



## Nueva fuente de quinoles, la superficie foliar de *Pentacalia ledifolia* y *Pentacalia corymbosa* y sus propiedades antifúngicas

Julio A. Pedrozo, Rubén D. Torrenegra\*, Alba N. Téllez, Alvaro Granados

Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 43-82, Edificio Carlos Ortiz (52), Oficina 201, Bogotá, Colombia

**RESUMO:** “Nova fonte de quinóides, a superfície foliar de *Pentacalia lediflora* e *Pentacalia corymbosa* e suas propriedades antifúngicas”. Foi demonstrada a ação antifúngica do extrato clorofórmico e de duas substâncias isoladas da superfície foliar de *Pentacalia ledifolia* (H.B.K.) Cuatr. e *P. corymbosa* (Benth) Cuatr. frente aos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, cultivados em BDA (batata-dextrose-ágar). Destes extratos foram isolados, além de cumarinas já identificadas em estudos anteriores, dois derivados quinóides: (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexadienil) acetato de metila ou jacaranona e (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexadienil) acetato de etila ou metiljacaranona. Para o (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexadienil) acetato de etila foi calculado  $CI_{50}$  de 650  $\mu\text{g/mL}$  para os dois tipos de fungos e o (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexadienil) acetato de metila teve um  $CI_{50}$  de 660  $\mu\text{g/mL}$ .

**Unitermos:** *Pentacalia ledifolia*, *Pentacalia corymbosa*, Asteraceae, Senecioneae, atividade antifúngica, quinóides.

**ABSTRACT:** “New source of quinols, the surface of *Pentacalia ledifolia* and *Pentacalia corymbosa* leaves and its antifungal activity”. Quinols identified in the surface waxes of *Pentacalia ledifolia* (H.B.K.) Cuatr and *P. corymbosa* (Benth) Cuatr. leaves, possess antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*, cultured on PDA (potato-dextrose-agar) medium. These extracts were prepared by dipping fresh leaves in chloroform for 5 min, and afforded ethyl-(1-hydroxy-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-yl) acetate and methyl-(1-hydroxy-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-yl) acetate, the major surface compounds.

**Keywords:** *Pentacalia ledifolia*, *Pentacalia corymbosa*, Asteraceae, Senecioneae, antifungal activity, quinols.

### INTRODUCCION

*Pentacalia ledifolia* (H.B.K.) Cuatr y *Pentacalia corymbosa* (Benth.) Cuatr. (Asteraceae-Senecioneae), son arbustos autóctonos de los páramos andinos colombianos (altitudes entre 2900-3100 m.s.n.m.), principalmente, de los que circundan a la ciudad de Bogotá; se les utiliza en la medicina tradicional como vulnerarias, antisifilíticas, para curar granos y forúnculos rebeldes, contra úlceras y como remedio muy eficaz para curar la faringitis (García-Barriga, 1975; Pérez-Arbeláez, 1956; Díaz; Cuatrecasas, 1999).

El género *Pentacalia* ha sido poco estudiado y sólo se reportan en la literatura los estudios en *P. ephiphytica*, *P. andicola*, *P. firmipes* y *P. archieri*, de las cuales se aislaron nerolidol, humuleno, farneseno, curcumeno, santaleno, gergmacreno D, varios cadinenos, cicloartenol, friedelina y 5-metoxieugenol (Bohlmann; Ziesche, 1979; Bohlmann et al., 1984). En estudios anteriores, de *P. corymbosa* obtuvimos sitosterol, eicosanol, friedelina, dos cumarinas (escopoletina y 7-geraniloxilescopletina) y dos flavonoides

(quercetina y rutina) (Torrenegra et al., 2000).

Derivados quinólicos han sido obtenidos de diversas familias vegetales: Caricaceae (Schwab; Schrier, 1988), Salicaceae (Julkunen-Tiitto, 1986), Oleaceae (Seya et al., 1989; Kuwajima et al., 1993), Scrophulariaceae (Nicoletti et al., 1988; Abdullahi et al., 1986), Bignoniaceae (Hase et al., 1995), Martyniaceae (Sasaki, 1978), entre otras. El (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de metilo llamado también jaracanona fue aislado de *Jacaranda caucana* (Ogura et al., 1976) y de *Senecio cannabifolius* (Lajide et al., 1996); en esta última especie también se identificó el (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de etilo o metiljacaranona reportándoseles una acción inhibitoria del crecimiento de la larva de *Spodoptera litura*, un díptero que ataca plantas de tabaco.

Recientemente nuestro grupo aisló triterpenos de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y sesquiterpenlactonas de *Espeletia killipii* (Asteraceae) con actividad citotóxica (Robles et al., 2005; Alfonso et al., 2006; Jaimes et al., 2006). En este trabajo fueron

\* E-mail: rtorrene@javeriana.edu.co, Tel./Fax 3208320 ext. 4034 y 4038

aislados quinoles de dos especies de *Pentacalia* con actividad antimicrobiana.

## MATERIAL Y METODOS

Las plantas *Pentacalia corymbosa* y *P. ledifolia* fueron recolectadas en los páramos de "Guasca" y "Cruz Verde", al Norte y al Sureste de la ciudad de Bogotá, respectivamente, a altitudes entre los 2.900-3.100 m.s.n.m.; especímenes de estas plantas fueron radicados en el Herbario Nacional de Colombia bajo los números COL407570 y COL404447.

Unos 200 g de hojas frescas de ambas plantas fueron lavadas por inmersión en  $\text{CHCl}_3$  (5 mL/g material vegetal), durante cinco minutos; los extractos resultantes fueron concentrados a mínimo volumen en un evaporador rotatorio; el concentrado resultante fue tratado con  $\text{Me}_2\text{CO}$  y dejado en reposo a 4 °C durante 12 horas. El flóculo producido (constituido casi exclusivamente por ceras y grasas) fue removido por filtración al vacío y el filtrado resultante, se concentró a presión reducida en el evaporador rotatorio y se secó al ambiente. Los porcentajes de rendimiento (g de extracto/100 g de material fresco) fueron de 0,9 para *Pentacalia corymbosa* y de 0,8 para *P. ledifolia*. Estos extractos fueron ensayados ante las dos cepas fúngicas.

Tres gramos (3 g) de dicho extracto se percolaron a través de columna de sílica gel (Kieselgel, Merck 0,2-0,060 mm) la cual se eluyó con bencina de petróleo y mezclas de bencina de petróleo-acetato de etilo de polaridad creciente. Las fracciones recolectadas fueron monitoreadas con cromatografías en capa delgada (CCD) y, las sustancias aisladas fueron purificadas por cromatografías en capa delgada preparativas (CCDP).

Los espectros de RMN fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker AMX400 a 400 MHz para los de  $^1\text{H}$  y a 100 MHz para los de  $^{13}\text{C}$ , con TMS como estándar interno; los espectros IR fueron tomados como pastillas de KBr, en un instrumento Shimadzu, modelo 8300 Series FTIR y, los espectros de masas por impacto electrónico (EIMS) fueron obtenidos en un espectrómetro AEIMS 902 de doble haz, usando una sonda directa operando a 70eV (97 kJ/mol) y 110-160°.

*1-Hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil acetato de metilo o jacaranona (P-1)*. Cristalizó en forma de agujas incoloras con  $\text{Pf} = 72$  °C, a partir de  $\text{CHCl}_3$ . Rf 0,4 en placas de sílica corridas con  $\text{CHCl}_3$ -MeCO 9:1; absorbió la fluorescencia de las placas de sílica a la luz UV de onda corta y, reveló amarillo ocre con vainillina/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ . IR, en pastilla de KBr:  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$  (intensidad, clase de hidrógeno) 3.265 (I, OH); 2.956 (I, CH); 1.735 (M, CO de ésteres); 1.666 (M, cetona  $\alpha,\beta$ -insaturadas cíclicas de seis miembros); 1.612 (M, C=C); 1.247 (D, CO para ésteres), 1.072 (M, C-O de alcohol). RMN $^1\text{H}$  (400 MHz, en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  en ppm (señal, número de hidrógenos, clase): 6,17 (dd, 2H,  $-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-\text{COH}-$ )  $J=10,2$  Hz y  $J=6,5$  Hz; 6,94 (dd, 2H,  $-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-\text{CO}-$ )  $J=10,2$  Hz y  $J=6,5$

Hz; 2,69 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ) y 3,74 (s, 3H,  $-\text{CO}-\text{OCH}_3$ ). RMN $^{13}\text{C}$  (J-mod, en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  en ppm (clase de carbono) 52,44 ( $-\text{CO}-\text{OCH}_3$ ); 43,61 ( $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 67,49 ( $>\text{C}-\text{OH}$ ); 128,40 ( $-\text{CO}-\text{CH}=\text{}$ ); 149,2 ( $=\text{CH}-\text{COH}$ ); 171,23 ( $-\text{COO}-$ ) y 185,17 ( $-\text{CO}-\text{CH}=\text{}$ ). EIMS: m/z (intensidad en %) 182  $\text{M}^+$  (8), 169 (5), 150 (18), 122 (17), 109 (100), 94 (7), 81 (39), 74 (64), 69 (15), 43 (38).

*1-Hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil acetato de etilo o metiljacaranona (P-2)*. Cristalizó en forma de agujas incoloras con  $\text{Pf} = 54$  °C, a partir de  $\text{CHCl}_3$ . Rf 0,33 en placas de sílica corridas con  $\text{CHCl}_3$ -MeCO 9:1; absorbió la fluorescencia de las placas de sílica a la luz UV de onda corta y reveló amarillo ocre con vainillina/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ . IR, en pastilla de KBr:  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$  (intensidad, tipo de enlace) 3.266 (I, OH); 2.958 (I, CH); 1.725 (M, CO de ésteres); 1.664 (M, cetona  $\alpha,\beta$ -insaturadas cíclicas de seis miembros); 1.616 (M, C=C); 1.242 (D, CO para ésteres), 1.068 (M, C-O de alcohol). RMN $^1\text{H}$  (400 MHz, en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  en ppm (señal, número de hidrógenos, clase) 1,29 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ )  $J=7$  Hz; 2,69 (s, 2H,  $>\text{C}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ); 4,22 (q, 2H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ )  $J=7$  Hz; 6,19 (dd, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )  $J=10,2$  Hz y  $J=6,5$  Hz; 6,96 (dd, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )  $J=10,2$  Hz y  $J=6,5$  Hz. RMN $^{13}\text{C}$  (J-mod, en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  en ppm (tipo de carbono) 14,28 ( $\text{CH}_3-$ ); 43,69 ( $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ); 61,73 ( $\text{CO}-\text{CH}_2-$ ); 128,49 ( $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-$ ); 149,13 ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-\text{OH}$ ); 171,11 ( $\text{COO}$ ) y 185,15 ( $-\text{CO}-\text{CH}=\text{}$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSION

A los extractos de las sustancias de la superficie foliar de *Pentacalia corymbosa* (1h-Pc) y *P. ledifolia* (1h-Pl), se les evaluó la acción inhibitoria del crecimiento hifal de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Botrytis cinerea*, responsables de infecciones en plantas de claveles y rosas cultivadas en invernaderos. Para ello se utilizó el método de crecimiento radial en medio PDA (papa-dextrosa-agar) y, la griseofulvina (GRSF) como control positivo (Paxton, 1991; Torrenegra et al., 2000). Estos extractos mostraron concentraciones inhibitorias medias ( $\text{CI}_{50}$ ) entre 1,8 y 2,0 mg/mL, como se puede observar en la tabla 1.

De los extractos 1h-Pc y 1h-Pl se aislaron eicosanol, ácido eicosanoico, acetato de  $\beta$ -amirina y dos cumarinas: la escopoletina y el 7-geraniloxilescopoletina, ya reportados en estudios anteriores (Torrenegra et al., 2000). Además, se obtuvieron dos sólidos que se rotularon como **P-1** y **P-2**.

El sólido **P-1** se presentó como un aceite coloreado que cristalizó lentamente, a partir de  $\text{CHCl}_3$ , en formas de agujas incoloras. El espectro IR mostró señales para  $-\text{OH}$  ( $3.265 \text{ cm}^{-1}$ ), para CO de éster ( $1.735 \text{ cm}^{-1}$ ), para CO de cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $1.666 \text{ cm}^{-1}$ ) y para insaturaciones C=C ( $1.612 \text{ cm}^{-1}$ ). El espectro RMN $^1\text{H}$  sólo presentó 4 señales: a  $\delta$  2,69 de un singulete de metileno ligado a carbono carbonilo; a  $\delta$  3,74 de un singulete de oximetilo de un éster y, dos a  $\delta$  6,17 (dd) y  $\delta$  6,94 (dd) de hidrógenos vinílicos con acoplamientos orto y meta ( $J=10,2$  Hz y

**Tabla 1.** Concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) en mg/mL de los extractos de las sustancias de las superficies foliares de *Pentacalia corymbosa* (1h-Pc) y *P. ledifolia* (1h-Pl).

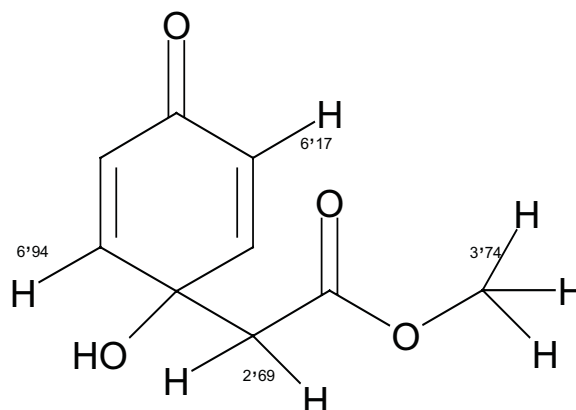
Extractos vegetales	Cepas fúngicas	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>
1h-Pc	1,8 mg/mL	1,9 mg/mL
1h-Pl	1,9 mg/mL	2,0 mg/mL

**Tabla 2.** Inhibición en porcentajes (%I) para concentraciones entre 125-750  $\mu$ g/mL de (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de metilo o jacaranona.

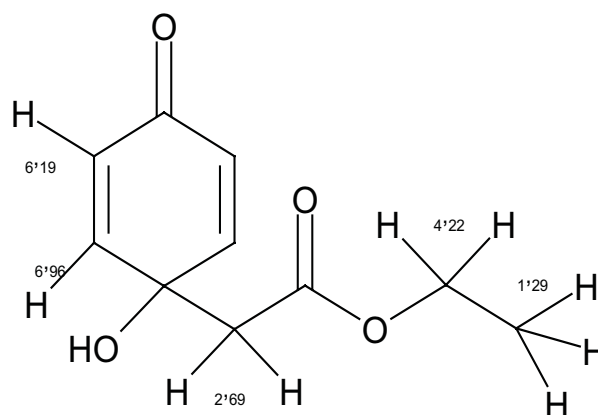
Concentración $\mu$ g/mL	750	500	250	125
<i>Fusarium oxysporum</i>	57,0	37,8	13,5	5,2
<i>Botrytis cinerea</i>	55,5	37,0	12,9	5,1

**Tabla 3.** Inhibición en porcentajes (%I) para concentraciones entre 125-750  $\mu$ g/mL de (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de etilo o metiljacaranona.

Concentraciones en $\mu$ g/mL	750	500	250	125
<i>Fusarium oxysporum</i>	59,3	38,4	21,0	10,4
<i>Botrytis cinerea</i>	58,6	37,9	20,4	9,8



**Figura 1.** Asignaciones a las señales del espectro RMN<sup>1</sup>H de **P-1** (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de metilo o jacaranona.



**Figura 2.** Asignaciones de las señales del espectro RMN<sup>1</sup>H de **P-2** (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de etilo o metiljacaranona.

6,32 Hz), de un sistema AA'BB'. En el espectro RMN<sup>13</sup>C aparecieron 7 señales, a  $\delta$  43,63 de un metileno unido a carbono carbonilo; a  $\delta$  52,44 para  $\underline{\text{CH}}_3\text{O-CO}$ ; dos (cada una correspondiente a dos carbonos) para  $>\underline{\text{CH}}$ - ( $\delta$  128,40 y 149,20) y tres para carbonos cuaternarios; uno de los carbonos cuaternarios es un carbonilo de éster ( $\delta$  171,13), otro es un carbonilo de cetona cíclica ( $\delta$  185,17) y el último posee un grupo hidroxilo ( $\delta$  67,49). En el espectro EIMS se observó un pico progenitor M<sup>+</sup> con m/z 182, lo que permitió asignarle a este compuesto una fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>. Las propiedades espectroscópicas y el punto de fusión (72 °C), coincidieron con los reportados en la literatura para la jacaranona o (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de metilo (Ogura et al., 1976; Lajide et al., 1996).

El sólido **P-2** no presentó en su espectro RMN<sup>1</sup>H la señal a  $\delta$  3,79 del grupo oximetilo de éster presente en el espectro del sólido **P-1**, pero en cambio aparecieron dos señales más: una (q) a  $\delta$  4,22 para un oximetileno de éster y otra (t) a  $\delta$  1,29 de un metilo, mutuamente acoplados (J=7 Hz). En el espectro RMN<sup>13</sup>C aparecieron también dos señales diferentes: una a  $\delta$  61,73 para un oximetileno de éster y otra a  $\delta$  14,28 para un metilo unido a metileno. El análisis permitió asignar a este sólido una fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>; su punto de fusión (Pf = 54 °C) coincidió con el reportado en la literatura para el metiljacaranona o (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de etilo (Lajide et al., 1996).

Para los quinoles aislados se prepararon soluciones de 30, 20, 10 y 5 mg/mL, de las cuales se tomaron 150  $\mu$ L para adicionarlos a 6 mL de medio de cultivo PDA contenido en cajas de Petri obteniéndose concentraciones de 750, 500, 250 y 125  $\mu$ g/mL respectivamente. Las cajas se inocularon con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Botrytis cinerea* y se incubaron durante 6 días a 25 °C; al término del tiempo se midieron los diámetros de las colonias y se calcularon los %C y %I. En las tablas 2 y 3 se ordenan los valores de %I y sus respectivas concentraciones, para los dos quinoles.

Se graficaron los valores de %I contra sus respectivas concentraciones y se determinaron, por interpolación, los valores aproximados de CI<sub>50</sub> para los dos quinoles; para el (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de metilo se encontró una CI<sub>50</sub> de 660  $\mu$ g/mL y para el (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de etilo una de 650  $\mu$ g/mL.

Al comparar la baja acción antifúngica de los quinoles frente a la obtenida para cumarinas (Torrenegra et al., 2000), se podría sugerir que la presencia de estos compuestos en la superficie foliar sea la de un papel defensivo contra herbívoros (Lajide et al., 1996) y no contra hongos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al doctor Alexander Gray de la Universidad de Strathclyde (Escocia) por los espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C; a la Universidad

Javeriana y a COLCIENCIAS por su apoyo económico (Proyecto código 1203-05-394-95,CT-128-97).

## REFERENCIAS

- Abdullahi H, Nyandat E, Galeffi C, Mesana I, Nicoletti M, Marini-Bettolo G 1986. Cyclohexanols of *Halleria lucida*. *Phytochemistry* 25: 2821-2823.
- Alfonso ANT, Castro C, Murcia TR, Torrenegra R 2006. Efectos citotóxicos *in vitro* de extractos y fracciones de *Espeletia killipii* Cuatr. frente a líneas celulares tumorales humanas. *Rev Bras Farmacogn* 16: 12-16.
- Bohlmann F, Ziesche J 1979. Neue germacrene-derivate aus *Senecio*-arten. *Phytochemistry* 18: 1489-1494.
- Bohlmann F, Castro V, Ziesche J 1984. New sesquiterpenes from *Pentalia* species. *Rev Latinoamer Quim* 14: 103-106.
- Díaz S, Cuatrecasas J 1999. *Asteraceas de la flora de Colombia Senecioneae-I. Géneros Deridrophorbium y Pentalia*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Jorge Alvarez Lleras No. 12. Bogotá, Colombia. 345 p.
- García-Barriga H 1975. *Flora medicinal de Colombia*. Vol. 2. Editorial Imprenta Nacional. Bogotá, Colombia. pg. 293, 398-409.
- Hase T, Kawamoto Y, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K, Picheamsoonthon CH 1995. Cyclohexylethanoids and related glucoside from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry* 39:235-241.
- Jaimes G, Castro C, Aristizaba FA, Murcia TR, Torrenegra R, Alfonso ANT 2006. Principio activo citotóxico de *Espeletia killipii* Cuatr. sobre células tumorales y su toxicidad frente a células normales humanas. *Rev Bras Farmacogn* 16: 140-145.
- Julkunen-Tiitto R 1986. A chemotaxonomic survey of phenolics in leaves of Northern *Salicaceae* species. *Phytochemistry* 25:663-667.
- Kuwajima H, Takahashi M, Ito M, Wu H, Takaiishi K, Inoue K 1993. A quinol glucoside from *Abeliophyllum distichum*. *Phytochemistry* 33:137-139.
- Lajide L, Escoubas P, Mizutani J 1996. Cyclohexadienones-insect growth inhibitors from the foliar surface and tissue extracts of *Senecio cannabifolius*. *Experientia* 52: 259-263.
- Nicoletti M, Galeffi C, Messana I, Marini-Betolo G, Garbarino J, Gambaro V 1988. Phenylpropanoid glycosides from *Calceolaria hypericina*. *Phytochemistry* 27: 639-641.
- Ogura M, Cordell G, Farnsworth N 1976. Potencial anticancer agents. III. Jacaranone, a novel phytoquinoid from *Jacaranda caucana*. *Lloydia* 39: 255-257.
- Paxton J 1991. Assays for Antifungal Activity. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 6. Assays for Bioactivity. Hostettmann, K. (Ed). Academic Press. London, England. pp. 33-46.
- Pérez-Arbeláe E 1956. *Plantas útiles de Colombia*. Librería colombiana, Camacho Roldán Ltda. Bogotá, Colombia. pg. 229-230.
- Robles J, Torrenegra R, Gray AI, Piñeros C, Ortiz L, Sierra M 2005. Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Rev Bras Farmacogn* 15: 283-286.
- Sasaki H, Taguchi H, Endo T, Yosioka I, Higashiyama K,

- Otomasu H 1978. The glycosides of *Martynia louisiana* Mill, a new phenylpropanoid glycoside, Martynoside. *Chem Pharm Bull* 26: 2111-2121.
- Schwab W, Schreier P 1988. Aryl- $\beta$ -D-glucosides from *Carica papaya* fruit. *Phytochemistry* 27: 1813-1816.
- Seya K, Endo K, Hikino H 1989. Structures of rengyosides A, B and C, three glucosides of *Forsythia suspensa* fruits. *Phytochemistry* 28: 1495-1498.
- Torrenegra RD, Pedrozo JA, Téllez AN, Cabeza G, Granados A, Méndez D 2000. Química y actividad antifúngica de *Pentacalia corymbosa* (Asteraceae-Senecioneae). *Rev Latinoamer Quím* 28: 31-34.