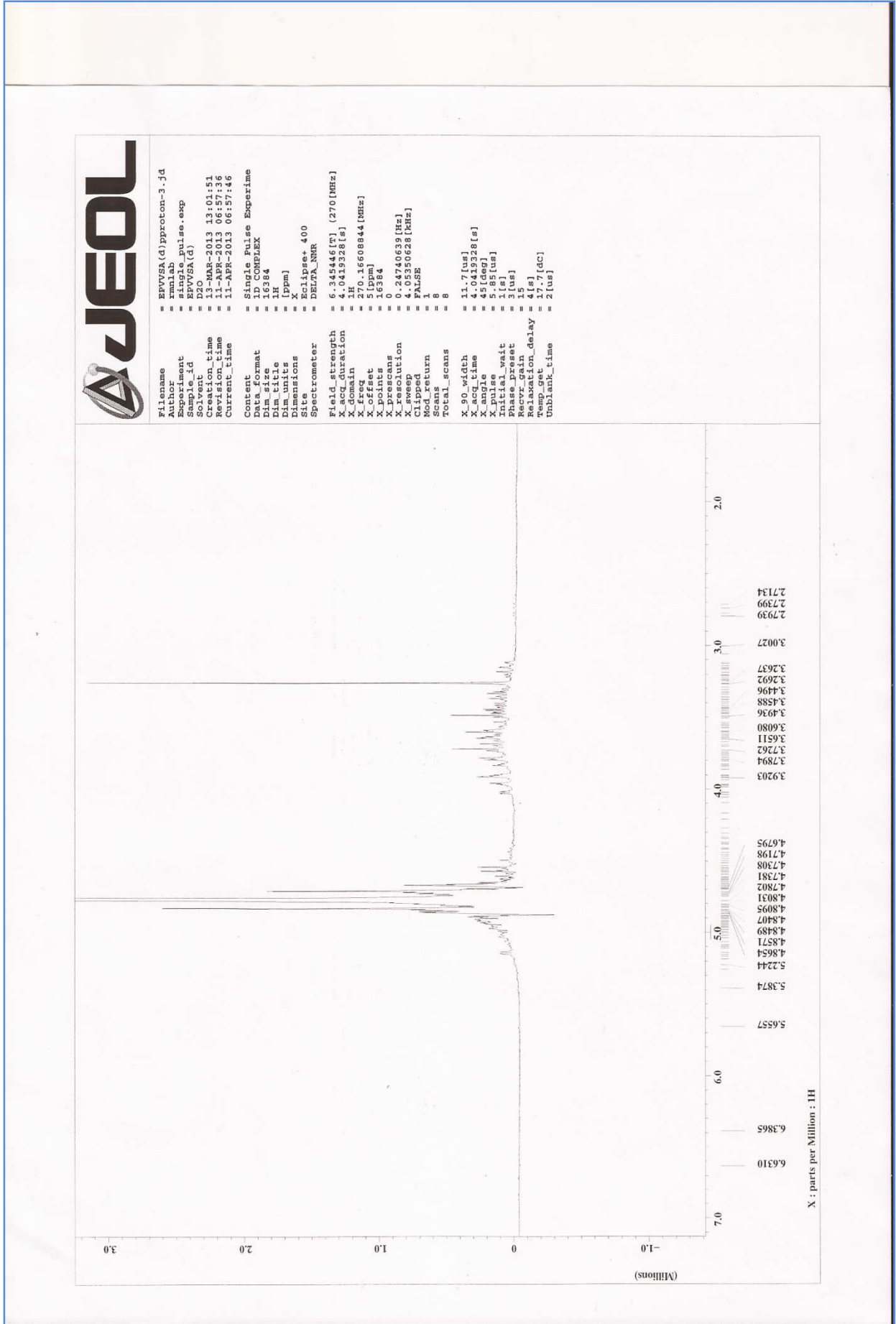
8. Vázquez, M. (2001). Avances en Seguridad Alimentaria. Editorial Altaga. pág. 209
9. Publicaciones: (2010) Enfermedades de Vitis vinifera. Centro tecnológico de la vid y el vino. Programa Territorial Integrado, Vinos de Chile.
10. Rodríguez, P (1996). Cuadernos de Divulgación. Plagas y Enfermedades de la vid en Canarias. Dirección General de Producción Agraria. Tercera edición.
11. Oriol Segarra (2007). Guía Cultura del Vino. Editorial Amat. Barcelona, España. Pág. 44- 45
12. I.M. Smith; J. Dunez; S.A. Archer (1998) .Manual de Enfermedades de las plantas. Ediciones Mundi-Prensa. Capitulo 10. Pág. (313-314).
13. Cruz, M. Control de Enfermedades. Fitopatología
<http://www.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR26033.pdf>
14. Martos, S (2008). El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología vegetal y animal. Universidad autónoma de Barcelona.
15. Ferro, S (2008). Caracterización y control de *Cylindrocarpon spp.* Agente causal del pie negro de la vid. Tesis Doctoral. Universidad politécnica de Valencia, España.

16. J. M. Carrero (2008). *Plagas del Campo*. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. Pág.: 385
17. Martínez, S; González J; Culebras, M; Tuñón M (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Revista Nutrición Hospitalaria*. XVII. Pág.: (271-278).
18. Santamaria, A; Antonacci, D; Caruso, G; Cavaliere, C; Gubiotti, R; Lagana, A; Valletta, A; Pasqua, G (2010). Stilbene production in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cvs Red Globe and Michele Palieri elicited by methyl jasmonate. *Natural Product Research*. Vol. 24, N° 15, 20 p. (1 488-1498).
19. Bombardelli, E; Morazzoni, I (1995). *Vitis vinífera* L. *Fitoterapia*, v.6 LXVL, p.291-317.
20. Santos, S; Felicio, J; González E (2001). Chemical constituents from *Vitis vinífera* (Familia Vitaceae). Laboratorio de Química y Farmacología de Productos Naturales. Sao Paulo- Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.68, n.1, p. (47-50).
21. Mulinaccia, N; Santamaria, A; Giaccherinia, C; Innocentia, M; Vallettab, A (2008). Anthocyanins and flavan-3-ols from grapes and wines of *Vitis vinifera*. *Natural Product Research*, vol. 22 N°12. P. (1033-1039).
22. Karaman, S; Kocabas, Y.Z. (2001). Traditional Medicinal Plants of K. Maras (Turkey). *The Scientist* 1, 125-128.
23. Hebash, K.A.H., Fadel, H.M., Soliman, M.M.A., (1991). Volatile components of grape leaves. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 4, 26–28.

24. Kapoor, L. (Ed.), (1990). Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC Press, Boca Raton, USA.
25. Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, v.66, p.663–673.
26. Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., & Horn, T.F.W. (2003). Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*, 9, 64–76.
27. Signorelli, P., & Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: Molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 449–466.
28. Monagas, M., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., Laureano, O., & Da Silva, M.R. (2003). Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6475–6481.
29. Alonso, S; Santiago, J; Alonso, V; Martínez M. Diciembre (2007). Informe Técnico. Desarrollo Intercelular de Plasmopara vitícola en genotipos de vid susceptible y resistente. Misión Biológica de Galicia (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).
30. Alonso, S; Martínez M; Alonso, V (2008). Susceptibilidad a "Plasmopara vitícola" en diferentes variedades de vid ("*Vitis vinífera*" L.). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. Vol. t. 34(3) p. 387-397.
31. Langkace, P. & Pryce, R.P. (1977). α - Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*, V.16, p.1452-1454.

32. Tabacchi, R. (1994) Secondary phytotoxic metabolites from pathogenic fungi: Structure, synthesis and activity. *Pure and Applied Chemistry*. v. 66(10-11) p. 2299-2302.
33. Alonso, V; Voinesco, F; Viret, O; Gindro, K. (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: Ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol 49. p. 265-274.
34. Ilieva, D; Todorova, I; Valentinova, D; Ivanov, A; Simeonov, S. (2008). Preliminary study on biomarkers for the fungal resistance in *Vitis vinifera* leaves. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 165 p. 791-795.
35. Steimetz, E; Trouvelot, S; Gindro, K; Bordier, A; Adrian, M; Daire, X. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79 p. 89-96.
36. Janssen, A.M; Scheffer, J.J.C; Baerheim Svendsen, A. (1987). Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Review. *Aspects of Tests Methods*. *Planta Médica* 53: 395-398.
37. Prozil, S; Costa, E; Evtuguin, D; Cruz, L; Domingues, R. (2012). Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L. *Carbohydrate Research* Vol. 356 p. 252-259.
38. Ik Hwi,K; Hitotsuyanagi,Y; Takeya,K. (2004). Quassinoid glucosides from seeds of *Brucea amarissima*. *Phytochemistry* Vol. 65 p. 3167-3173.
39. Paula Bruice (2008). *Química Orgánica*. Quinta Edición. Editorial Pearson Educacion. México. Pág. 1003

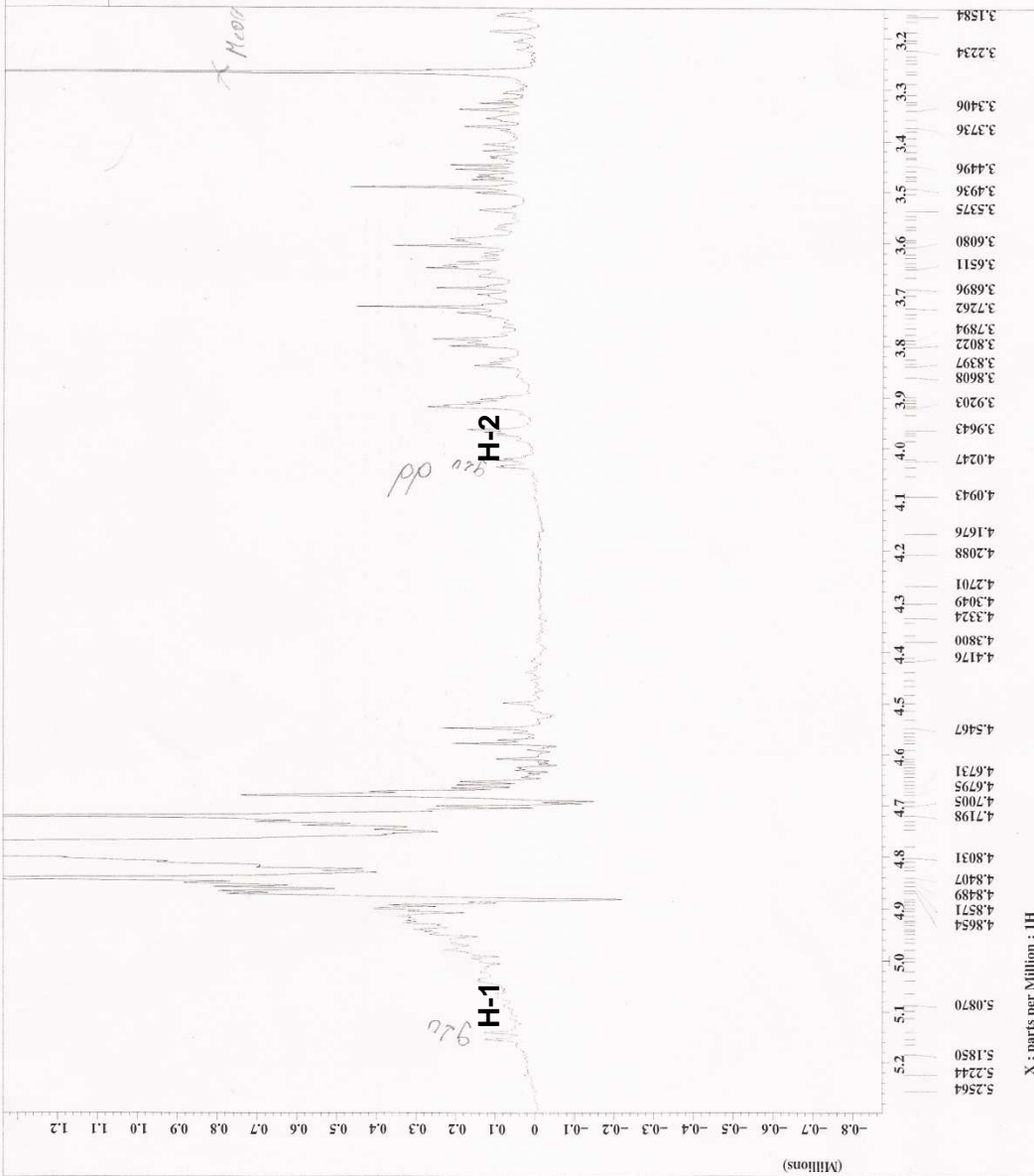
ANEXOS



Espectro 1. Espectro de RMN de protones para la muestra EPVSA (d)



File name = EPVWSA(d)pproton-4.jd
Author = rmlab
Experiment = single_pulse.exp
Sample_id = EPVWSA(d)
Date_ime = 13-MAR-2013 13:01:51
Creation_time = 11-APR-2013 06:58:44
Revision_time = 11-APR-2013 06:58:46
Current_time = 11-APR-2013 06:58:46
Content = Single Pulse Experime
Data_format = 1: COMPLEX
Data_size = 13284
Dim_title = 1H
Dim_units = [ppm]
Dimensions = X
Site = Eclipse+ 400
Spectrometer = DELTA_NMR
Field_strength = 6.345446[T] (270 [MHz])
X_acq_duration = 4.0419328[s]
X_domain = 1H
X_freq = 270.16608844 [MHz]
X_offset = 0.6384
X_prescans = 0
X_resolution = 0.24740639 [Hz]
X_sweep = 4.05350628 [kHz]
Clipped = FALSE
Soc_return = 1
Soc_scan = 1
Total_scans = 8
X_90_width = 11.7 [us]
X_acq_time = 4.0419328 [s]
X_angle = 45 [deg]
X_cp = 1 [us]
X_delay = 1 [us]
Initial_wait = 1 [us]
Phase_preset = 3 [us]
Recvr_gain = 15
Relaxation_delay = 4 [s]
Temp_get = 17.7 [dc]
Unblank_time = 2 [us]



Espectro 2. Ampliación del Espectro de RMN de protones para la muestra EPVWSA (d)

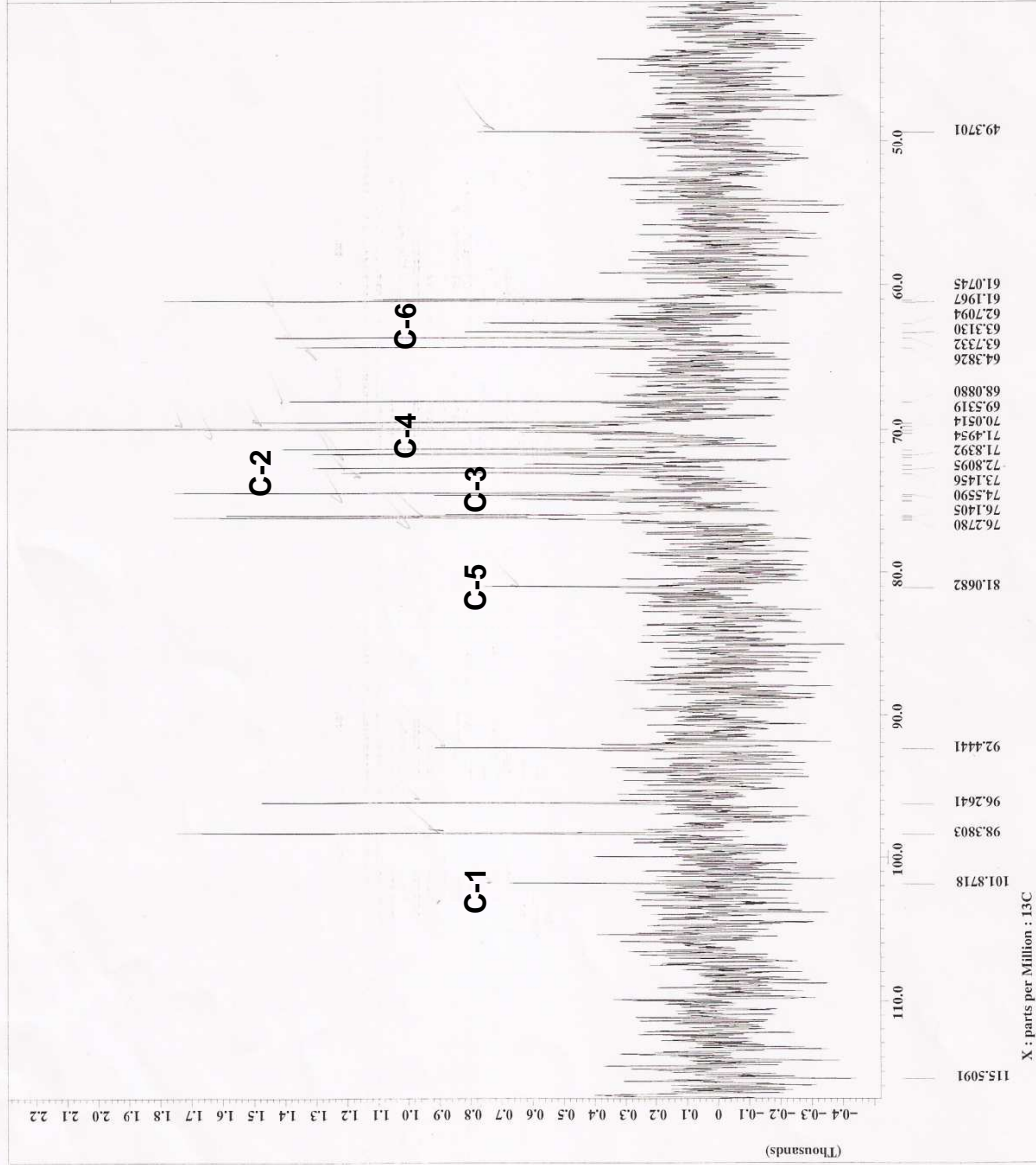


```

File Name      = EPVSA(d)carbono-2.jd
Author        = emalab
Experiment    = single_pulse_dec
Sample ID     = EPVSA(d)
Solvent      = D2O
Creation Time = 12-FEB-2013 20:03:16
Revision Time = 13-MAR-2013 14:12:56
Current Time  = 13-MAR-2013 14:12:56

Content       = Single Pulse with Bro
Data Format   = ID COMPLEX
Dim Size     = 32768
F1 F2       = 13C
Dim Units    = ppm
Dimensions   = X
Site         = Eclipse+ 400
Spectrometer = DELTA_NMR

Field strength = 6.345445[T] (270[MHz])
X acq duration = 1.9267584[s]
X domain      = 13C
X freq        = 67.93330993[MHz]
X offset      = 100[ppm]
X points      = 32768
X resolution  = 0.51900643[Hz]
X sweep       = 1H
Xr_domain    = 17.00680272[kHz]
Xr_freq      = 270.16608844[MHz]
Xr_offset     = 51[ppm]
Xr_resolution = 1.1[Hz]
Mod return   = 1
Scans        = 2000
Total_scans  = 2000
X 90_width   = 7.8[us]
X acq time   = 1.9267584[s]
X angle      = 30[deg]
X pulse      = 2.6[us]
Initial wait = 1[s]
Phase preset = 3[us]
Relaxation delay = 1[s]
Temp_get     = 27.4[dc]
Unblank time = 2[us]
  
```

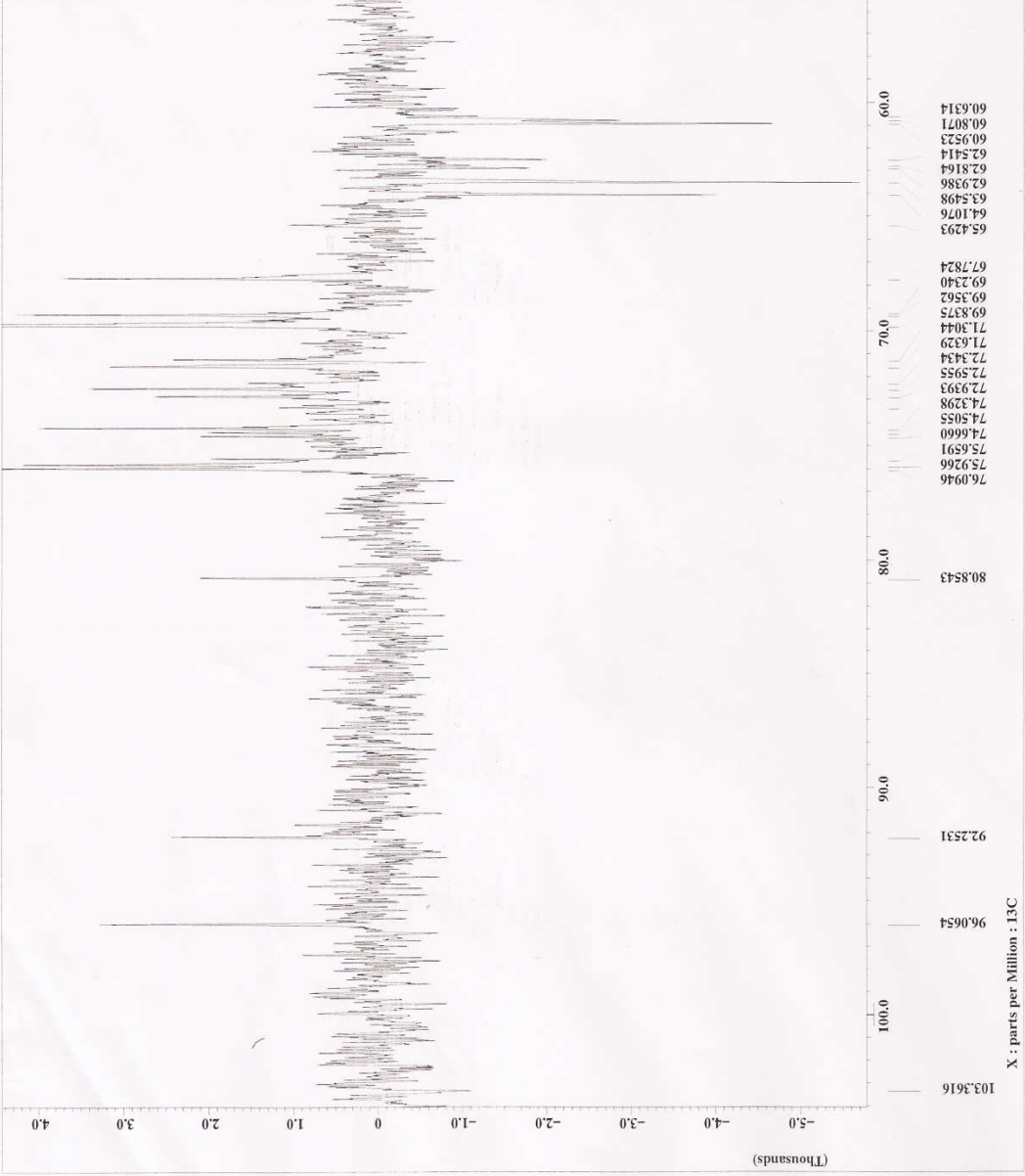


Espectro 3. Espectro de RMN de carbono 13 para la muestra EPVSA (d)



```

= EPVVA(d)dept-2.jdf
= main4b
= 4
= 4
= EPVVA(d)
= EPVVA(d)
= D2O
= 12-FEB-2013 18:25:11
= 13-MAR-2013 14:12:09
= 13-MAR-2013 14:13:10
= DEPT with decoupling
= 1D COMPLEX
= 32768
= 13C
= ppm
= Eclips+ 400
= DELTA_NMR
= 6.345446[T] (270 [MHz]
= 1.5267584[s]
= 67.93330993 [MHz]
= 100 [ppm]
= 32768
= 4
= 0.51900643 [Hz]
= 1.0080272 [kHz]
= 1.0080272 [kHz]
= 270.16608844 [MHz]
= 5 [ppm]
= FALSE
= 100
= 500
= 1.9267584[s]
= 7.8 [us]
= 55 [us]
= 140 [Hz]
= 3 [us]
= 15
= 2 [s]
= 135 [deg]
= 21.9 [us]
= 2.9 [us]
= 2 [us]
  
```



Espectro 4. Espectro de RMN de carbono 13 (dept) para la muestra EPVVA (d)



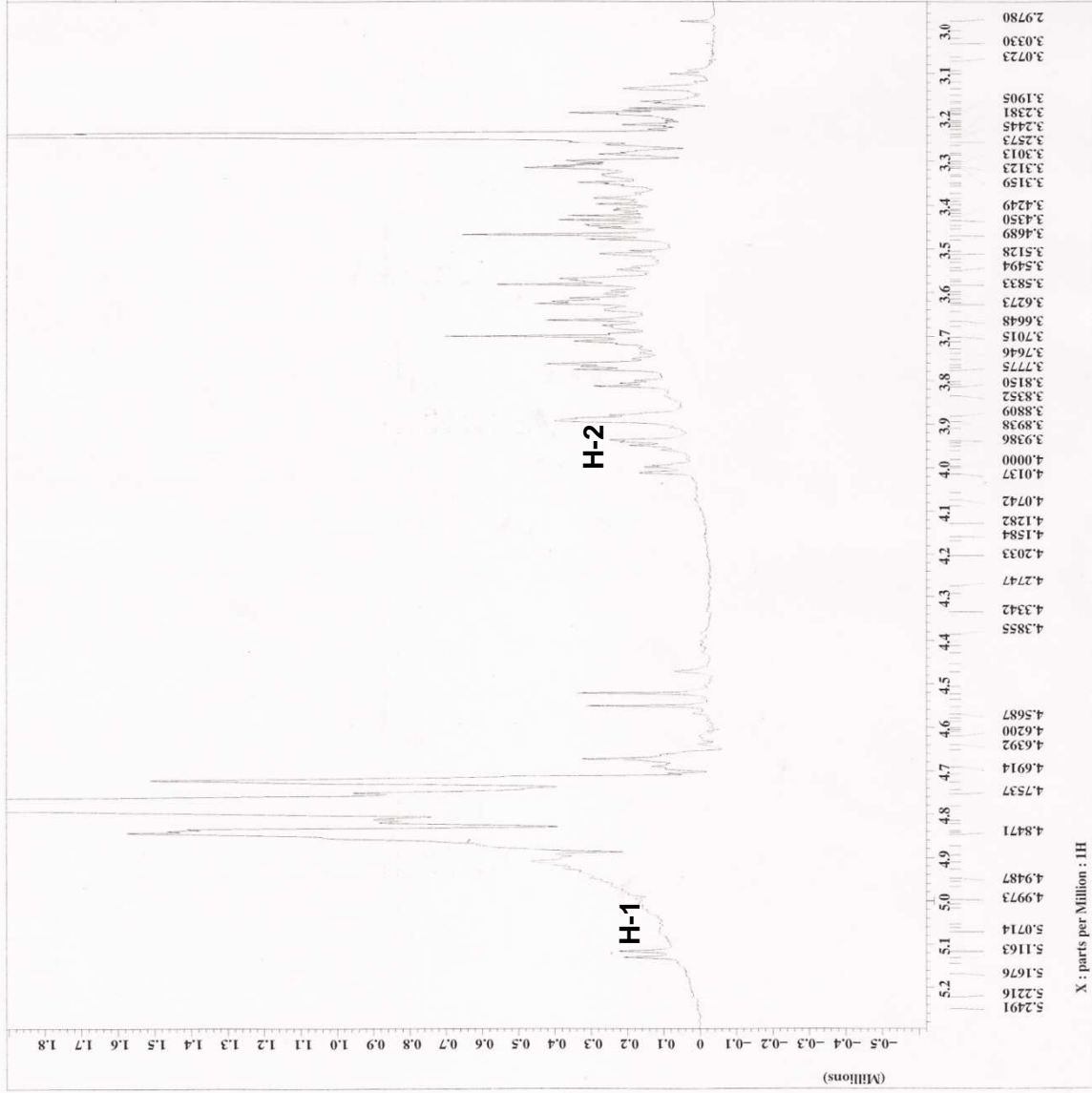
```

Filename = EPVVA(c)pproton-2.jd
Author = rmlab
Experiment = single_pulse_exp
Sample_id = EPVVA(c)
Solvent = D2O
Creation_time = 13-MAR-2013 13:06:42
Revision_time = 11-APR-2013 07:02:51
Current_time = 11-APR-2013 07:03:13

Content = Single Pulse Experime
Data_format = ID COMPLEX
Dim_size = 16384
Dim_title = 1H
Dim_units = [ppm]
Dimensions =
Siz = Colipse+ 400
Spectrum = DELTA_NMR

Field_strength = 6.345446[T] (270 [MHz])
X_acq_duration = 4.0419328[s]
X_domain = 1H
X_freq = 270.16608844 [MHz]
X_offset = 16384
X_points = 0
X_prescans = 0
X_resolution = 2474.0639 [Hz]
X_resolution_h = 4.05350628 [kHz]
Clipped = FALSE
Mod_return = 1
Scans = 8
Total_scans = 8

X_90_width = 11.7 [us]
X_acq_time = 4.0419328 [s]
X_angle = 45 [deg]
X_pulse = 5.85 [us]
initial_wait = 3 [s]
Pulse_wait = 15 [us]
Recovery_gain = 15
Relaxation_delay = 4 [s]
Temp_get = 17.5 [dC]
Unblank_time = 2 [us]
    
```

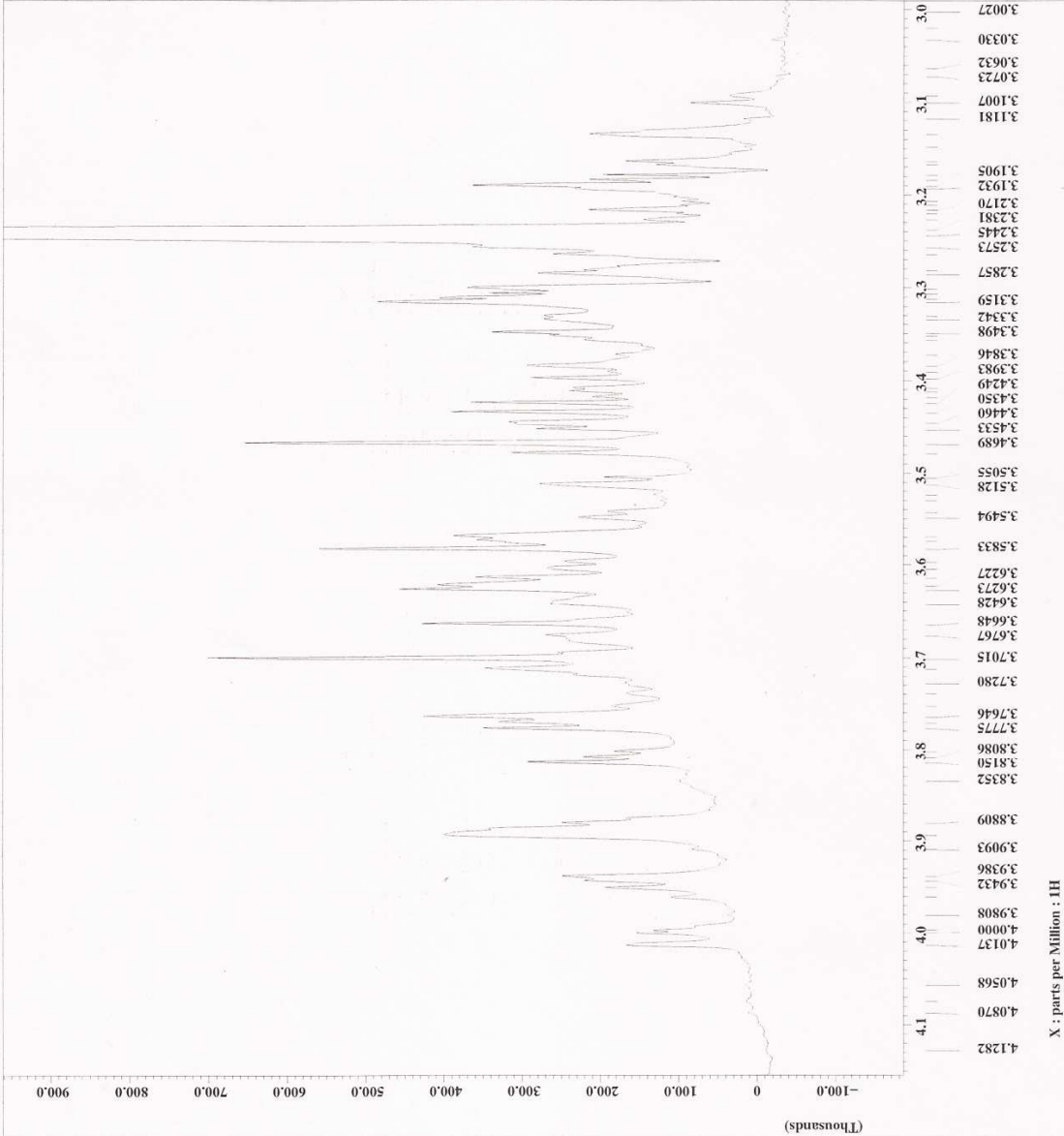


X : parts per Million : 1H

Espectro 5. Espectro de RMN de protones para la muestra EPVVA (c)



EPVWSA (c) pproton-2.jd
= xmlab
= single_pulse.exp
= EPVWSA (c)
= D2O
= 13-MAR-2013 13:06:42
= 11-APR-2013 07:02:51
= 11-APR-2013 07:03:23
= Single Pulse Experiment
= ID COMPLEX
= 16384
= IH
= [ppm]
= X
= Eclipse+ 400
= DELTA_RMR
= 6.345446[T] (270[MHz])
= 4.0419328[s]
= IH
= 5[ppm]
= 16384
= 0.24740639 [Hz]
= 4.05350628 [kHz]
= FALSE
= 1
= 8
= 11.7[us]
= 4.0419328[s]
= 45[deg]
= 5.85[us]
= 1[s]
= 3[us]
= 15
= 4[s] [dc]
= 2[us]



Espectro 6. Ampliación del Espectro de RMN de protones para la muestra EPVWSA (c)

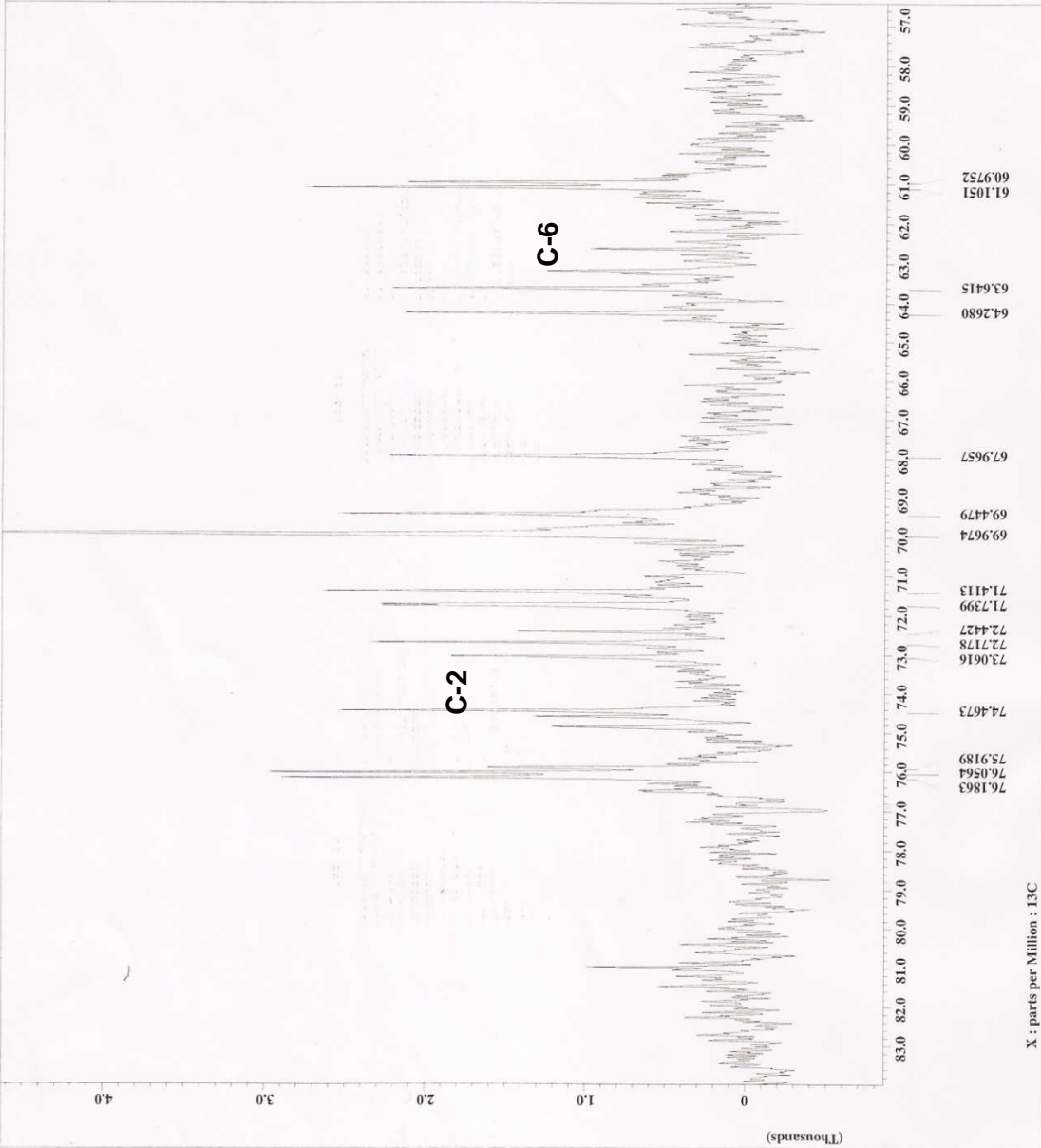


Filename = EPVVA(c)carbono-2.jd
Author = rmlab
Experiment = single_pulse_dec
Sample_id = EPVVA(d)
Solvent = D2O
Creation_time = 12-FEB-2013 23:51:55
Acq_start_time = 12-FEB-2013 17:46:52
Current_time = 13-MAR-2013 17:46:55

Content = Single Pulse with Bro
Data_format = 1D COMPLEX
Dim_size = 32768
Dim_title = 13C
Dim_units = [ppm]
Dimensions = X
Site = Eclipse+ 400
Spectrometer = DELTA_NMR

Field_strength = 6.345446[T] (270[MHz])
X_acq_duration = 1.9267584[s]
X_domain = 13C
X_freq = 67.9330993[MHz]
X_offset = 500[ppm]
X_p1 = 32768
X_prescans = 4
X_resolution = 0.51900643[Hz]
X_sweep = 17.00680272[MHz]
Irr_domain = 1H
Irr_freq = 270.16608844[MHz]
Irr_offset = 5[ppm]
Mipped = FALSE
No_return = FALSE
Scans = 1432
Total_scans = 1432

X_90_width = 7.8[us]
X_acq_time = 1.9267584[s]
X_angle = 30[deg]
X_pulse = 2.6[us]
X_wait = 1.0[us]
Phase_preset = 3[us]
Recvr_gain = 15
Relaxation_delay = 1[s]
Temp_get = 27.5[dc]
Unblank_time = 2[us]



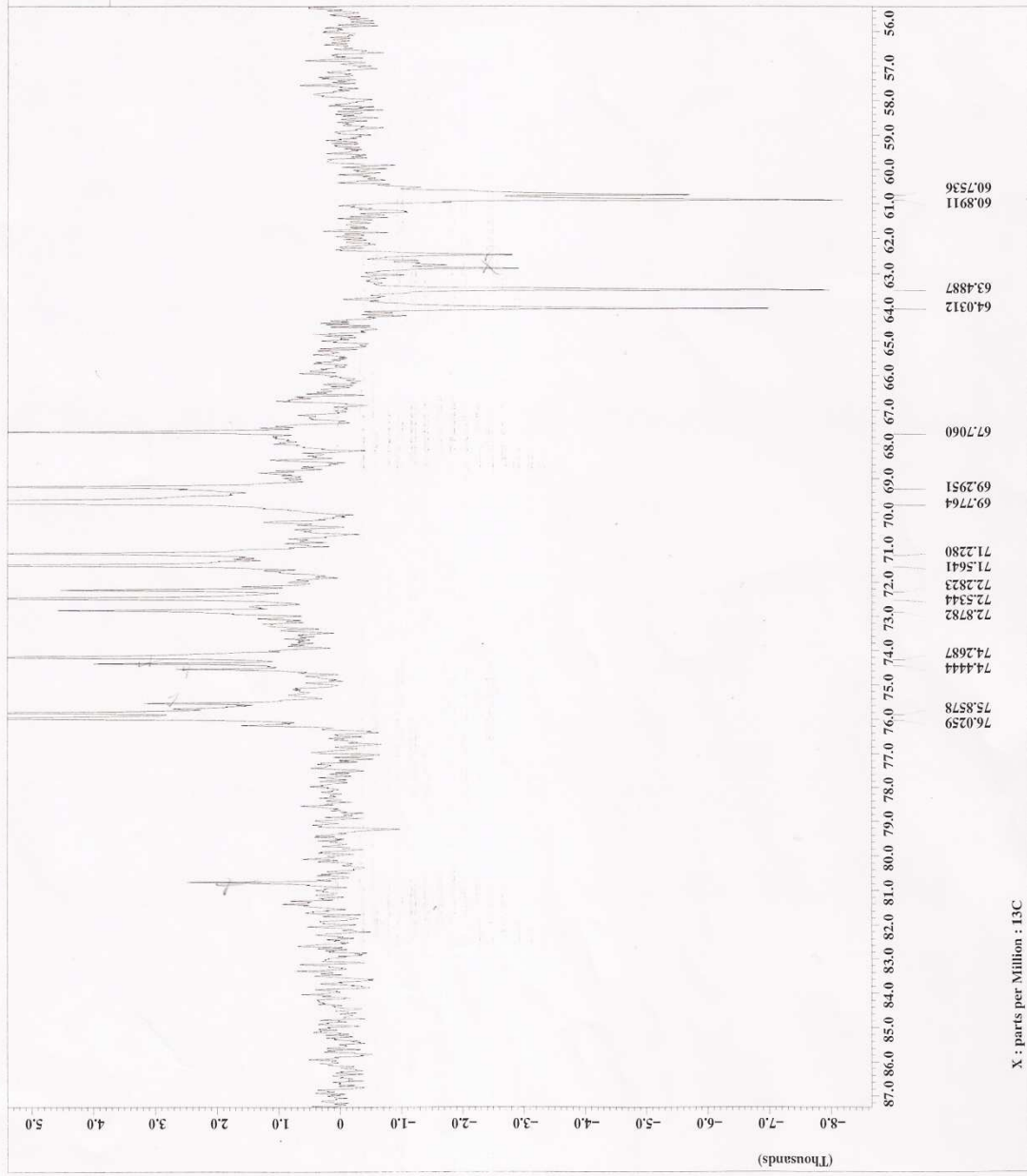
Espectro 7. Espectro de RMN de carbono 13 para la muestra EPVVA (c)



```

= EPVWSA (c)dept-2.jdf
= rmlab
= Dept_dec.exp
= EPVWSA (c)
= D2O
= 13-FEB-2013 20:56:13
= 13-MAR-2013 16:35:03
= 13-MAR-2013 16:35:21
= DEPT with decoupling
= COMPLEX
= 32768
= 13C
= [ppm]
= X
= Eclipse+ 400
= DELTA_NMR
= Spectrometer
= Field strength = 6.345446[T] (270 [MHz])
= X_acq_duration = 1.9267584[s]
= X_domain = 13C
= X_offset = 100[ppm]
= X_points = 32768
= X_presat = 0.51900643[Hz]
= X_resolution = 17.006880272 [Hz]
= X_sweep = 1H
= Irr_domain = 270.16608844 [MHz]
= Irr_freq = 5[ppm]
= Clipped = FALSE
= Scan_return = 500
= Total_scans = 500
= X_acq_time = 1.9267584[s]
= X_pulse = 7.8[us]
= Irr_pulse = 55[us]
= Irr_delay = 14[us]
= X_offset = 140 [Hz]
= Phase_preset = 3[us]
= Recvr_gain = 15
= Relaxation_delay = 2[s]
= Selection_angle = 135[deg]
= Selection_pulse = 82.5[us]
= Temp_per = 24.3 [dC]
= Unblank_time = 2[us]

```

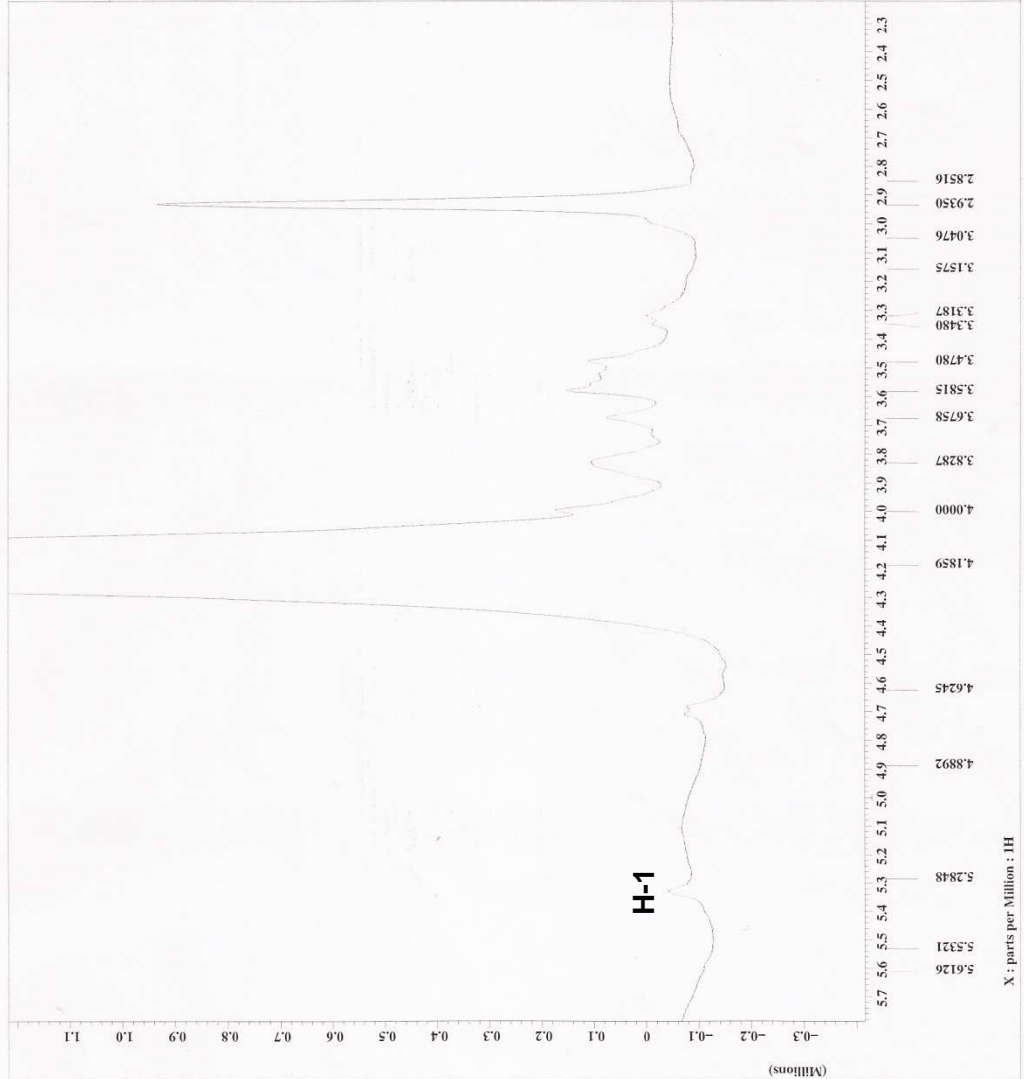


Espectro 8. Espectro de RMN de carbono 13 (dept) para la muestra EPVWSA (c)



```

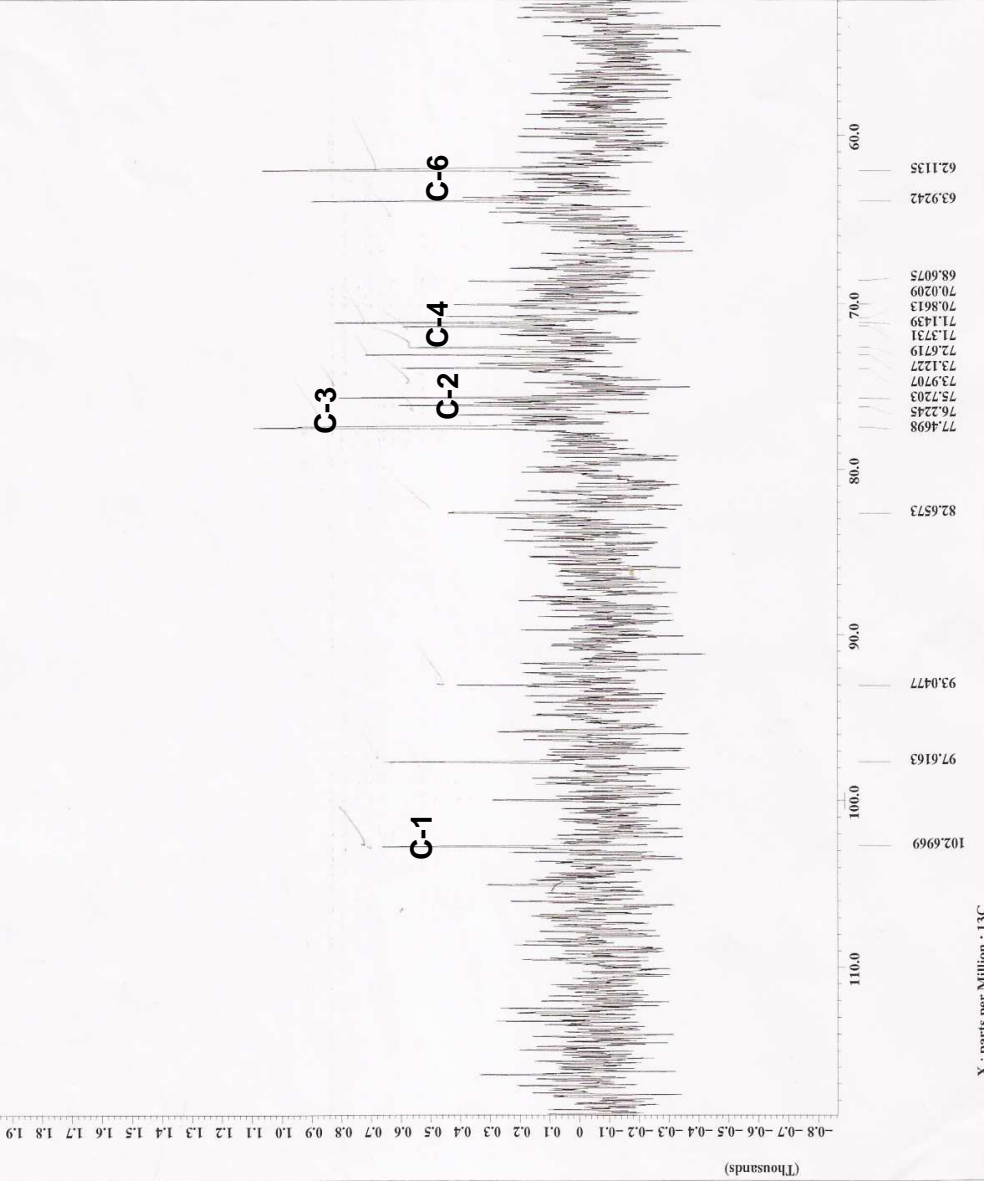
= EPVvf (c) proton-2.jd
= rmlab
= single_pulse.exp
= EPVvf (c)
= DMSO-d6
= 10-MAY-2013 17:48:18
= 10-MAY-2013 09:27:19
= 10-MAY-2013 09:27:59
= Single Pulse Exptime
= 2.00000000
= 16384
= 1H
= X
= DELTA_MNR
= 400
= 6.345446[T] (270[MHz])
= 4.0419328[s]
= 770.16608844[MHz]
= 51ppm
= 16384
= 0
= 0.26716639[Hz]
= 2530923[MHz]
= TRUE
= 1
= 8
= 11.7[us]
= 4.0419328[s]
= 45[deg]
= 5.85[us]
= 3[us]
= 15
= 4[s]
= 17.1[dc]
= 2[us]
    
```



Espectro 9. Espectro de RMN de protones para la muestra EPVRA (c)



== EPVVRf (c) carbono-3.j
Author == rmalab
Experiment == single_pulse_dec
Sample == C-13
Solvent == DMSO-D6
Creation_time == 21-FEB-2013 20:36:27
Revision_time == 22-MAR-2013 14:32:03
Current_time == 22-MAR-2013 14:32:09
Content == Single Pulse with Bro
Data_format == 1D COMPLEX
Dim_size == 32768
Dim_title == 13C
Dim_units == [ppm]
Dimensions ==
Site == Eclipse+ 400
Spectrometer == DELTA_NMR
Field_strength == 6.345446 [T] (270 [MHz])
Relaxation == 13C
X_domain == 13C
X_freq == 67.93330993 [MHz]
X_offset == 100 [ppm]
X_points == 32768
X_prescan == 0
X_resolution == 0.51900643 [Hz]
X_sweep == 17.00680272 [kHz]
Irr_domain == 1H
Irr_freq == 270.16608844 [MHz]
C1r_offset == 5 [ppm]
C1r_resolution == 1
Mod_return == 1
Scans == 2748
Total_scans == 2748
X_90_width == 7.8 [us]
X_acq_time == 1.9267584 [s]
X_angle == 30 [deg]
X_pulse == 2.6 [us]
Initial_wait == 1 [s]
Purge_preset == 25
Relaxation_delay == 1 [s]
Temp_get == 26.3 [dC]
Unblank_time == 2 [us]

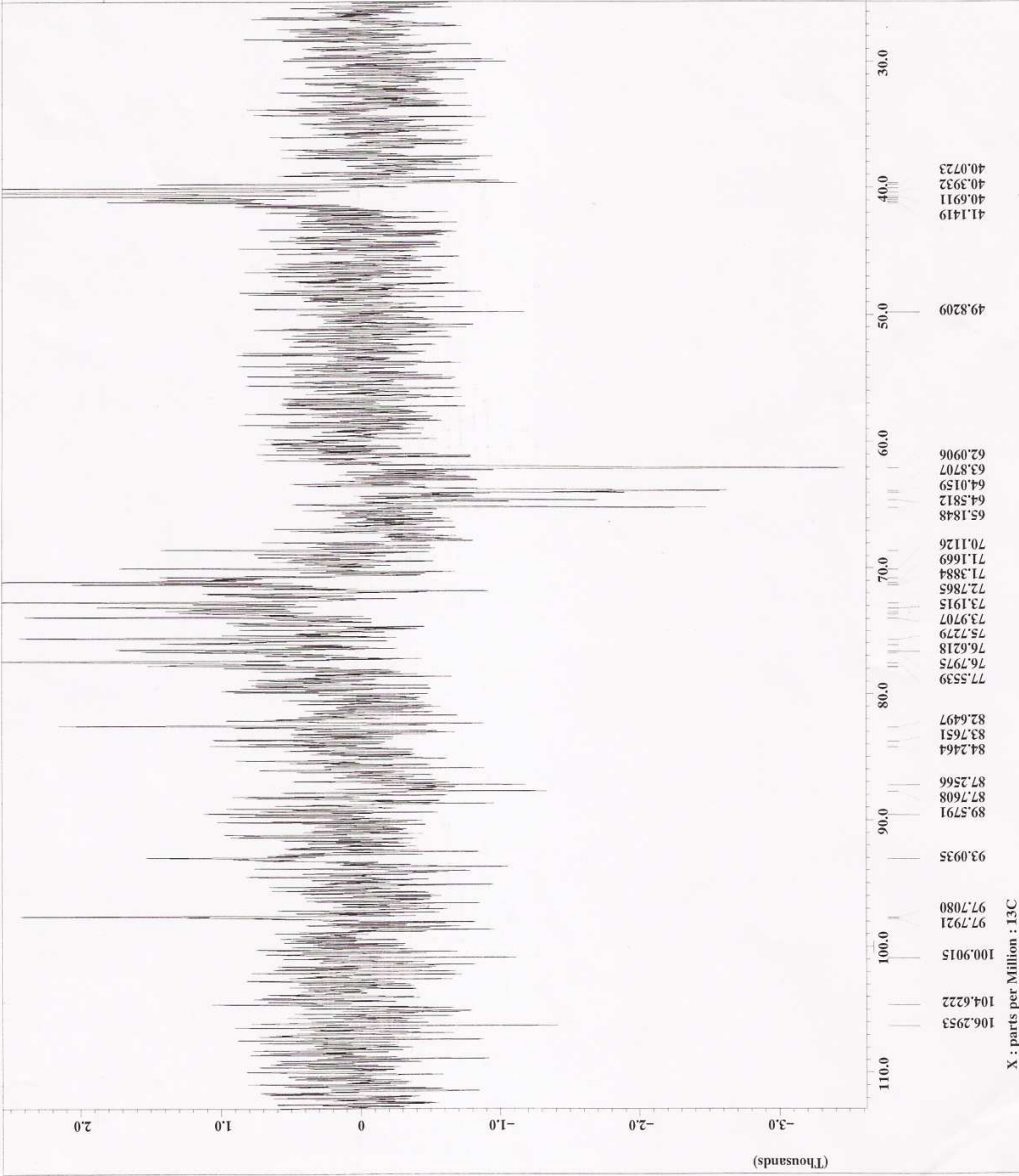


X : parts per Million : 13C

Espectro 10. Espectro de carbono 13 para la muestra EPVRA (c)



File: EVVRF (c) dept-2.jdf
Author: zmlab
Sample: 13C.exp
Sample_id: EVVRF (c)
Solvent: DMSO-D6
Creation_time: 21-FEB-2013 18:21:53
Revision_time: 22-MAR-2013 13:42:44
Current_time: 22-MAR-2013 13:42:57
Content: DEPT with decoupling
Data_format: 1D COMPLEX
Dim_size: 32768
Dim_title: 13C
Dim_units: X
Dimensions: X
Site: Eclipse+ 400
Spectrometer: DELTA_NMR
Field_strength: 6.345446 [T] (270 [MHz])
X_domain: 13C 270.584 [s]
X_freq: 67.83330993 [MHz]
X_offset: 100 [ppm]
X_points: 32768
X_resolution: 0.51900643 [Hz]
X_sweep: 17.00680272 [kHz]
Irr_domain: 1H
Irr_freq: 270.16608844 [MHz]
Irr_offset: 100 [ppm]
Mod: AHS
Mod_return: 1
Scans: 500
Total_scans: 500
X_acq_time: 1.9267584 [s]
X_pulse: 7.8 [us]
Irr_pulse: 55 [us]
Initial_wait: 1 [s]
J_constant: 140 [Hz]
Phase_Preset: 1 [us]
Relaxation_delay: 2 [s]
Selection_angle: 135 [deg]
Selection_pulse: 82.5 [us]
Temp_set: 20.9 [deg]
Onblank_time: 2 [us]



X : parts per Million : 13C

Espectro 11. Espectro de carbono 13 (dept) para la muestra EPVRA (c)