

**ESTUDIO DE HOJAS DE *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr COMO
NUEVA FUENTE NATURAL DE SUSTANCIAS ESTEROIDALES Y CUMARINAS**

CARLOS FELIPE GARIBELLO RUBIANO



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA "GIFUJ"
BOGOTÁ
2010**

**ESTUDIO DE HOJAS DE *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr COMO
NUEVA FUENTE NATURAL DE SUSTANCIAS ESTEROIDALES Y CUMARINAS**

CARLOS FELIPE GARIBELLO RUBIANO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Magíster en Ciencias Biológicas.**

Dr JULIO ARMANDO PEDROZO

Director

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA "GIFUJ"
BOGOTÁ
2010**

Nota de Aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

**ESTUDIO DE HOJAS DE *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr COMO
NUEVA FUENTE NATURAL DE SUSTANCIAS ESTEROIDALES Y CUMARINAS**

CARLOS FELIPE GARIBELLO RUBIANO

APROBADO

**Dr. Manuel Franco
Director de Posgrados
Facultad de Ciencias**

**Dra. Ingrid Schuler
Decana Académica
Facultad de Ciencias**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA "GIFUJ"
BOGOTÁ
2010**

A MIS PADRES

Luz Stella Rubiano Bonilla

Carlos Ernesto Garibello Molina

Por todo su amor, apoyo en los momentos más difíciles y por sus palabras de aliento para seguir adelante en todo momento. A mis hermanos Erika y Gabriel Alejandro, por su inmenso cariño, muestras de afecto y darme ánimos para alcanzar esta meta tan importante en mi carrera profesional. A mi preciosa sobrina Maria Fernanda, por llenarme de felicidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Julio Armando Pedrozo, por enseñarme y ayudarme a desarrollar mis habilidades teórico – prácticas, además de siempre compartir generosamente sus amplios conocimientos y experiencia.

Los Doctores Jorge Robles y Noemí Téllez, por su gran colaboración y valiosísimos aportes de carácter científico y procedimental.

La profesora Elizabeth Gil, el profesor Álvaro Granados, por su constante apoyo, acompañamiento y asesoría disciplinar.

A Iván, Diana Angélica, María Angélica, John Edward, y demás estudiantes del laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Javeriana.

A mis compañeros de la Universidad Manuela Beltrán.

A mi novia Viviana por su paciencia y compañía.

A mis grandes Amigos Carlos Alberto Bejarano e Ivan Fernando Santana.

GLOSARIO

AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en Columna
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CCDP	Cromatografía en Capa Delgada Preparativa
CLV	Cromatografía Líquida de Vacío
CHCl ₃	Cloroformo
EdP	Éter de Petróleo
d	Doblete
dd	Doble Doblete
DMSO	Dimetilsulfoxido
EtOH	Etanol
EM	Espectrometría de Masas
CG-EM	Cromatografía de gases – Espectrometría de masas
FLL	Fraccionamiento líquido-líquido.
Hz	Hertz
Me ₂ CO	Acetona
MeOH	Metanol
Rf	Relación de Frente
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno 1
Pf.	Punto de Fusión
UV	Ultravioleta

Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y conclusiones anotadas son responsabilidad sólo del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación
Agosto de 1989

CONTENIDO

	Pag.
Contenido	i
Índice de Tablas	iii
Índice de Figuras	iv
Resumen	vi
Abstrac	vii
Introducción	viii
1. Estado Actual	1
1.1 Generalidades de la familia Asteraceae .	1
1.2 Tribu Senecioneae .	1
1.3 Descripción botánica y taxonómica del género Pentacalia .	2
1.4 Distribución geográfica del género Pentacalia .	3
1.5 Usos Etnobotánicos de algunas especies pertenecientes al género Pentacalia .	4
1.6 Fitoquímica del género Pentacalia .	6
1.7 Actividad biológica de algunos metabolitos aislados del género Pentacalia .	7
1.8 Generalidades de las Cumarinas.	9
1.8.1 Actividad Biológica de Cumarinas.	9
1.9 Generalidades de los Esteroles.	11
2. Materiales y Métodos	14
2.1 Ensayos Preliminares.	14
2.1.1 Análisis Cromatográficos.	14
2.1.2 Pruebas Químicas.	15
2.2 Preparación de Extractos.	15
2.3 Purificación.	15
2.3.1 Cromatografía en capa delgada (CCD).	15
2.3.2 Cromatografía en capa preparativa (CCP).	18
2.3.3 Cromatografía en columna (CC).	18
2.4 Agentes de detección y visualización de compuestos.	18
2.5 Identificación.	18

	Pag.
3 Experimentación.	19
3.1 Pruebas químicas preliminares y análisis cromatográficos.	19
3.2 Metodología General.	20
3.3 Material Vegetal.	20
3.4 Obtención de extractos y fracciones.	21
3.4.1 Preparación del extracto en éter de petróleo.	21
3.4.2 Preparación del extracto etanólico.	21
3.4.3 Preparación del extracto acetato de etilo.	22
3.5 Aislamiento de metabolitos secundarios.	22
3.6 Identificación de metabolitos secundarios.	25
4 Resultados	26
4.1 Porcentajes de rendimiento.	26
4.2 Purificaciones de metabolitos secundarios.	28
4.2.1 Compuesto Pv-1 .	28
4.2.2 Compuesto Pv-2 .	35
4.2.3 Compuesto Pv-3 .	39
4.2.4 Compuesto Pv-4 .	46
4.2.5 Compuesto Pv-5 .	54
5 Discusión.	58
6 Conclusiones.	61
7 Bibliografía	62

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Algunos compuestos aislados del género <i>Pentacalia</i> .	6
Tabla 2. Algunos metabolitos característicos del género <i>Pentacalia</i>	7
Tabla 3. Actividad biológica de algunos compuestos aislados del género <i>Pentacalia</i> .	8
Tabla 4. Cumarinas aisladas de tejidos vegetales infectados con hongos.	10
Tabla 5. Resultados de los ensayos preliminares en extractos totales de <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth) Cuatr.	19
Tabla 6. Cantidades y porcentajes en peso seco de los extractos obtenidos de <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth) Cuatr.	26
Tabla 7. Cantidades y porcentajes respecto a extractos de diferente polaridad obtenidas <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth)Cuatr..	26
Tabla 8. Cantidades y porcentajes se sustancias obtenidas respecto a extractos y fracciones de diferente polaridad obtenidas <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth)Cuatr.	27
Tabla 9. Desplazamientos δ (ppm) del espectro de RMN H ¹ a 400 MHz, utilizando como solvente CD ₃ Cl del compuesto Pv-1	32

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth) Cuatr.	3
Figura 2. Distribución geográfica en Colombia de <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth) Cuatr.	5
Figura 3. Diagrama general de la metodología desarrollada en los ensayos preliminares.	11
Figura 4. Metodología desarrollada en las pruebas preliminares.	16
Figura 5. Metodología desarrollada en las pruebas preliminares.	17
Figura 6. Diagrama general de la metodología desarrollada.	20
Figura 7. Diagrama general preparación de extractos y fracciones de <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth) Cuatr.	21
Figura 8. Diagrama de obtención de metabolitos secundarios a partir del extracto éter de petróleo de <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth) Cuatr.	23
Figura 9. Diagrama de obtención de metabolitos secundarios a partir del extracto etanólico de <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth) Cuatr.	24

Figura 10.	Cromatograma de Pv-1 . Fase estacionaria Sílica gel 60. CHCl ₃ -MeOH (9,5:0,5). Observada bajo la luz U.V de onda larga 365 nm..	28
Figura 11.	Cromatograma de la sustancia Pv-1 .	29
Figura 12.	Espectro de masas de la 2 H-1- Benzopiren -2-ona (Cumarina). Pv-1 . Base de datos NIST-05	30
Figura 13.	Esquema de fragmentación de la Cumarina.	31
Figura 14.	Espectro RMN H ¹ de la sustancia Pv-1 , disuelta en CD ₃ Cl a 400 MHz.	33

V

	Pag.	
Figura 15.	Ampliación del espectro RMN H ¹ de la sustancia Pv-1 , disuelta en CD ₃ Cl a 400 MHz.	34
Figura 16.	Cromatograma de Pv-2 . Fase estacionaria Sílica gel 60. CHCl ₃ -Me ₂ CO (10:1). Observada bajo la luz U.V de onda larga 365 nm.	35
Figura 17.	Cromatograma de la sustancia Pv-2 .	36
Figura 18.	Espectro de masas de la Escopoletina. Pv-2 . Base de datos NIST-05	37
Figura 19.	Esquema de fragmentación de la Escopoletina.	38

Figura 20. Cromatograma de Pv-3 . Fase estacionaria Sílica gel 60. éter de petróleo-Me ₂ CO (8:2). Revelada con vainillina.	39
Figura 21. Cromatograma CG de la fracción Pv-3 .	40
Figura 22. Espectro de masas del Estigmasterol Pv-3 . Base de datos NIST-05.	41
Figura 23. Espectro de masas del 7, 16-dien, 3 Estigmasterol. Pv-3 . Base de datos NIST-05.	42
Figura 24. Espectro de masas del Gamma Sitosterol. Pv-3 . Base de datos NIST-05.	43
Figura 25. Esquema de fragmentación para el Gama Sitosterol	44
Figura 26. Esquema de fragmentación para el Gama Sitosterol	45
Figura 27. Cromatograma de Pv-4 . Fase estacionaria Sílica gel 60. Éter de petróleo-Me ₂ CO (8:2). Revelada con vainillina.	46
Figura 28. Cromatograma CG de la fracción Pv-4 .	47
Figura29. Espectro MS del Estigmasterol. Pv-4 . Base de datos NIST-05.	48
Figura 30. Espectro MS del gamma Sitosterol. Pv-4 . Base de datos NIST-05.	49

Figura 31.	Espectro de resonancia magnética nuclear H^1 , disuelta en CD_3Cl a 400 MHz de Pv-4 tras la cristalización.	51
Figura 32.	Espectro de resonancia magnética nuclear C^{13} , disuelta en CD_3Cl a 100 MHz de Pv-4 tras la cristalización.	52
Figura 33.	Estructura química del Estigmasterol y Gama Sitosterol	53
Figura 34.	Cromatograma de Pv-5 . Fase estacionaria Sílica gel 60. Éter de petróleo- Me_2CO (8:2). Observada bajo la luz U.V de onda larga 365 nm.	54
Figura 35.	Cromatograma CG de la sustancia Pv-5	55
Figura 36.	Espectro de masas de la Escoporona. Pv-5 . Base de datos NIST-05.	56
Figura 37.	Esquema de fragmentación de la Escoporona.	57

RESUMEN

El objetivo fundamental de este trabajo fue la búsqueda de una nueva fuente natural de sustancias esteroideas y cumarinas en las hojas de la especie colombiana ***Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr.**

La separación de los extractos por los métodos de cromatografía en columna y cromatografía en capa delgada permitieron el aislamiento y la posterior identificación de algunos metabolitos secundarios presentes en la especie *Pentacalia vaccinioides*, los cuales son las cumarinas 2H-1-Benzopiren-2-ona (Cumarina); 7-Hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (Escopoletina); 6,7 dimetoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (Escoporona); los esteroides Estigmasterol; 7,16-dien-3-estigmasterol y gamma sitosterol. Estas sustancias fueron identificadas con base en sus propiedades físicas (punto de fusión y valor de Rf) reacciones químicas cualitativas y técnicas espectroscópicas como Cromatografía de Gases acoplada a Masas, y Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C en una dimensión, dependiendo de la complejidad de cada una.

ABSTRAC

The aim of this work was the search of a new natural source of substances the sterols and cumarin the Colombian vegetal specie ***Pentacalia vaccinioides*** (Kunth) Cuatr.

The separation of extracts by column chromatography and thin layer chromatography methods let the isolation of the secondary metabolites presents in the specie which are the cumarin: 2-H-1-Benzopyran-2-one (Cumarina); 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopyran-2-ona (Escopoletina); 6,7-dimetoxi-2H-1-benzopyran-2-ona (Escoporona); the sterols Estigmasterol; 7,16-dien-3-estigmasterol; gamma sitosterol..

These compounds were identified based on their physical properties (melting point and Rf value), qualitative chemical reactions and the spectroscopic techniques of, GC –MS, and NMR, according to the complexity of each them.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo las plantas fueron los únicos medicamentos utilizados por los seres humanos, las primeras culturas en su afán de bienestar y prosperidad empezaron a adquirir conocimientos empíricos sobre la utilización de plantas para curar enfermedades, para la elaboración de redes para la pesca, fibras para cuerdas para arcos y vestidos. Con el desarrollo de las primeras civilizaciones y del lenguaje estos conocimientos empezaron a transmitirse de generación en generación con el fin de prolongarse, de esta manera se empezó a acumular conocimientos sobre la naturaleza que los rodeaba.

El hombre en la actualidad busca obtener productos vegetales con fines alimenticios, medicinales e industriales para ello introduce en sus lugares de asentamiento numerosas especies exóticas, y con ellas, sus plagas y enfermedades. Por esta razón, los equilibrios naturales entre las plantas y sus enemigos, se han visto afectados a tal punto que algunas plagas consiguen proliferarse de forma alarmante, obligando al hombre a una continua lucha contra estas enfermedades y plagas⁴⁹. Ejemplo dramático de ello fue el caso de la filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), que se introdujo en Europa procedente de América a finales del siglo XIX y arrasó todos los viñedos.⁶⁰

El uso de plaguicidas, insecticidas o fungicidas ha sido el mecanismo de control usado por los agricultores debido a su gran eficacia, sin embargo el alto grado de toxicidad y acumulación de estos en los suelos hace que la ciencia busque en los productos naturales una alternativa amigable con el medio ambiente

Las plantas poseen una gran cantidad de sustancias producto de su metabolismo secundario, las múltiples funciones que presentan estas sustancias en los vegetales permiten la búsqueda de nuevas sustancias químicas naturales, como insecticidas, herbicidas o reguladores de crecimiento, entre otras. En vista de que los fármacos ya existentes pueden exhibir resistencia a microorganismos, los productos naturales cobran importancia en medicina no solamente por sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos sino en la posibilidad que ofrecen de desarrollar, a partir de sus estructuras, nuevos medicamentos.

La búsqueda, identificación, extracción y uso de metabolitos secundarios de origen vegetal se ha perfeccionado con la ayuda de otras ciencias y el avance

tecnológico, hoy en día se trabaja en la biosíntesis y estructura molecular de drogas naturales que permiten sintetizar compuestos análogos con una mayor actividad biológica y potencial terapéutico. Por ejemplo diversos anestésicos locales como la procaína, la benzocaína y la lidocaína, se sintetizaron tomando como modelo estructural a la cocaína, un alcaloide natural contenido en las hojas de *Erythroxylon coca*.¹⁵

Esta investigación está incluida dentro del proyecto “Aislamiento e identificación de glicósidos transportadores de principios activos presentes en los extractos de hojas y flores presentes en *Pentacalia ledifolia* y *Pentacalia corymbosa* (Asteraceae Senecioneas)” del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, que tiene como objetivo la búsqueda de nuevas fuentes naturales de metabolitos secundarios de interés biológico en plantas autóctonas del territorio Colombiano.

Colombia es el segundo país en el mundo con mayor cantidad de especies vegetales las cuales han sido investigadas en un bajo porcentaje además el rápido crecimiento urbano amenaza con desaparecer especies endémicas antes de ser investigadas.

El género *Pentacalia* incluye un total de 217 especies, de las cuales casi la mitad están representadas en Colombia las cuales han sido poco estudiadas, sólo se reportan en la literatura los estudios de aceites esenciales de *P. ephiphytica*, *P. andicola*, *P. firmipes* y *P. archieri*, de los cuales se aislaron nerolidol, humuleno, farneseno, curcumeno, santaleno, germacreno D, varios cadinenos, cicloartenol, friedelina y 5-metoxieugenol^{38,55}. El grupo de investigación GIFUJ (Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana), ha trabajado con los extractos en éter de petróleo y etanol de hojas de *P. corymbosa* y *P. ledifolia*, obteniendo sitosterol, eicosanol, friedelina, dos quinoles (jacaranona y metiljacaranona), dos cumarinas (escopoletina y 7-geraniloxilescopletina) y dos flavonoides (quercetina y rutina)⁶⁴.

Después de un análisis cromatográfico y de pruebas químicas preliminares para algunas especies del género ***Pentacalia*** (*P. nítida*, *P. abietina* y *P. vaccinioides*) y cotejando con la información obtenida por el grupo de investigación GIFUJ de la Universidad Javeriana en otras especies del mismo género se ha encontrado

X

en la especie ***Pentacalia vaccinioides*** (Kunth) Cuatr. la presencia de cumarinas y esteroides en cantidades representativas

En esta investigación se tiene como objetivo principal reconocer la especie ***Pentacalia vaccinioides*** (Kunth) Cuatr como una nueva fuente natural de sustancias esteroidales y cumarinas, y contribuir al estudio quimiotaxonómico del genero *Pentacalia*.

Como objetivos específicos

Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en la especie *Pentacalia vaccinioides* por medio de pruebas químicas preliminares.

Obtener extractos y fracciones de diferente polaridad en los cuales se presenten sustancias esteroidales y cumarinas.

Aislar sustancias esteroidales y cumarinas por medio de diferentes técnicas cromatográficas.

Identificar los compuestos por técnicas espectroscópicas como (GC-MS, RMN ¹H, RMN ¹³C).

1. ESTADO ACTUAL

1.1 Generalidades de la familia Asteraceae

Las **Asteraceas** (Asteraceae Bercht. & J. Presl), también conocidas como compuestas, cuentan con aproximadamente 1.620 géneros y 23.600 especies, es la familia más grande de Angiospermas⁴⁰.

Las Asteraceas en su gran mayoría de especies son plantas herbáceas muy pocas veces se encuentran como arbustos, árboles o lianas. Existen varias especies que presentan aceites esenciales y también látex. Pueden o no ser resinosas. En general, las hojas están bien desarrolladas, en algunos casos se hallan muy reducidas. No son plantas comestibles aunque existen algunos ejemplos de Asteraceas con esa característica. Pueden ser anuales, bienales o perennes, con una agregación basal de hojas (una "roseta" basal) o sin ella. Existen especies hidrofíticas (ciertas especies de *Bidens* o *Cotula*), que presentan hojas sumergidas y emergentes. Por otro lado, existen especies helofíticas, mesofíticas y xerofíticas²⁴.

La familia esta distribuida en todo el mundo menos en la Antártida, pero se encuentra especialmente en las regiones tropicales y subtropicales de Norteamérica, los Andes, Brasil Oriental, el sur de Africa, Asia Central, y China del sudoeste. La mayoría de las especies de las Asteraceae es herbácea aunque un componente significativo de la familia esta constituido por arbustos y arboles que se encuentran principalmente en la region de Norte y Sudamérica, Africa y Madagascar y en islas del Oceano Atlántico y Pacífico.

En muchas regiones del mundo las Compuestas llegan a integrar hasta el 10% de la flora vernácula. La familia contiene algunos géneros con una gran cantidad de especies, como es el caso de *Senecio* (con 1250 especies), *Hieracium* (1000 especies) y *Helichrysum* (600 especies)²¹.

Los miembros de varios géneros de la familia son muy conocidos por su valor hortícola y popular en jardines a través del mundo e incluyen las zinnias, las maravillas, las dalias, y los crisantemos. El género comercial del girasol *Helianthus* ha sido utilizado como un modelo en el estudio de hibridación y su papel en la evolución de las especies⁵⁶.

1.2 Tribu Senecioneae

Teniendo en cuenta el número de géneros y de especies que la integran, la tribu Senecionea es una de las más grandes dentro de la familia Asteracea; a su vez el género tipo (*Senecio*) es el más rico de la familia, debido al número de especies que agrupa. Dentro de la tribu, el mayor problema sistemático corresponde a la clasificación de *Senecio*, género gigante y polifilético, entidad que se ha reducido progresivamente al ser separado como nuevos géneros en varios grupos monofiléticos, quedando integrado por un grupo parafilético y más homogéneo, basado en caracteres pleimórficos.

La descripción botánica del género *Pentacalia* fue propuesto de manera casual por Cassini en 1827, ligando tal concepto con una característica poco común en la tribu *Senecioneae*, pero muy marcada en la especie típica *Cacalia arbórea* H.B.K, donde los aquenios son gruesos y pentagonales. La primera mención al mismo aparece en el Diccionario de Ciencias Naturales, cuando el botánico francés Cassini, redefine la tribu de las *Senecioneas* como décima cuarta del orden de las *Sinantereas*. Dentro de los arquetipos o los prototipos de la segunda sección, el distinguido con el número 24, corresponde a *Pentacalia* H.Cass=*Cacalia arbórea* Kunth.²⁰

Más adelante Cassini describe el prototipo con las siguientes palabras; “En combinación con la descripción y la figura de la *Cacalia arbórea* del Sr.Kunth, parece que tal especie no es similar a la verdadera *Cacalia*, y que puede formar, bajo el nombre de *Pentacalia*, un género o subgénero caracterizado principalmente por los frutos pentágonos”²⁴

Si los estigmatóforos, la corola y el ovario están correctamente representados, se puede conjeturar con alguna certeza que el árbol en cuestión pertenece más bien a las Adenostiléas que a las Senecionéas.

La tribu Senecioneae cuenta con una mayoría de especies perennes, aunque algunas son anuales; unas pocas son arbustivas pero la gran mayoría son hierbas erectas; todas carecen de látex aunque algunas contienen esencias.

1.3 Descripción botánica y taxonómica del género *Pentacalia*

El género *Pentacalia* fue propuesto de manera casual por Cassini en 1827 ligando tal concepto con una característica poco común en la tribu *Senecioneae*, pero muy marcada en la especie típica *Cacalia arbórea* H.B.K., donde los aquenios son gruesos y pentagonales ²⁰.

Se caracteriza por ser árboles, frúctices o frutículos erectos o escandentes; tallos cilíndricos o sub cilíndricos, a veces reducidos a un carpopodio subterráneo; ramas cilíndricas, hojas generalmente alternas y casi siempre pecioladas, lámina elíptica ovalada, oblonga o linear, coriácea o subcoriácea, a veces crasiúscula margen más o menos dentada, denticulada o entera, a veces revoluta, nerviación pinada, prominente o impresa e inconspicua; inflorescencias terminales o laterales, corimboso – paniculadas, tirsoideas, raras veces racemiformes, multicéfalas o paucicéfalas, casi excepcionalmente monocéfalas; capítulos discoideos o radiados, normalmente erectos y pedicelados, a veces aglomerados, generalmente pequeños o medianos raras veces grandes; involucreo cilíndrico o acompañado y con (5-) 8-13 (-21) filarias sub uniseriadas, elíptico-oblongas y crasiúsculas, glabras, a veces vestidas dorsalmente; receptáculo plano o ligeramente convexo, alveolado, liso o escarioso, fimbriado, a veces escumífero (escrobiculado) o hirsuto; flores radiales cuando presentan liguladas y excertas, a veces tubulosas y lobuladas, generalmente amarillas o blanquecinas, raras veces blancas y que enrojecen al madurar, glabras y brevemente denticuladas; flores del disco tubulosas, glabras, limbo tubuloso o ligeramente infundibuliforme, 5-lobulado-dentado, lóbulos triangular-oblongos²⁴. (Figura 1)

La clasificación taxonómica del género *Pentacalia* es la siguiente:

REINO: Plantae

SUBREINO: Tracheobinta

FILUM: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae

TRIBU: Senecioneae

GÉNERO: *Pentacalia*

ESPECIE: *P. vaccinioides*



Figura 1. *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr
Tomado de: <http://www.efloras.org/florataxon.aspx>

1.4 Distribución geográfica del género *Pentacalia*

Este género es propio del norte de los andes, donde se ha formado el mayor número de especies, desde donde han irradiado hacia el norte y el este. En Centroamérica el género está representado por trece especies que crecen en Panamá, Costa Rica, Honduras, Nicaragua y Guatemala. Por el este irradia la región andina de Venezuela, alcanzando unas pocas especies la zona amazónica de tal país; para el territorio venezolano han sido registradas 32 especies, algunas de las cuales son comunes con Colombia; de las especies venezolanas 11 pertenecen al subgénero *Pentacalia* y 21 caben en el subgénero *Microchaete*. En Ecuador han sido registradas 42 especies, algunas de las cuales se extienden al Perú o a Colombia; la mayoría de ellas quedan bien ubicadas en el género *Pentacalia*. En Perú se han registrado 60 especies, lo que convierte al oriente peruano en el Segundo centro de especiación y diversificación.

En Bolivia han sido registradas 15 especies y en Colombia un total de 94 especies, con 4 subespecies y 3 variedades; de tales especies, 50 pertenecen al género *Pentacalia* y 44 al subgénero *Microchaete* considerado así el género incluye un total de 217 especies, de las cuales casi la mitad están representadas en Colombia²⁴.

En Colombia el género se encuentra distribuido principalmente en los departamentos de Antioquia, Arauca, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima, Valle (figura 2).

1.5 Usos Etnobotánicos de algunas especies pertenecientes al género *Pentacalia*

Las partes aéreas en decocción se usan como desinfectantes y cicatrizantes en heridas de difícil curación²⁹. Los campesinos cundiboyacenses las han utilizado como vulnerarias y contra la sífilis, para curar granos y forúnculos rebeldes, contra dolores de garganta y contra úlceras.



Figura 2. Distribución geográfica en Colombia de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr.
 Fuente: www.geografiacolombiana.com y modificado por el Autor

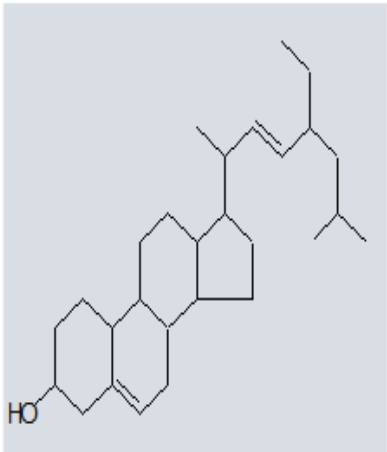
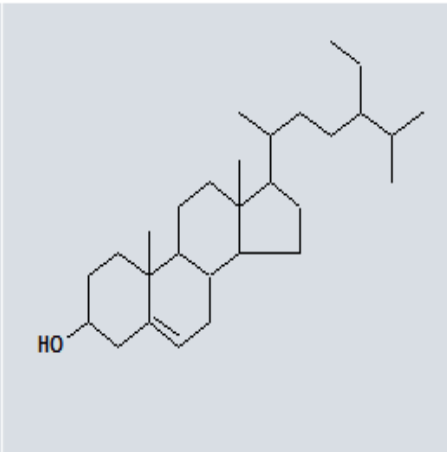
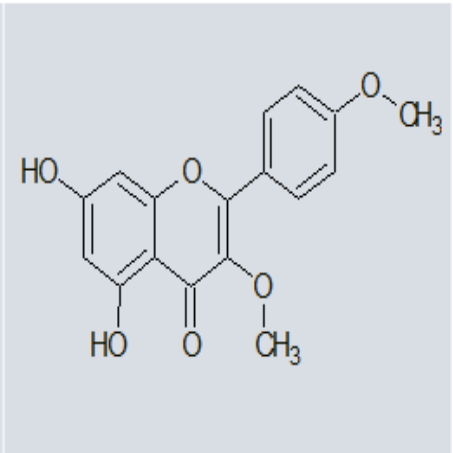
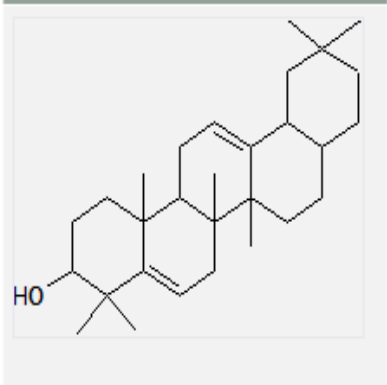
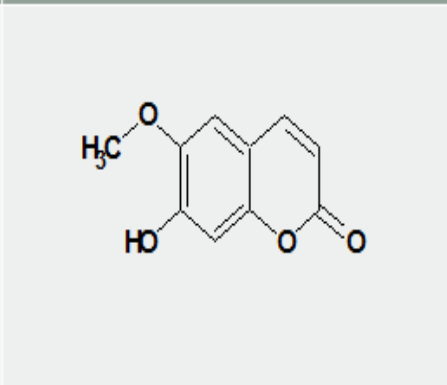
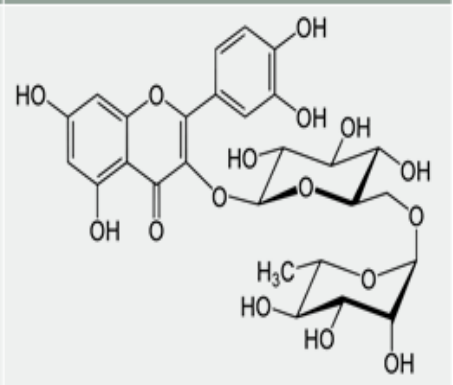
1.6 Fitoquímica del género *Pentacalia*

Existen pocos reportes de estudios fitoquímicos del género *Pentacalia*; se aislaron friedelina, cicloartenol y un aceite esencial constituido principalmente por α -humuleno, β -farneseno, santaleno, isocumeno y otros sesquiterpenos altamente oxigenados derivados del bisaboleno y del cadineno de las especies *P.andicola*, *P.archeri* y *P.epiphytica*⁷. Los estudios realizados se han hecho en su gran mayoría por el grupo de investigación GIFUJ de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá, las *Pentacalias* se caracterizan por presentar un alto contenido de cumarinas y quinoles^{31,65} y algunos otros compuestos como flavonoides, esteroides y cicloartenol en *P.nítida*⁶⁶, eicosanol y estigmasterol en *P. pulchella*²⁸ (ver tabla 1).

Tabla 1. Algunos compuestos aislados del género *Pentacalia*. Fuente: el Autor.

ESPECIE	COMPUESTOS
<i>Pentacalia andicola</i> ⁵¹	Cicloartenol, 5-metoxieugenol
<i>Pentacalia epiphytica</i> ⁵¹	Escualeno, Nerodiol
<i>Pentacalia archeri</i> ⁵¹	Triterpenos, Germacranos Oxidados
<i>Pentacalia nitida</i> ¹⁵	Flavonoides de tipo flavonas, mezcla de ácidos grasos, hidrocarburos alifáticos y tipo triacontano y un esteroide cicloartano
<i>Pentacalia pulchella</i> ¹²	Terpenos, compuestos fenólicos, estigmasterol, eicosanol.
<i>Pentacalia corymbosa</i> ^{13, 16}	Acetato de β -Amirina, el β -Sitosterol, rutina, Quinoles, flavonoides, Ácidos Grasos, Quercetina y 7-O-Geranilescopoletina
<i>Pentacalia ledifolia</i> ^{13,17}	Eicosanol, Acetato de β - Amirina, el β -Sitosterol, Rutina, Quercetina, Escopoletina.
<i>Pentacalia firmipes</i> ¹⁰	α -Humeleno, β Farneseno, Santaleno, Cicloartenol, Isocomeno, friedelina

Tabla 2. Algunos metabolitos característico del género *Pentacalia*. Fuente: el Autor.

		
<p>Estigmasterol</p>	<p>β-Sitosterol</p>	<p>5,7- Dihidroxi-3'-4'- Dimetoxiflavona</p>
		
<p>β - Amirina</p>	<p>7-hidroxi-6-Metoxicumarina (Escopoletina)</p>	<p>3-rutinósido de quercetina (Rutina)</p>

1.7 Actividad biológica de algunos metabolitos aislados del género *Pentacalia*

Se han encontrado varias especies del género *Pentacalia* que presentan actividad biológica como en la *Pentacalia tolimensis* se comprobó su actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* hongos dermatofitos como *Candida albicans*, *Trichophyton mentographytes* y *Microsporum gyseum* en el extracto éter de petróleo y la fracción diclorometano del extracto etanólico¹⁸, también se ha encontrado que una cumarina la Escopoletina identificada en la *Pentacalia ledifolia* presenta gran actividad contra hongos fitopatógenos que atacan principalmente los cultivos de rosas, tomates, frijol y claveles (*Botrytis*

cinérea, Fusarium oxysporum, Colletotrichum gloeosporoides, Alternaria solani, Rhizoctonia solani y Trichoderma viride)^{17,30,65}

Químicamente se ha comprobado que la 7-0-geranilescopoletina se encontró en mayor concentración en el extracto de diclorometano de hojas y raíces de *Pentacalia corymbosa* mientras que la escopoletina es el mayoritario de *Pentacalia ledifolia*⁴⁰. Estudios comprobaron que la 7,0-geranilescopoletina es más activa que la Escopoletina frente a *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* y *Botrytis cinérea*.

En *Pentacalia spp*, se ha reportado actividad antifúngica debido a la presencia de quinoles y cumarinas²² además de algunas propiedades farmacológicas que se utilizan en la medicina popular como el uso de emplastos para curar heridas⁴⁴.

La cumarina más representativa de las plantas del género *Pentacalia* es la Escopoletina que se expresa sobre todo en las hojas para protegerse del ataque de insectos y hongos.⁵¹ Además de las propiedades antifúngicas de la escopoletina, se han reportado usos farmacológicos importantes en la activación y modulación del sistema inmune⁵¹.

Los compuestos de interés farmacológico, antifúngico y antimicrobiano (quinoles y cumarinas) se reportan en las fracciones clorofórmicas y diclorometano, de mediana polaridad^{31, 30, 22}.

En la *Pentacalia Corymbosa* se identificó que además de compuestos activos como los quinoles, la planta posee cumarinas identificadas como 7-hidroxi-6-metoxicumarina (Escopoletina) y su derivado prenilado, 7,0-geranilescopoletina, resultando estas también responsables de la acción actividad contra hongos fitopatogenos como: *Botrytis cinérea, Fusarium oxysporum y Trichoderma viride*⁶⁵(tabla 3).

Tabla 3. Actividad biológica de algunos compuestos aislados del género *Pentacalia*.
Fuente: el Autor.

ESPECIE	SUSTANCIA O EXTRACTO	ACCIÓN BIOLÓGICA
<i>Pentacalia tolimensis</i>	Extracto éter de petróleo y la fracción diclorometano del extracto etanolico	Actividad antifúngica Actividad antibacterial ¹⁸
<i>Pentacalia ledifolia</i>	Escopoletina	Actividad antifúngica Activación y modulación del sistema inmune ²²

<i>Pentacalia corymbosa</i>	7-O geranilescopoletina	Actividad antifúngica ³¹
<i>Pentacalia spp,</i>	Quinoles y cumarinas	Actividad antifúngica Cicatrizante ²⁰

1.8 Generalidades de las Cumarinas.

Las cumarinas constituyen un grupo importante de compuestos naturales; se les considera derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico, usualmente llamado cumarina.

La mayoría de las cumarinas conocidas, se encuentran libres en las plantas; pero se conocen glicósidos del psoraleno y otras cumarinas. Las más abundante es la umbeliferina. Las cumarinas se encuentran con frecuencia en los extractos de *leguminosas, Orchidaceae, Rutaceae* y *Umbeliferae*, y en cualquiera de los órganos vegetales, desde raíces hasta flores y frutos²⁶. Las cumarinas son sustancias fluorescentes, comúnmente fotosensibles. Hay muchas cumarinas con una o varias cadenas de isopreno, como la suberosina y colombianetina, o con un anillo de furano (furanocumarinas), también es común la o-metilación como la xantiletina, en la que se ha formado un anillo de cromano.

Pese a su abundancia en la naturaleza y a su diversidad estructural, su papel fisiológico sólo se conoce parcialmente. Se ha encontrado que pueden ser anticuagulantes como el dicumarol y la cumarina, espasmolíticas e hipercolesterémicas o inhibidoras del crecimiento vegetal²⁶.

1.8.1 Actividad Biológica de Cumarinas.

La relación entre las cumarinas y la fitopatología no es nueva, ha sido motivo de estudio desde la segunda mitad del siglo pasado y, en todo este tiempo, se ha acumulado un buen número de evidencias que permitieron reconocer la relación entre estos productos naturales con la resistencia a enfermedades e inmunidad en vegetales. Best⁵⁹ en 1944, fue el primero en descubrir y aislar un compuesto fluorescente (bajo la luz U.V) en plantas de tomate infectadas con un virus que les produce manchas y marchitamiento, sustancia que posteriormente se identificó como la Escopoletina. Unos años más tarde Andreae⁶¹ descubrió también la presencia de esta cumarina en tubérculos y hojas de plantas de papa infectadas con otro virus.

Se demostró que otros hongos fitopatógenos pueden también inducir la formación de cumarinas; estudios realizados por Uritani y Hoshiya⁶³ en los que infectaron plantas de papa con *Ceratosto mellafimbriata* que les produce pudrición negra, pudieron aislar e identificar Escopoletina y Umbeliferona. Fueron muchos los estudios posteriores encaminados a la identificación de cumarinas en los tejidos de plantas infectadas, en la tabla 4 se incluyen algunos de los resultados obtenidos.

Tabla 4. Cumarinas aisladas de tejidos vegetales infectados con hongos. Fuente: el Autor.

Compuesto Cumarínico	Hongo patógeno	Planta hospedera
Cumarina	<i>Piricularia oryzae</i>	Arroz
Umbeliferona	<i>Helicobasidium mompa</i>	Papa
Herniarina	<i>Septoria apii</i>	Apio
Bergapteno	<i>Sclerotinias clerotiorum</i>	Apio
Aesculetina	<i>Ceratosystis fimbriata</i>	Papa
Escopoletina	<i>Virus del mosaico del tabaco</i> <i>Helicobasidium mompa</i> <i>Phytophthorain festans</i> <i>Pseudomonas morsprunorum</i>	Tabaco Papa Papa Tabaco
Escopolina	<i>Ceratosys tisfimbriata</i>	Papa
Cumestrol	<i>Collectotri chiumtrifolii</i> <i>Phytophthora megasperma</i> <i>Pseudomonas glycinea</i> <i>Pseudomonas morsprunorum</i>	Alfalfa Soya Soya Frijol
Sativol	<i>Ascochyta imperfecta</i>	Alfalfa
Xanthotoxina	<i>Rhizoctoniasolani</i> <i>Sclerotinias clerotiorum</i>	Apio Apio
Trifoliol	<i>Pseudopeziza trifolii</i>	Trébol blanco

1.9 Generalidades de los Esteroles.

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (También llamados agliconas esteroides), como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5

En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroides: b-Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol. Un esteroide menos común es el Fucosterol, el cual es el esteroide principal de muchas algas pardas y también se le ha detectado en el coco (*Cocusnucifera*).²⁵

La gran mayoría de esteroides conocidos son sólidos cristalinos incoloros, solubles en solventes orgánicos relativamente apolares (Cloroformo, Benceno, etc.), menos solubles en alcoholes de bajo peso molecular, y que funden sin descomponerse (En forma libre o esterificada). Presentan además actividad óptica debido a los carbonos asimétricos que poseen. Los esteroides se pueden recrystalizar en metanol caliente o en la mezcla metanol-tetrahidrofurano 10:1, formando cristales en forma de agujas brillantes incoloras. Los que presentan dobles enlaces conjugados son de color amarillento y tienden a descomponerse por acción de la luz como por ejemplo los esteroides con insaturaciones en C-5 y C-7, los cuales son susceptibles a la reacción de oxidación fotoquímica⁴⁴.

Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoA (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol, mientras que los animales tienen al lanosterol.

Los esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares de muestras vegetales y animales mediante el ensayo de Liebermann-Burchard. Diversos estudios epidemiológicos a menudo demuestran una estrecha correlación en el consumo de dietas ricas en vegetales y frutas con la reducción de la incidencia de diversas enfermedades entre las que se pueden citar, el cáncer y otras enfermedades crónicas. La mayor parte de las investigaciones se han concentrado en los efectos protectores de sustancias con conocidos efectos beneficiosos sobre la salud, entre las que se encuentran el β -caroteno, tocoferoles, vitamina C y los fitoestrogenos.^{51,52} En general, se ha ignorado la importancia relativa de los fitosteroides, probablemente por los reconocidos efectos perjudiciales que presentan algunos tipos de grasas para la salud o quizás porque los fitosteroides se encuentran normalmente presentes en los aceites vegetales y en las frutas y vegetales pero en cantidades que generalmente

no son significativas como para manifestar sus efectos terapéuticos. Por ejemplo, para reducir entre un 8% y un 15% el colesterol sérico, se requieren dosis relativamente elevadas de fitosteroles (de 1,5 a 3 g diarios) ^{35,54}.

Aunque a la mayoría de los fitosteroles no se le conocen actividades biológicas específicas en la naturaleza, excepto como componentes de las membranas celulares, se han reportado diversas acciones al ser ingeridos en determinadas dosis, entre ellas, reducción del colesterol sérico ^{38,68}, inhibición del crecimiento en células de cáncer ^{41,55} antiinflamación ^{32,69}, antipirética ³², liberación de insulina ^{39,46}, e inmunomodulación ^{16,27}.

Investigadores de la Universidad de British Columbia, Canadá han desarrollado procesos de extracción de los fitosteroles a partir del *tall oil* o *licor negro* ^{41,42}, así como una tecnología para la conversión microbiológica de estos fitosteroles en androstendiona (AD) y androstadiendiona (ADD) ⁴³. Los precursores esteroidales así obtenidos, son empleados posteriormente en la síntesis química convencional de principios activos. En Cuba, en el centro Nacional de Investigaciones Científicas, se desarrolló un proceso de fermentación similar, partiendo de los fitosteroles obtenidos del aceite de cera de caña de azúcar para producir AD y ADD ³².

Los fitosteroles están siendo investigados como componentes anticancerosos de la dieta. De Stefani et al, en un estudio epidemiológico encontraron una relación directa entre la reducción del riesgo de padecer cáncer del estómago y la presencia de un elevado contenido de fitosteroles en la dieta. Se han podido comprobar sus efectos en el laboratorio, tanto in vitro (cultivo de líneas celulares) como en animales, sobre algunos de los tipos de cáncer de mayor recurrencia en la población, como el de colon ¹¹, próstata ¹², y mama ², con fuertes evidencias de la inhibición del crecimiento y la apoptosis de células tumorales, así como de la metástasis. Se reportó una reducción de hasta un 80 % del crecimiento y de hasta un 30% de metástasis, siendo el b-sitosterol el fitosterol de mayor efectividad. El mecanismo de acción contra el cáncer no se conoce, aunque existen varias hipótesis ³, Aún no se han reportado ensayos concluyentes de su eficacia en humanos.

Varios estudios preclínicos y clínicos realizados han demostrado que el b-sitosterol mejora algunos síntomas clínicos en el hombre en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna, tales como el volumen y frecuencia de la orina ⁶². Esta aplicación ha sido una de las más estudiadas usando los fitosteroles o sus derivados como nutracéuticos, sin profundizar en su mecanismo de acción. Los estudios en ensayos controlados en humanos, se han dirigido principalmente a

verificar los efectos en los pacientes aquejados de esta enfermedad al emplear formulaciones nutracéuticas que contienen fitosteroles.

Se encontró un efecto antiulceroso en úlcera inducida en ratas, producido por el extracto lipídico de la fruta de *M. azedarach* (nombre asiático de un árbol maderable, conocido con el nombre común de Paraíso), atribuido a la presencia de fitosteroles.³³ Este efecto también ha sido estudiado en otras fuentes⁵⁰, Se han encontrado evidencias del efecto inmunomodulador de los fitosteroles usando una mezcla de beta-sitosterol/sitosterolina^{12,13}, Se plantea que el mecanismo de acción posiblemente está relacionado con un efecto sobre el control de las citocinas inflamatorias. Esta modulación en la producción y actividad de citocinas, ayuda a controlar las alergias y ejerce efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades infecciosas y autoinmunes, entre otras.

Investigadores de la Universidad de Stellenbosch, en Sudáfrica, encontraron un efecto inmunomodulado de los fitosteroles al ser administrados a pacientes con VIH, en los que se produjo una respuesta positiva en la proliferación de las células TH1, responsables de la liberación de las citocinas IL2 e IFN-g, simultáneamente con una estabilización del conteo de linfocitos CD4. De esta forma, se detuvo el desarrollo de la enfermedad y se estabilizó el estado clínico de los sujetos tratados.^{10, 16, 57}

En otros ensayos clínicos de ese mismo grupo de investigación, al administrar b-sitosterol a un grupo de atletas bajo entrenamiento intenso, se encontró una disminución de la respuesta inflamatoria y de la supresión inmune que se produce después de esfuerzos físicos prolongados, reduciéndose la incidencia de enfermedades infecciosas oportunistas¹¹.

En el caso de pacientes con tuberculosis pulmonar a los que adicionalmente se les administró fitosteroles durante seis meses, se produjo un aumento de peso y recuentos más elevados de linfocitos y eosinófilos²⁷.

El efecto inmunomodulador encontrado en los fitosterol es amplía sus perspectivas de aplicación terapéutica. De igual forma, estos compuestos pueden resultar muy efectivos en el tratamiento de enfermedades infecciosas. En este caso, su acción no se ejerce directamente sobre los microorganismos causantes de ellas, sino que al regular el funcionamiento del sistema inmune, mejoran la capacidad del organismo para combatir las. Los estudios preclínicos y clínicos realizados hasta el momento han demostrado la ausencia de efectos adversos por la ingestión de fitosteroles, aunque aún se impone la necesidad de ensayos sobre sus efectos a largo plazo. Por todo lo anterior, el reto de encontrar nuevas aplicaciones, constituye un tema de creciente interés y actualidad para la comunidad científica internacional.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ensayos Preliminares

Los ensayos preliminares (análisis cromatográficos y pruebas químicas) se realizaron con el ánimo de identificar en cuál de las tres especies vegetales del género *Pentacalia* (*P. nítida*, *P. abietina* y *P. vaccinioides*) existe mayor probabilidad de encontrar esteroides y cumarinas. Además, estos resultados se comparan con la información que posee el grupo de investigación GIFUJ de otras especies del género *Pentacalia* (*P. corymbosa*, *P. tolimensis*, *P. pulchella*, *P. ledifolia*).

2.1.1 Análisis Cromatográficos

Se pesaron 50g de material vegetal de *Pentacalia nitida*, *Pentacalia abietina* y *Pentacalia vaccinioides* se prepararon los extractos éter de petróleo y etanólico con equipo Soxhlet se realizaron cromatografías de los extractos éter de petróleo y etanólico con diferentes mezclas de solventes buscando la presencia de los metabolitos de interés (ver figura 3).

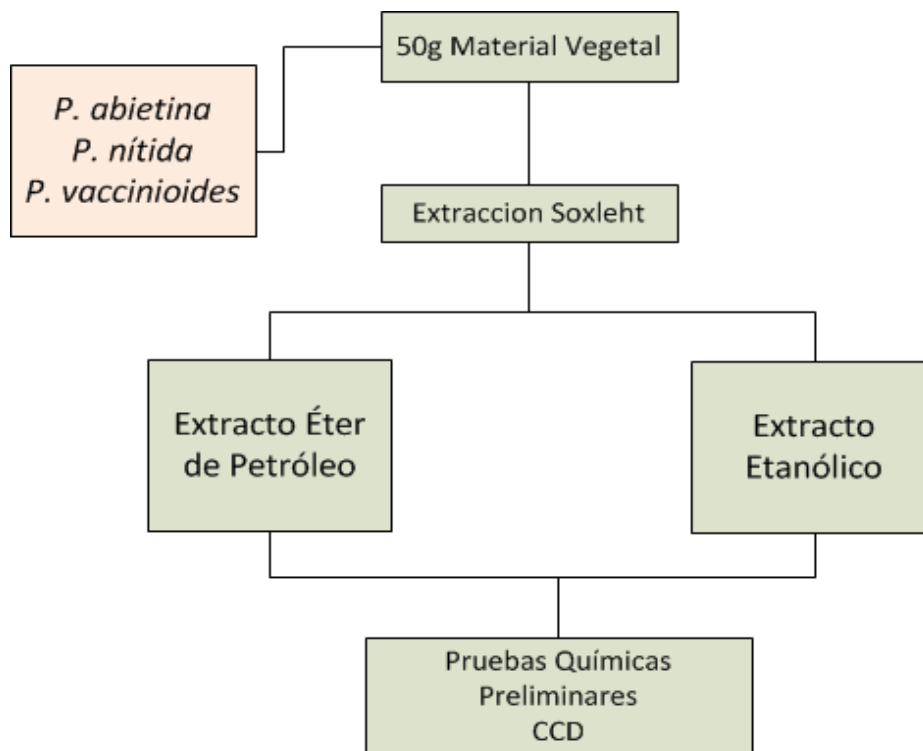


Figura 3. Diagrama general de la metodología desarrollada en los ensayos preliminares.

Fuente: el Autor.

2.1.2 Pruebas Químicas

Se siguió el protocolo establecido por la Universidad de Antioquia en el Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y Fitoquímica (ver figura 4 y 5) con el fin de detectar varias clases de sustancias vegetales como son los alcaloides, los flavonoides, las quinonas, las saponinas, los taninos, los compuestos fenólicos, los triterpenoides, los esteroides, los cardiotónicos y las leucoantocianinas, las que con mayor frecuencia se ha comprobado están relacionadas con actividades biológicas específicas, o se utilizan como materias primas para el desarrollo de productos farmacéuticos comerciales.⁴⁴

2.2 Preparación de los extractos

Las técnicas de extracción más comunes son las de maceración, extracción Soxhlet y reflujo, con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, etanol y acetato de etilo) y posterior concentración a presión reducida¹⁹. El extracto etanólico fue fraccionado líquido/líquido (FL/L) con éter de petróleo y Diclorometano (CH₂Cl₂).

2.3 Purificación

La purificación se efectuó mediante métodos cromatográficos, como cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía en capa preparativa (CCDP), cromatografía en columna (CC), cromatografía líquida de vacío (CLV). Las fracciones de baja polaridad se separan con Sílica gel 60 GF 254 (Kiesel gel Merck 0.2-0.060 mm).

2.3.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se usaron placas de Sílica gel para monitorear los extractos crudos y las fracciones obtenidas de las columnas. Permite monitorear y comprobar la pureza de los compuestos aislados además de identificar compuestos por medio de comparación con patrones de las sustancias de interés suministrados por el Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ). Se utilizaron diferentes mezclas de solventes como fase móvil los más frecuentes fueron:

Éter de Petróleo- Acetona (MeCO₂) (9:1), (8:2), (7:3)

Cloroformo- MeCO₂ (9:1)

Cloroformo-Metanol (9:1), (8:2)

Después de desarrolladas las placas fueron llevadas a secar a 50°C por 3 minutos y los compuestos fueron visualizados bajo la luz UV o usando un reactivo en spray, generalmente Vainillina en H₂SO₄ al 1%.

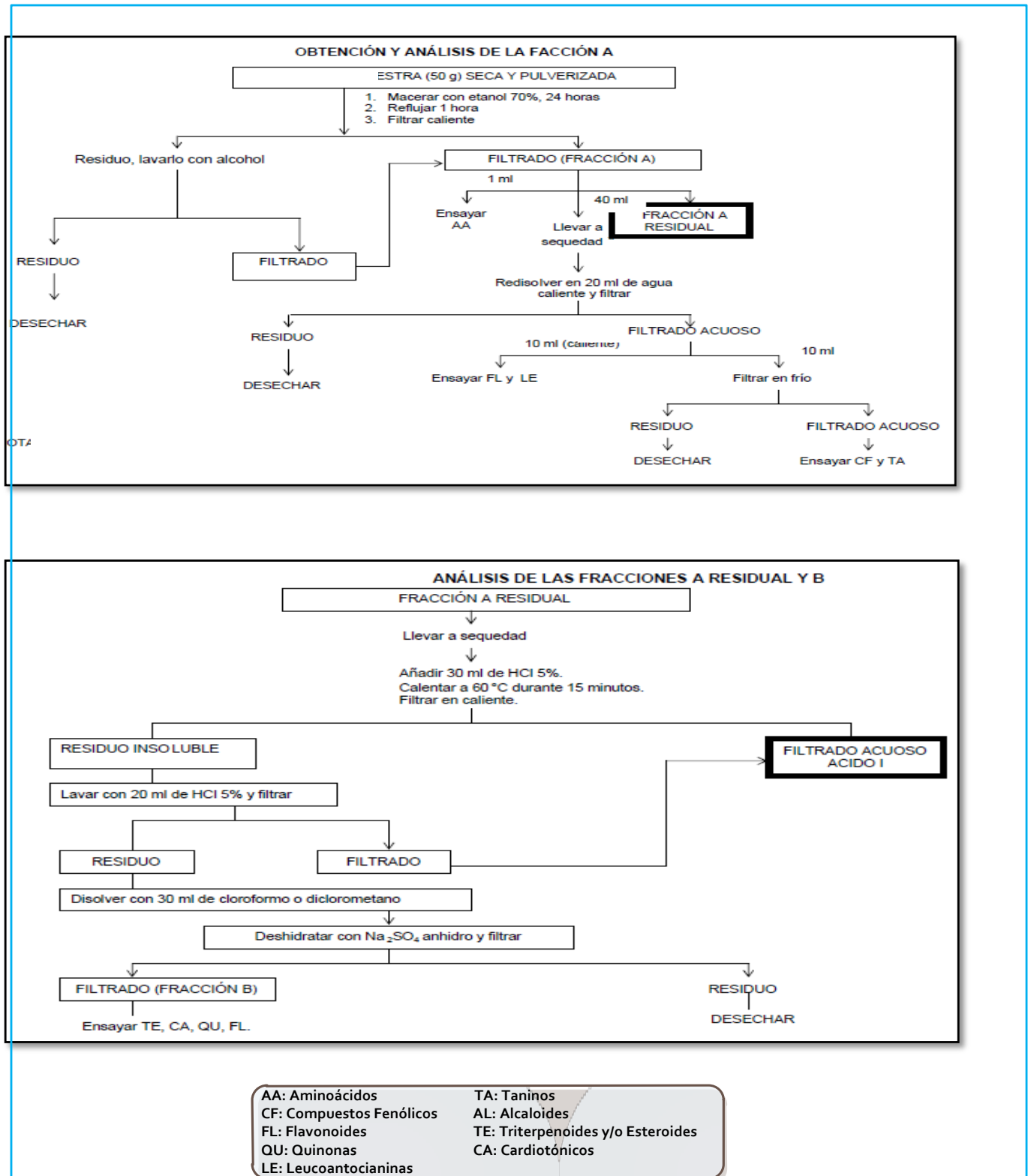
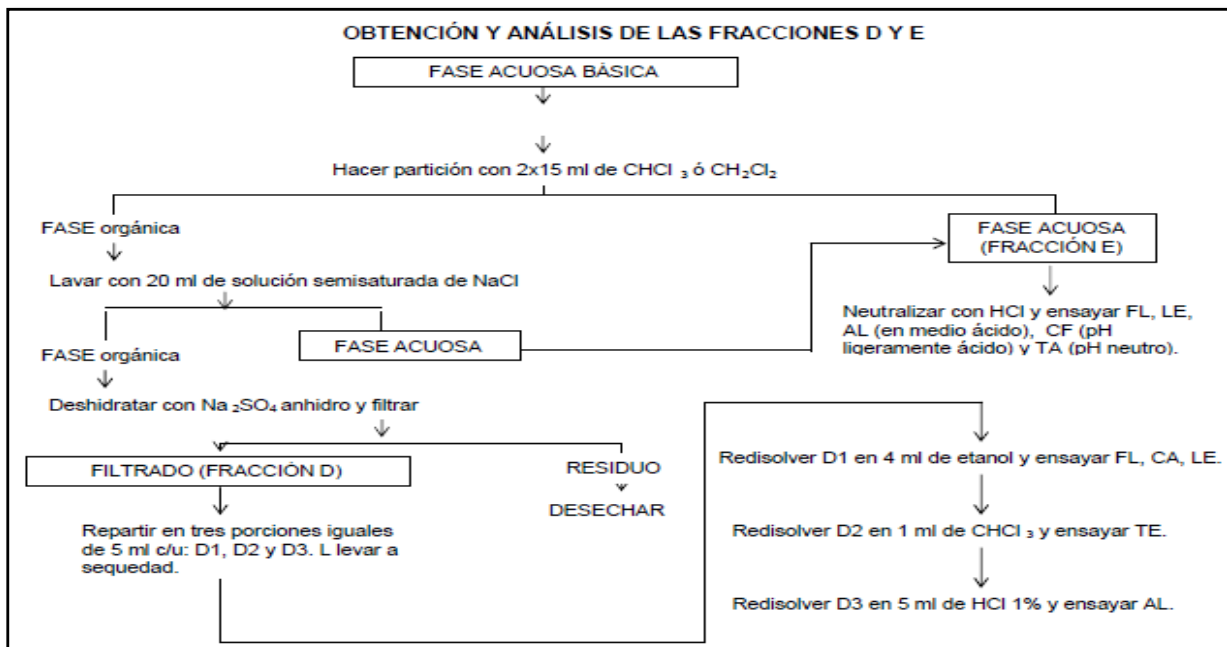
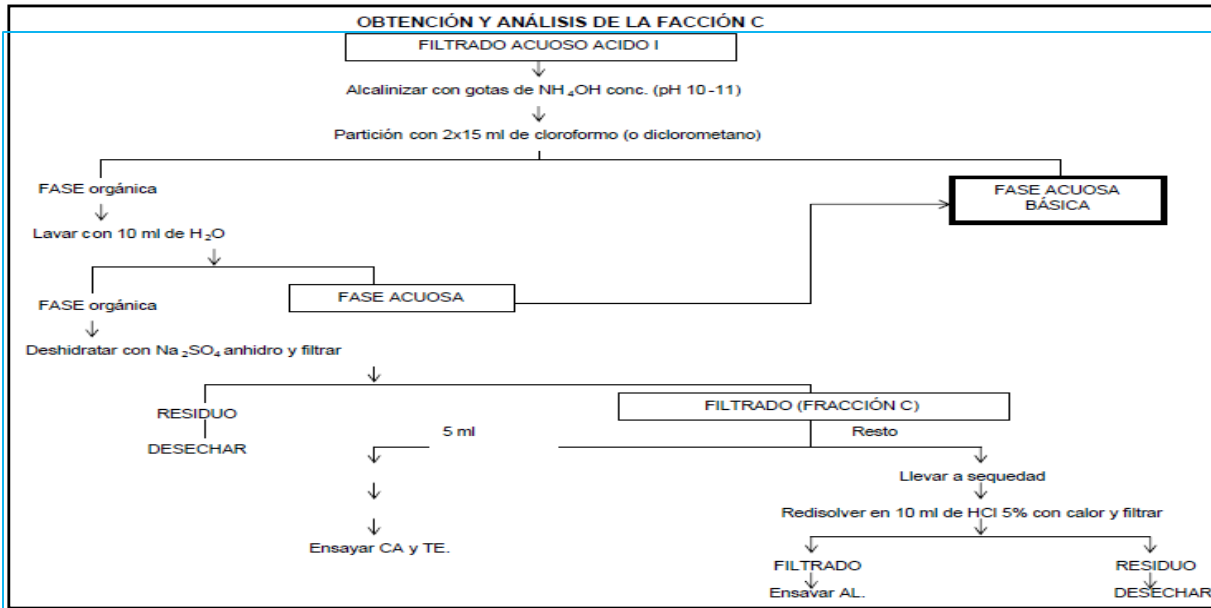


Figura 4. Metodología desarrollada en las pruebas preliminares⁴⁴.



AA: Aminoácidos	TA: Taninos
CF: Compuestos Fenólicos	AL: Alcaloides
FL: Flavonoides	TE: Triterpenoides y/o Esteroides
QU: Quinonas	CA: Cardiotónicos
LE: Leucoantocianinas	

Figura 5. Metodología desarrollada en las pruebas preliminares⁴⁴

2.3.2 Cromatografía en capa preparativa (CCDP)

Se utilizaron cromatoplasmas 20 x 20 de sílica gel 60 F₂₅₄, espesor de capa 1mm, con zona de concentración de 4cm x 20 cm para la separación y purificación final de los compuestos.

2.3.3 Cromatografía en columna (CC)

Se utilizó para separar compuestos de los extractos y fracciones obtenidas con columnas de vidrio empacada con gel de sílice 60 G tamaño de grano 0.063-0.200 mm. Se cargaron aproximadamente 30 mg de muestra por gramo de soporte y la muestra fue cargada por llenado mediante papilla³⁷. Las columnas fueron eluidas con diferentes mezclas de solventes.

2.4 Agentes de detección y visualización de compuestos

En las placas de CCD o CCDP con Sílica gel se utiliza luz UV de 254 nm (onda corta) y 366 nm (onda larga), que permite la detección de puntos o bandas de algunos compuestos fluorescentes. Algunas veces las placas se colocan en atmósfera de amoníaco (NH₃) y se observan luego a la luz UV; además se utilizan reactivos que se aplican en spray, que permiten visualizar o detectar los compuestos sobre placas de CCD o CCDP. En el caso de CCDP, el reactivo se roció solo en uno de los bordes de la placa, los reactivos más utilizados son unas soluciones de vainillina al 1% en H₂SO₄ concentrado, y CoCl₂ en H₂SO₄ 10%, que permite la detección de varios tipos de metabolitos como son los esteroides, terpenos, entre otros. Las placas cromatográficas se impregnan con el reactivo y luego se calientan para visualizar los puntos o bandas⁹.

2.5 Identificación

Las sustancias orgánicas se reconocen por identificación o deducción de su estructura. Algunos métodos de identificación se basan en la comparación de las propiedades físicas y espectroscópicas de las sustancias a identificar con los patrones que se encuentran en tablas o bases de datos digitalizadas. La técnica más utilizada es la comparación de espectros de masas.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es muy útil para identificar compuestos principalmente en mezclas. Con esta técnica, primero se separan los compuestos y para cada uno de ellos se obtienen espectros de masas que luego se comparan con una base de datos que contiene espectros patrones (NIST -05). El reconocimiento por deducción estructural utiliza principalmente la resonancia magnética nuclear protónica RMN-¹H y de carbono 13, RMN-¹³C, mediante lo cual se llega a deducir la fórmula estructural.

3. EXPERIMENTACIÓN

3.1 Pruebas químicas preliminares y análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos permiten establecer la presencia de cumarinas y sustancias esteroidales en mayor cantidad en la *Pentacalia vaccinioides* y a su vez identificar la presencia en los extractos con los que se va a trabajar y la metodología que se llevara a cabo.

La ejecución de la marcha fitoquímica preliminar se realizó en los dos extractos (éter de petróleo y etanol), se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la tabla 5, los resultados obtenidos se compararon con patrones de cada una de las pruebas.

Tabla 5. Resultados de los ensayos preliminares en extractos totales de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. Fuente: el Autor.

FRACCIÓN A								
<i>Pentacalia vaccinioides</i>					ACUOSO			
	AA	CF	TA	FL	FL	LE	TA	CF
	-	+	+	+/-	-	+	+	+

FRACCIÓN B				
<i>Pentacalia vaccinioides</i>	TE	FA	CA	QU
	+	-	-	-

FRACCIÓN C				
<i>Pentacalia vaccinioides</i>	CA	TE	AL/Mayer	AL/Dragendorff
	-	+/-	-	-

FRACCIÓN D ₁			FRACCIÓN D ₂		FRACCIÓN D ₃		
<i>Pentacalia vaccinioides</i>	FL	CA	LE	<i>Pentacalia Vaccinioides</i>	TE	<i>Pentacalia Vaccinioides</i>	AL
	-	-	+/-	<i>Pentacalia Vaccinioides</i>	-	<i>Pentacalia Vaccinioides</i>	-

FRACCIÓN E				
<i>Pentacalia vaccinioides</i>	FL	LE	AL/Dragendorff	CF
	+	+	-	+

(+)	Resultado positivo	(-)	Resultado negativo	(+/-)	Resultado dudoso
-----	--------------------	-----	--------------------	-------	------------------

3.2 Metodología General

La metodología desarrollada en este trabajo incluye varias etapas. Recolección del material vegetal para su posterior identificación, luego se separaron las hojas de flores y tallos para trabajar solo con las hojas, se secó el material y se trituro, posteriormente se procedió a obtener los extractos y fracciones de diferente polaridad con diversos métodos cromatograficos, realizando un monitoreo con pruebas preliminares y CCD en extractos y fracciones, finalmente se identificaron los compuestos aislados por diferentes técnicas como RMN ^1H , RMN ^{13}C y CG-EM. Este procedimiento se resume en la figura 6.

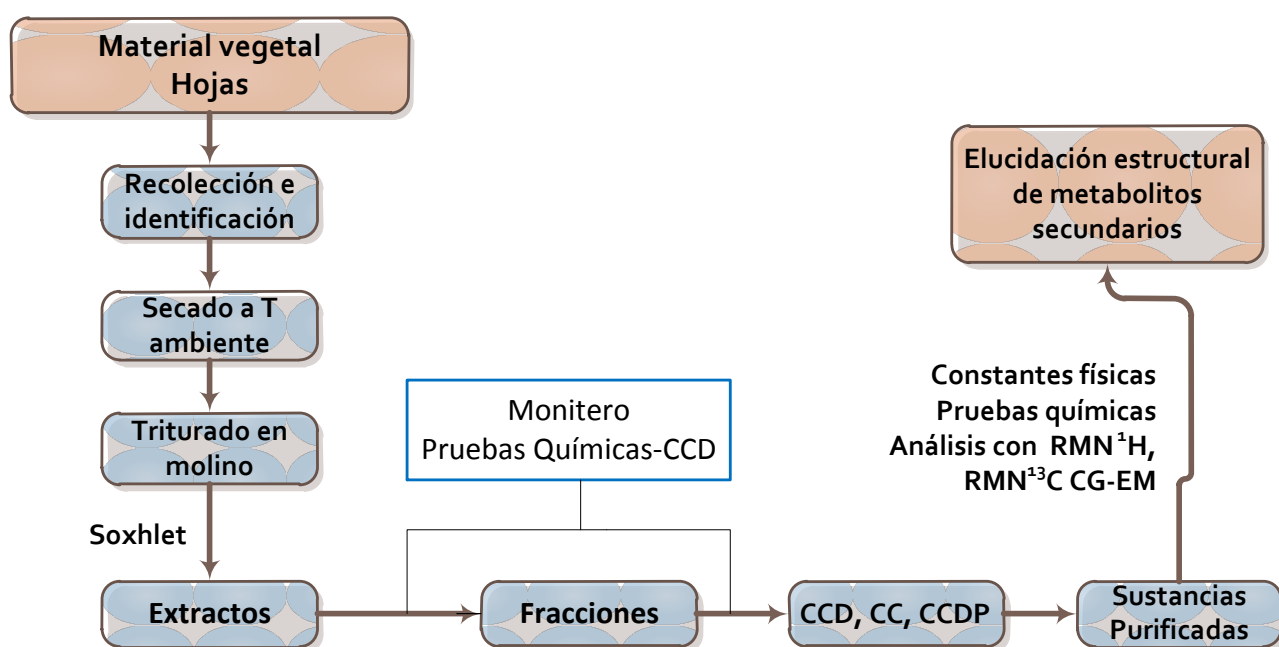


Figura 6. Diagrama general de la metodología desarrollada.

Fuente: el Autor

3.3 Material Vegetal

El material vegetal (hojas) de la especie *Pentacalia vaccinioides* fue colectado el 7 de febrero del 2009 en el páramo de Cruz Verde. Este páramo se encuentra en el kilómetro 10 al sureste de Bogotá (carretera que de ésta conduce al municipio de Choachí, Cundinamarca), a 3.300-3.500 m.s.n.m (4°, 45' latitud N y 74° longitud W). Posee temperatura media de 8,4°C y una precipitación de 1.200 mm/año. Un espécimen reposa en el Herbario Nacional Colombiano con el COL 531037.

3.4 Obtención de extractos y fracciones

3.4.1 Preparación del extracto en éter de petróleo

El material vegetal se dejó secar a la sombra se separaron las hojas de flores y tallos, para posteriormente someter solo las hojas a un proceso de molienda y pesada, obteniéndose 670 g de material molido. Se realizó una extracción con equipo soxhlet, con éter de petróleo durante 72 horas al cabo de los cuales el extracto se concentró a presión reducida en un equipo Buchi RE 111 a una temperatura máxima de 40°C y hasta un volumen mínimo; el extracto obtenido (120 mL) se floclula con 300 mL de Me₂CO (Acetona) y se refrigeró por una noche. El floculo 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 secado al ambiente (figura 7). Este extracto se rotulo como **1p**.

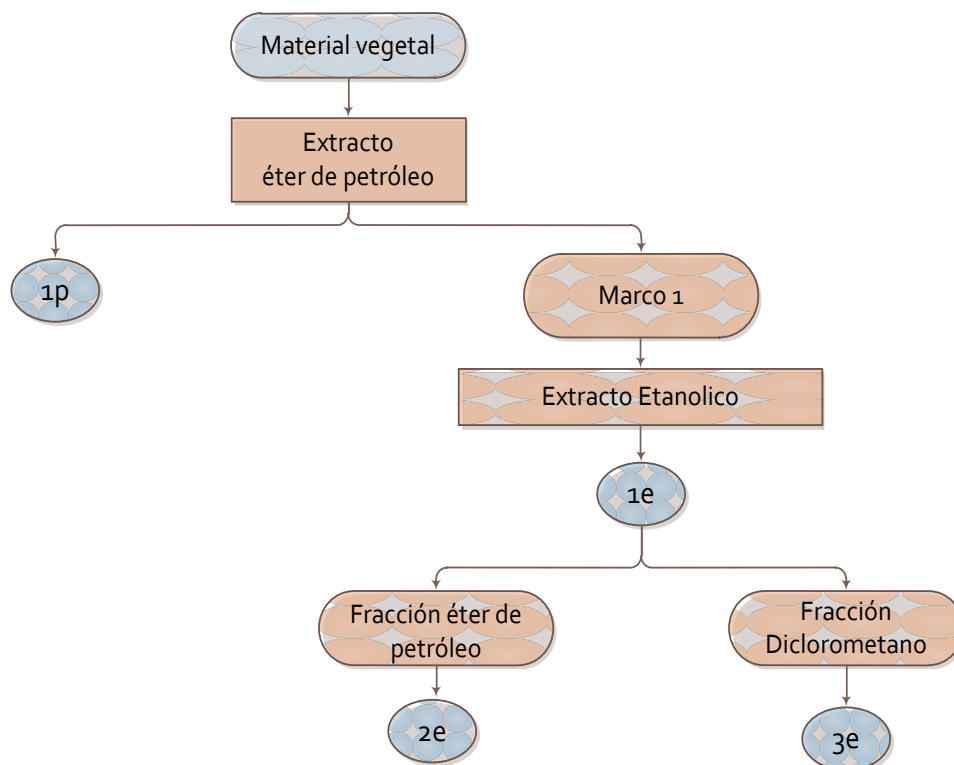


Figura 7. Diagrama general preparación de extractos y fracciones de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. Fuente: el Autor

3.4.2 Preparación del extracto etanólico

El material desengrasado (Marco 1) se le realizó una extracción con equipo soxhlet, con EtOH durante 72 horas al cabo de los cuales el extracto se concentró a presión reducida en un equipo Buchi RE 111 a una temperatura máxima de 40°C y hasta un volumen mínimo; el extracto obtenido (100 mL) se floclula con 100 mL de agua destilada (para remover sustancias grasas) y se refrigeraron por una noche. El floculo producido fue removido por filtración al vacío y el filtrado resultante, se concentró a presión reducida en el evaporador rotatorio y secado al ambiente. Este extracto se rotulo como **1e**.

El filtrado 1e fue fraccionado mediante extracción continua liquido/liquido primero con éter de petróleo (identificada como **2e**) y luego con Diclorometano CH_2Cl_2 (identificada como **3e**) (figura 7). Estas fracciones fueron concentradas al vacío en un evaporador rotatorio y secadas al ambiente.

3.4.3 Preparación del extracto acetato de etilo

De acuerdo a los resultados de las pruebas químicas preliminares y el análisis cromatográfico en este extracto no se encuentran las sustancias de interés (cumarinas y esteroides), por lo tanto no se realizó este extracto.

3.5 Aislamiento de metabolitos secundarios.

Los extractos y fracciones se separaron por diferentes técnicas cromatograficas. Extracto éter de petróleo (**1p**) se prepara una papilla con 3g de muestra que posteriormente fue cromatografiada en una columna, (6 cm de diámetro por 40cm de alto) con Sílica Gel (Kiesel gel Merck 0.2-0.060 mm). La elución se realizó con mezclas de polaridad creciente empezando con éter de petróleo, mezclas éter de petróleo: Me_2CO (9,5-0,5) de polaridad creciente hasta (6-4) y EtOH puro. Se recolectaron 57 fracciones de 50 mL, las cuales se monitorearon con CCD se revelaron con luz U.V onda corta y larga y Vainillina/ H_2SO_4 y se agruparon las que tenían composición similar en 13 grupos marcados como 1Pv-13Pv.

Del grupo denominado como 11Pv utilizando una columna con Sílica gel 60 H y eluida con éter de petróleo, se obtuvo un sólido blanco con peso 18,3 mg que fue purificado mediante CCDP y su pureza fue seguida mediante CCD el cual se denominó como **Pv-1**. Del grupo denominado como 10Pv y 11Pv utilizando una columna con Sílica ge 60H y eluida con éter de petróleo: Me_2CO (8:2), se obtuvo un sólido amarillo con peso de 6,8 mg que fue purificado mediante CCDP y su pureza fue seguida mediante CCD el cual se denominó como **Pv-2**. Del grupo denominado como 4Pv fue purificado un sólido amarillo por columna utilizando

Sílica gel 60H y eluida con éter de petróleo: Me₂CO (7,5:2,5) y su pureza fue seguida mediante CCD con peso 7,1 mg que se denominó como **Pv-3**. El grupo denominado como 3Pv fue purificado por cromatografía en columna utilizando Sílica gel 60H y eluida con éter de petróleo: Me₂CO (6,5:3,5) y su pureza fue seguida mediante CCD, se obtuvo un sólido blanco con peso 7,5 mg al que se denominó **Pv-4**. (Ver Figura 8).

Se calcularon los valores de R_f sobre CCD en gel de sílice y se observó comportamiento ante reveladores como Vainillina/H₂SO₄; Luz U.V. onda corta.

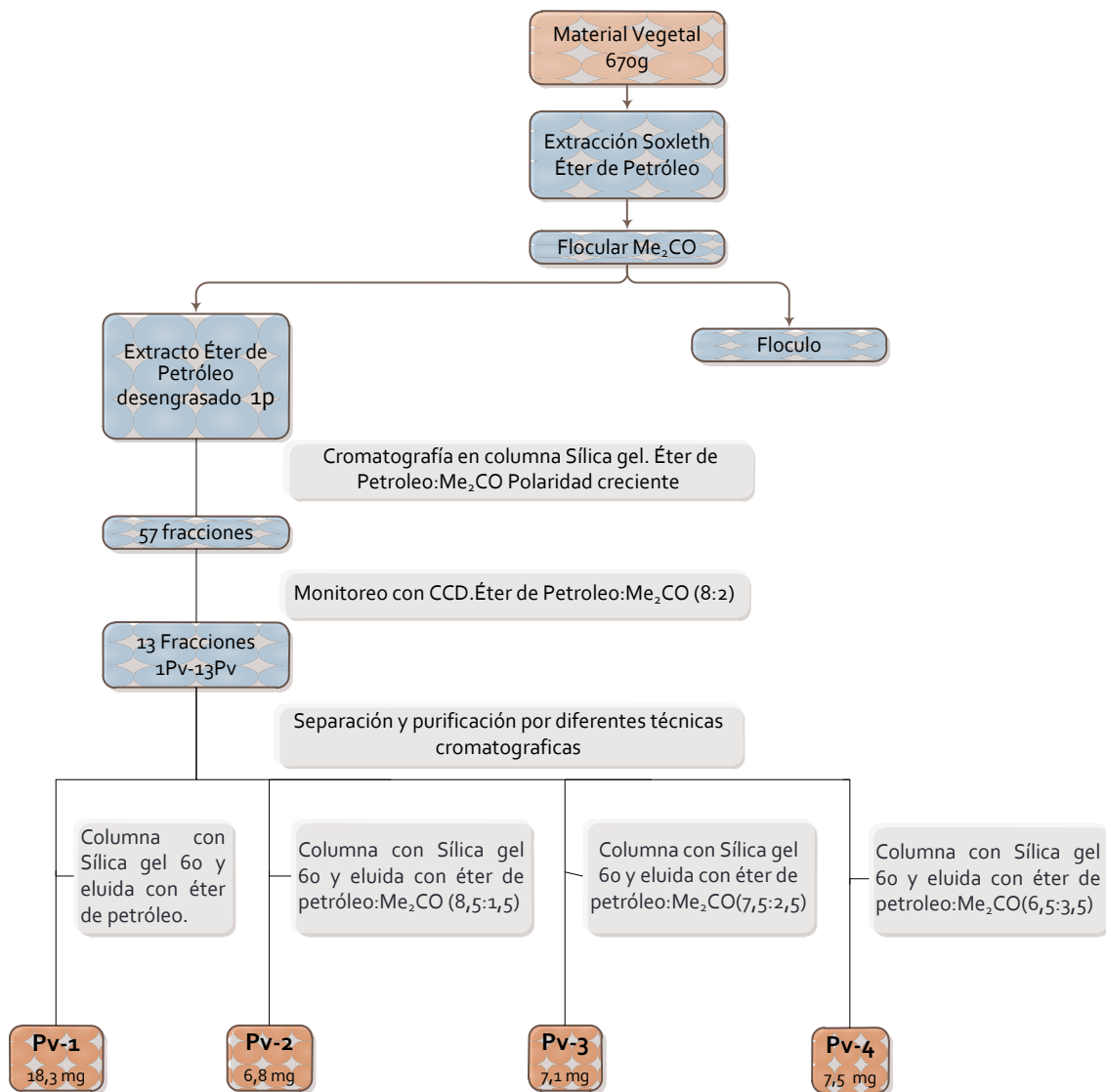


Figura 8. Diagrama de obtención de metabolitos secundarios a partir del extracto éter de petróleo de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. Fuente: el Autor.

El extracto etanólico (**1e**) fue sometido a un fraccionamiento FL/L con éter de petróleo (**2e**) y CH₂Cl₂ (**3e**), seguido de una floculación con 100 mL de H₂O (para remover sustancias de baja polaridad).

A la fracción éter de petróleo del extracto petrol se le realizó una CCD con fase móvil éter de petróleo-Me₂CO (8:2) con el objetivo de verificar la presencia de sustancias poco polares aun presentes, se revelaron con luz U.V onda corta y larga y Vainillina/H₂SO₄.

La fracción CH₂Cl₂ del extracto etanólico se sometió a una separación en columna, (6 cm de diámetro por 40cm de alto) con fase estacionaria Sílica Gel (KieselgelMerck0.2-0.060 mm). La elución se realizó con éter de petróleo, diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etilo (AcOEt), etanol (EtOH). Se recolectaron 20 fracciones de 50 mL, las cuales se monitorearon con CCD con fase móvil CH₂Cl₂-MeOH (9:1), se revelaron con luz U.V onda corta y larga y Vainillina/H₂SO₄ y se agruparon las que tenían composición similar en 5 grupos marcados como 1'Pv-5'Pv.

Del grupo denominado como 2'Pv se obtuvo un sólido amarillo (5,6mg) denominado **Pv5**, utilizando Sílica gel 60H y eluida con éter de petróleo:Me₂CO (8,5:1,5) y su pureza fue seguida mediante CCD (Ver Figura 9).

Se calcularon los valores de Rf sobre CCD en gel de sílice y se observó comportamiento ante reveladores como Vainillina/H₂SO₄; Luz U.V. onda corta.

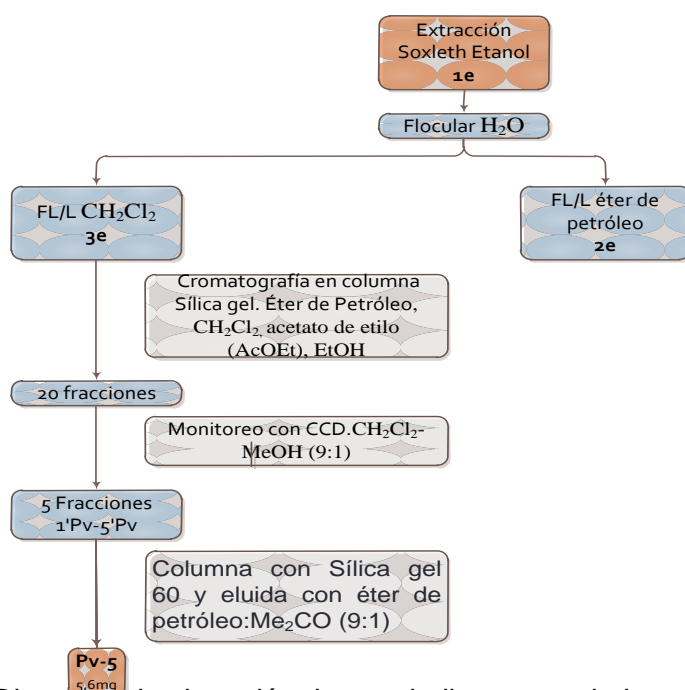


Figura 9. Diagrama de obtención de metabolitos secundarios a partir del extracto etanólico de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. Fuente: el Autor.

3.6 Identificación de metabolitos secundarios.

En la identificación de las sustancias aisladas se utilizaron los siguientes equipos.

Fusiómetro

Los puntos de fusión (pf) se determinan en un fusiómetro MEL-TEMP, laboratory Devices. Mass 02139. Las temperaturas medidas fueron expresadas en °C.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica RMN-¹H y de carbono 13 RMN-¹³C, fueron tomados en un instrumento Bruker AM 400 de 400 Mega Hertz, en la Universidad Nacional de Colombia.

Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Los espectros de masas fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases AGILENT TECHNOLOGIES GC 6850 II acoplado a un detector de masas AGILENT TECHNOLOGIES MS 5975B en la Pontificia Universidad Javeriana.

4. RESULTADOS

4.1 Porcentajes de rendimiento

Después de obtener los extractos se tomó el peso seco de cada extracto (PS), se calculó su porcentaje en peso seco (%PS), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%PS = (PS / \text{Peso total del material vegetal}) * 100$$

Los resultados de los porcentajes en peso seco de los extractos se muestran a continuación.

Tabla 6. Cantidades y porcentajes en peso seco de los extractos obtenidos de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. Fuente: el Autor

Material vegetal	Extracto	PS (g)	% PS
670g	Éter de Petróleo	39,2572	5,8543
	EtOH	26,0385	3,8947

Después de realizar el fraccionamiento líquido/ líquido (FL/L) al extracto etanólico, se obtuvieron dos fracciones, la fracción éter de petróleo y CH₂Cl₂, se tomó su peso seco (PF) y se determinó su porcentaje respecto al extracto total (%PET).

Los resultados de los porcentajes en peso seco de las fracciones en los extractos se muestran a continuación:

Tabla 7. Cantidades y porcentajes respecto a extractos de diferente polaridad obtenidas *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. Fuente: el Autor.

Material vegetal	Extracto	Fracción	PF (g)	(%PET)
670g	EtOH	Éter de Petróleo	5,6897	21,7808
		CH ₂ Cl ₂	12,7436	48,9352

Para cada una de los sólidos obtenidos (Pv:1; Pv:2; Pv:3; Pv:4; Pv:5) se tomó su peso seco (PSo) y se determinó su porcentaje respecto al extracto total (%PSo) se tiene en cuenta que para la obtención experimental de PSo se utilizaron 3g de PS en la separación por CC

Tabla 8. Cantidades y porcentajes se sustancias obtenidas respecto a extractos y fracciones de diferente polaridad obtenidas *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. Fuente: el Autor.

Material vegetal	Extracto	PS (g)	Fracción	PF (g)	PSo (mg)	% PSo
670g	Éter de Petróleo	39,2572	-----	-----	Pv-1: 18,3	0,6108
					Pv-2 :6,8	0,2245
					Pv-3: 7,1	0,2490
					Pv-4: 7,5	0,2512
	EtOH	26,0385	Éter	5,6742	-----	-----
					CH ₂ Cl ₂	12,7478

4.2 Purificación de metabolitos secundarios.

A partir del extracto éter de petróleo por medio de técnicas cromatográficas, se obtuvieron 4 sustancias, del mismo modo se obtuvo una sustancia de la fracción acetato de etilo del extracto etanólico. Las fracciones fueron rotuladas como Pv-1 hasta Pv-5 en orden de obtención.

4.2.1 Compuesto Pv-1

El compuesto **Pv-1** es un sólido blanco con peso 18,3mg el cual presento un p.f de 68°C, el cual coincide con el reportado en la literatura para la 2H-1-Benzopiran-2-ona (Cumarina), (p.f lit. 67°C)^{18,36} tiene fluorescencia celeste bajo la luz U.V de onda larga, un Rf de 0,75 en placas de Sílica gel corridas con CHCl₃-MeOH 9,5:0,5. Se obtuvo a partir del extracto petrol, utilizando una columna con Sílica gel 60H y eluida con éter de petróleo y su pureza fue seguida mediante CCD. (Figura 10)



Figura 10. Cromatograma de **Pv-1**. Fase estacionaria Sílica gel. CHCl₃-MeOH (9,5:0,5). Observada bajo la luz U.V de onda larga. Fuente: el Autor

El análisis se llevó a cabo por CG-MS en un equipo *Agilent* 6850 serie II, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975B, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (260°C, relación de *split* 15:1), y un inyector automático *Agilent* 6850 series. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida TR-50MS de 30 m x 0,25 mm (d.i) x 0,25 µm (d.f.), con fase estacionaria 50% fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80°C (1 min), luego se incrementó hasta 310°C (2min) a 10°C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía 70 eV, las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia

fueron de 230 y 285°C respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1mL/min. Los espectros de masa y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4,75 *scan s*-1 en el rango de masas *m/z* 20-300 *uma*.

El reconocimiento de los compuestos presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos NIST-05. EL cromatograma obtenido (ver figura 11) indica que este solido es el 2H-1-Benzopiren-2-ona (Cumarina), con un tiempo de retención de 13,118 min, Ion molecular [M^{+}] *m/z* 146 de alta intensidad (70%), el pico base *m/z* 118 (100%) característico de este compuesto, se observa un pico de mediana intensidad *m/z* 90 (40%) y el resto de picos de baja intensidad. El cromatograma se encuentra en la figura 11, y el espectro de masas se encuentra en la figura 12.

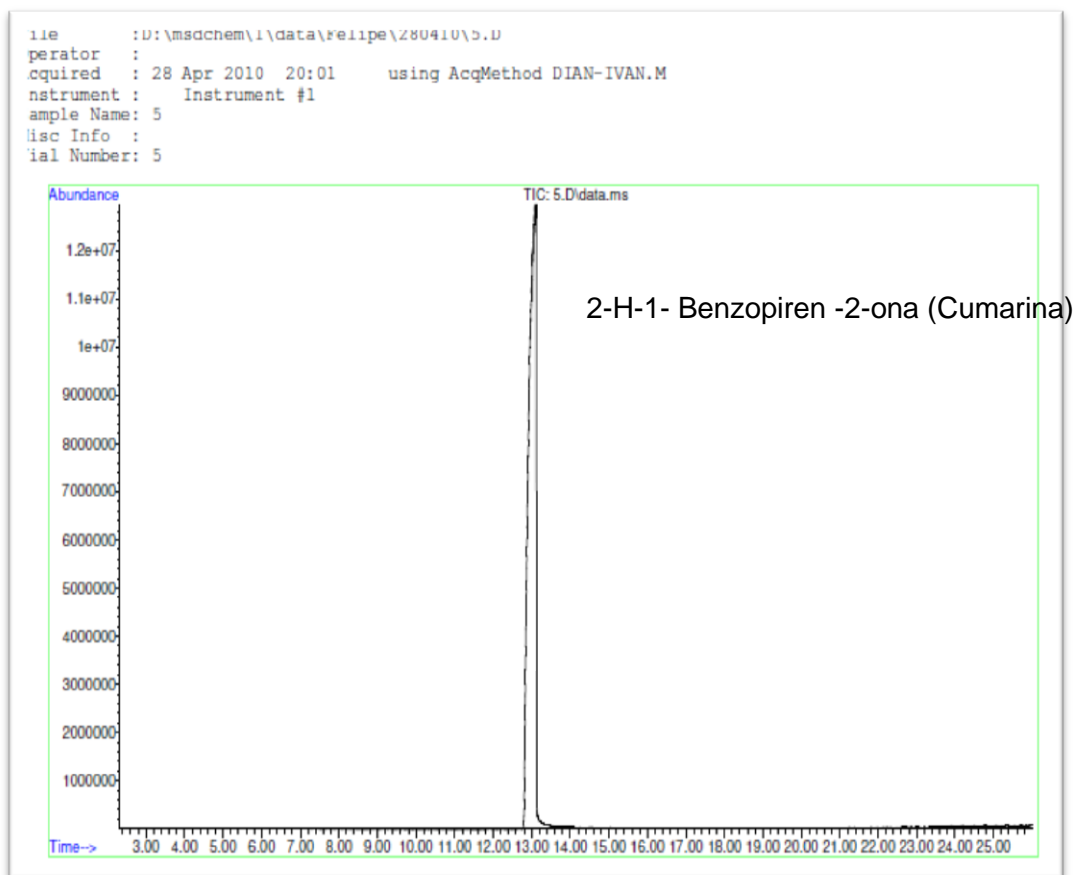


Figura 11. Cromatograma de la sustancia **Pv-1**.

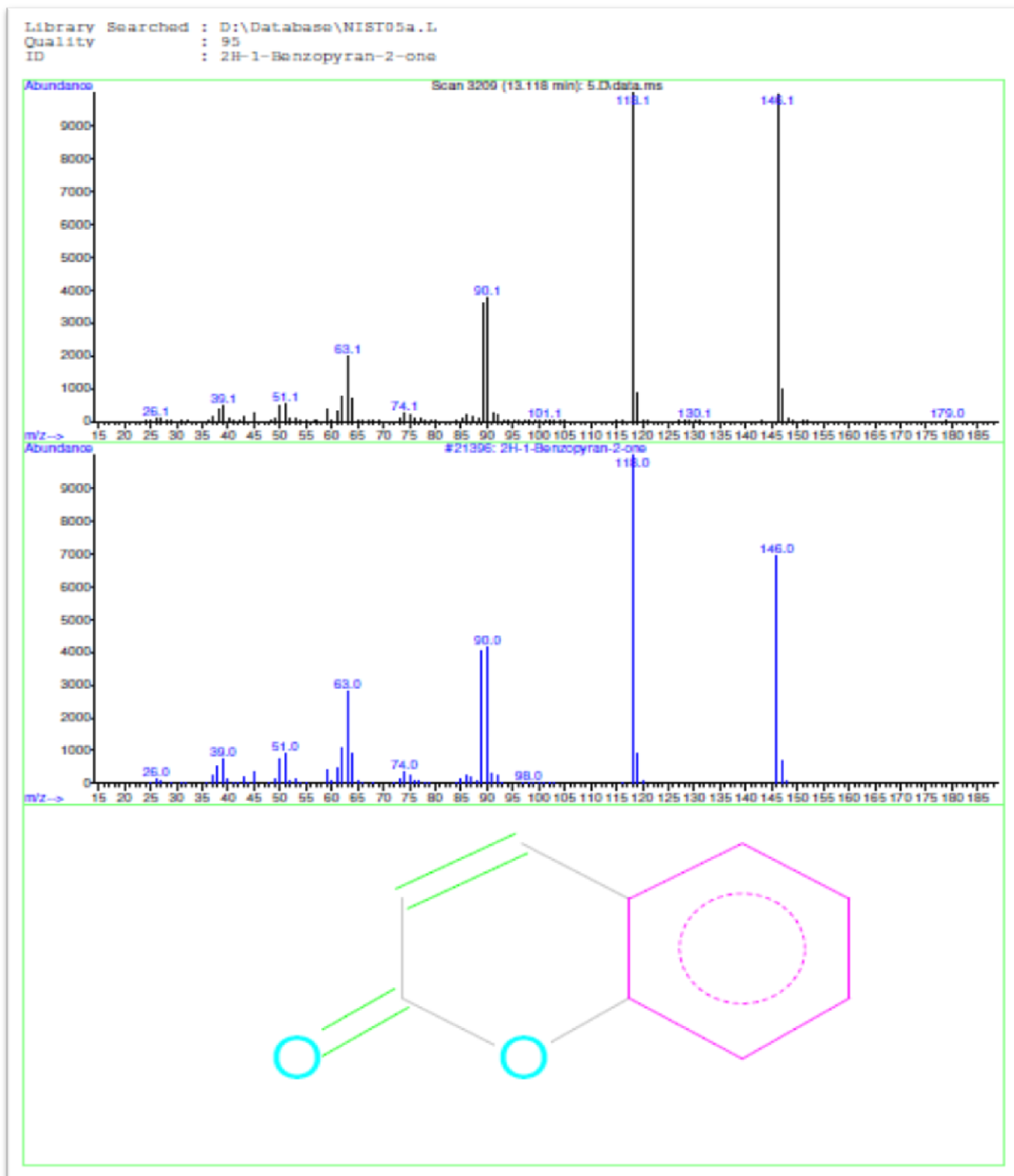
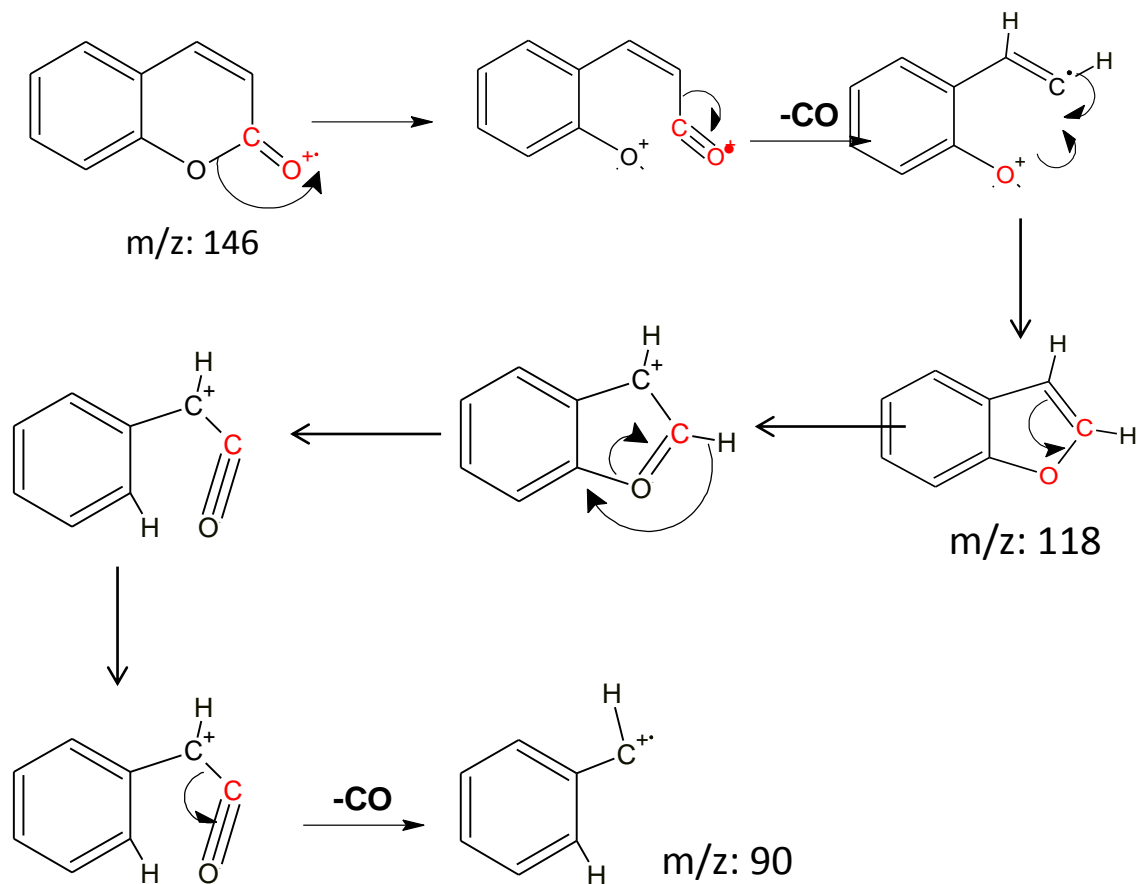


Figura 12. Espectro de masas de la 2-H-1- Benzopiren -2-ona (Cumarina). **Pv-1.**



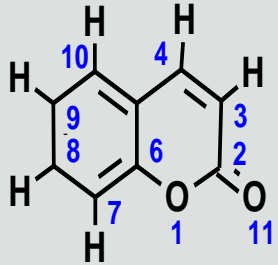
Baez J; Espectrometría de masas de cumarinas (estudio químico de cuatro plantas canarias). 1997⁸

Figura 13. Esquema de fragmentación de la Cumarina.

En el espectro de masas de la figura 12, se observa el ión molecular m/z 146 que corresponde con la fórmula $C_9H_6O_2$. El fragmento m/z 118 indica la pérdida de un grupo carbonilo (a partir del ión molecular), el fragmento a m/z 90 indica la pérdida de un grupo carbonilo, el fragmento a m/z 89 indica la pérdida de un radical H^\bullet (figura 13).

Con el ánimo de corroborar la identidad de la sustancia se realizó un análisis de la sustancia por Resonancia Magnética Nuclear, tomando el siguiente espectro de H^1 , (RMN- H^1) (figura 14), en el que se pueden ver las señales referenciadas en la tabla 9.

Tabla 9. Desplazamientos δ (ppm) del espectro de RMN H^1 disuelta en CD_3Cl a 400 MHz dl compuesto **Pv-1**. Fuente: el Autor.

Hidrógeno	δ (ppm)	Multiplicidad	J(Hz)	Estructura
3	6,45	d	9,5	
4	7,73	d	9,5	
10	7,52	d	7,84; 1,71; 0,53	
7	7,35	d	8,12; 1,45; 0,53	
8	7,56	t	8,12; 7,68; 1,71	
9	7,31	t	7,84; 7,68; 1,45	

El compuesto **Pv-1** fue identificado como 2-H-1- Benzopiran -2-ona (Cumarina); **RMN- H^1** (400 MHz, CD_3Cl , δ): 6,45 (1H, d, $J=9,5$ Hz), 7,73 (1H, d, $J=9,5$ Hz), 7,52 (1H, d, $J_1=7,84$ Hz; $J_2=1,71$ Hz; $J_3=0,53$ Hz), 7,35 (1H, d, $J_1=8,12$ Hz; $J_2=1,45$ Hz; $J_3=0,53$ Hz), 7,56 (1H, t, $J_1=8,12$ Hz; $J_1=7,68$ Hz; $J_2=1,71$ Hz), 7,31 (1H, t, $J_1=7,84$ Hz; $J_1=7,68$ Hz; $J_2=1,45$ Hz).

Para poder ver mejor estas señales se realiza una ampliación del espectro del compuesto **Pv-1** (figura 15) se muestran dos señales de hidrógenos olefinicos que están acoplando entre sí, debido a que cada uno se muestra como un doblete bien definido y con el mismo valor de constante de acoplamiento $\delta:6,45$ (1H, d, $J=9,5$ Hz), $\delta:7,73$ (1H, d, $J=9,5$ Hz) asignadas estas señales para el hidrogeno numerado como 3 y 4 respectivamente. Se observan también dos dobletes correspondientes a hidrógenos aromáticos, para el hidrógeno numerado como 10; $\delta:7,52$ (1H, d, $J_1=7,84$ Hz; $J_2=1,71$ Hz; $J_3=0,53$ Hz) y para el hidrógeno numerado como 7; $\delta:7,35$ (1H, d, $J_1=8,12$ Hz; $J_2=1,45$ Hz; $J_3=0,53$ Hz), los cuales muestran tres constantes de acoplamiento, la primera (J_1) es para hidrógenos en posición orto, la segunda (J_2) para hidrógenos en posición meta y la tercera (J_3) para hidrógenos en posición para. Estas dos señales muestran el mismo valor de la constante de acoplamiento $J_3=0,53$ Hz por lo que estas señales son atribuibles a dos protones en posición meta sobre un anillo aromático. Además, se ven dos tripletes correspondientes a hidrógenos aromáticos, para el hidrógeno numerado como 8; $\delta:7,56$ (1H, t, $J_1=8,12$ Hz; $J_1=7,68$ Hz; $J_2=1,71$ Hz) y para el hidrógeno numerado como 9; $\delta:7,31$ (1H, t, $J_1=7,84$ Hz; $J_1=7,68$ Hz; $J_2=1,45$ Hz) los cuales

muestran tres constantes de acoplamiento, la primera (J_1) es para hidrógenos en posición orto, la segunda (J_1') también para hidrógenos en posición orto y la tercera (J_2) para hidrógenos en posición meta.

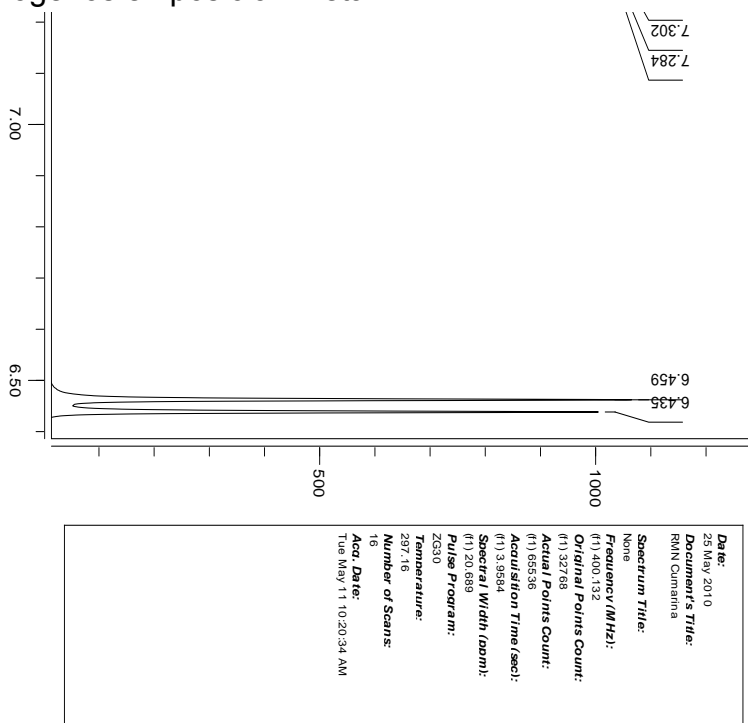


Figura 14. Espectro RMN H^1 de la sustancia **Pv-1**, disuelta en CD_3Cl a 400 MHz.

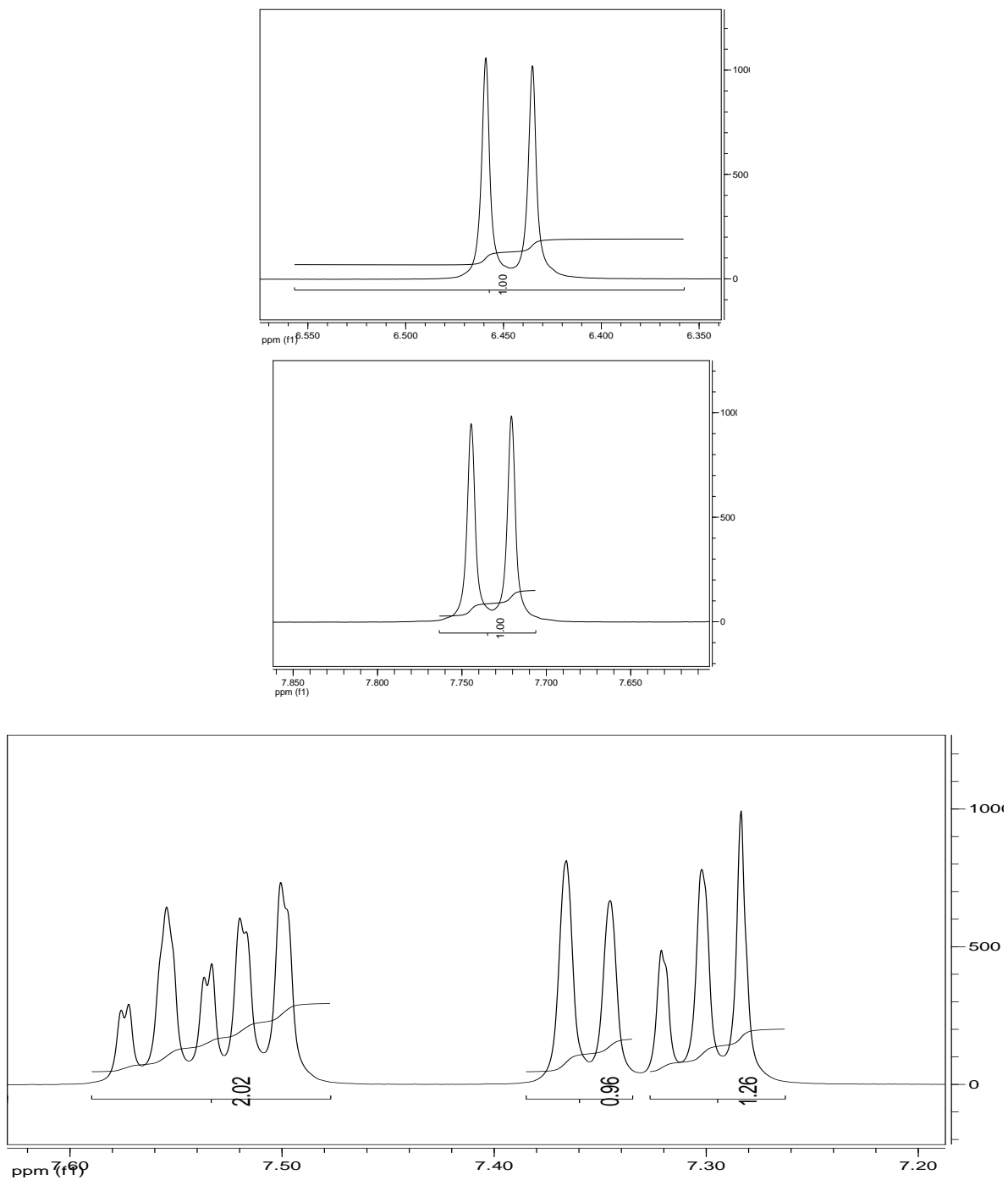


Figura 15. Ampliación del espectro RMN H^1 de la sustancia **Pv-1**, disuelta en CD_3Cl a 400 MHz.

estas dos señales muestran el mismo valor de la constante de acoplamiento $J_1=7,68$ Hz por lo que estas señales son atribuibles a dos protones en posición *orto* sobre un anillo aromático.

Se confirman picos y desplazamientos del espectro RMN H^1 de la sustancia **Pv-1**, disuelta en CD_3Cl a 400 MHz con artículos encontrados en la literatura mostrando completa concordancia con los datos obtenidos por Valdir A. Facundo; Amanda L⁶⁷ y Danielle S. Pinto; Anna Cláudia de A⁷¹.

4.2.2 Compuesto Pv-2

El compuesto **Pv-2** es un sólido amarillo claro con peso 6,8 mg el cual presentó un p.f de 203°C, el cual coincide con el reportado en la literatura (p.f lit. 204°C)^{18,36} para la 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopirán-2-ona (Escopoletina) presenta fluorescencia celeste bajo la luz U.V de onda larga, un Rf de 0,70 en placas de Sílica gel corridas con $CHCl_3$ -MeOH 10:1.

Se obtuvo a partir del extracto petrol, utilizando una columna con Sílica gel 60H y eluida con petrol:Me₂CO (8,5:1,5) y su pureza fue seguida mediante CCD. (Ver Figura 16)

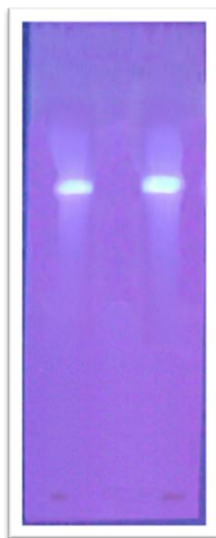


Figura 16. Cromatograma de **Pv-2**. Fase estacionaria Sílica gel. $CHCl_3$ -Me₂CO (10:1). Observada bajo la luz U.V de onda larga. Fuente: el Autor.

El análisis se llevó a cabo por CG-MS en un equipo *Agilent* 6850 serie II, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975B, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (260°C, relación de *split* 15:1), y un inyector automático *Agilent* 6850 series. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida TR-50MS de 30 m x 0,25 mm (d.i) x 0,25 µm (df), con fase estacionaria 50% fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80°C (1 min), luego se incrementó hasta 310°C (2min) a 10°C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía 70eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285°C respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1mL/min. Los espectros de masa y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4,75 *scan s*-1 en el rango de masas *m/z* 20–300uma. El reconocimiento de los compuestos presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos NIST-05

El cromatograma indica la presencia de tres compuestos (Figura 17), solo se identificaron los picos con más del 90% de coincidencia con la librería NIST. Se realiza la comparación del espectro de masas del compuesto 2 con el espectro de la base de datos NIST-05 (Figura 18); 7-Hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (Escopoletina) con un tiempo de retención de 18,997 min, Ion molecular [M⁺] *m/z* 192 (100%), *m/z* 177(60%) de mediana intensidad característico de este compuesto, *m/z* 164 (20%) de baja intensidad, *m/z* 149 (40%) y el resto de picos de baja intensidad.

Se comparó además con una muestra patrón de Escopoletina, suministrada por el grupo de Investigación Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ).

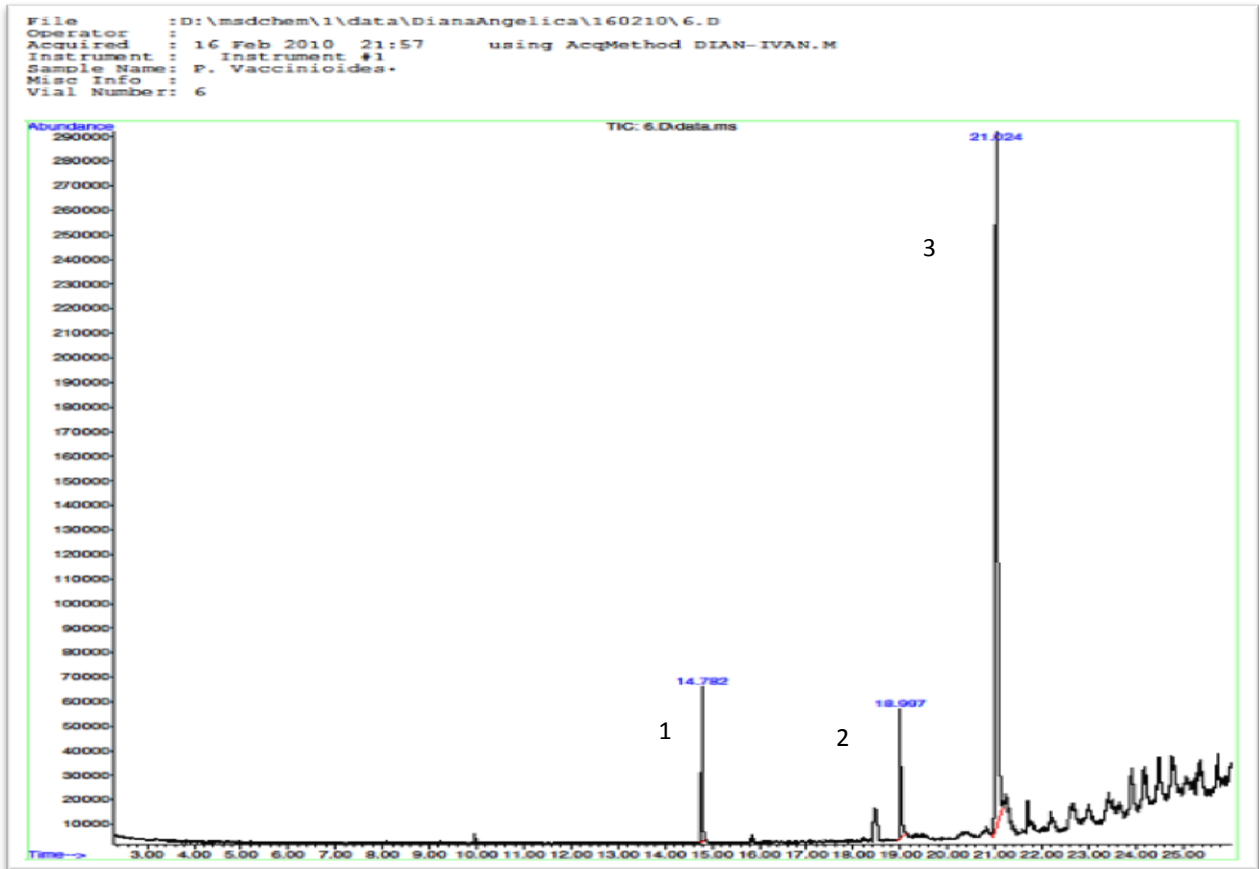


Figura 17. Cromatograma CG de la sustancia **Pv-2**.

1. No identificado.
2. 7-Hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (Escopoletina) 91%.
3. No identificado

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L
Quality : 91
ID : 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one

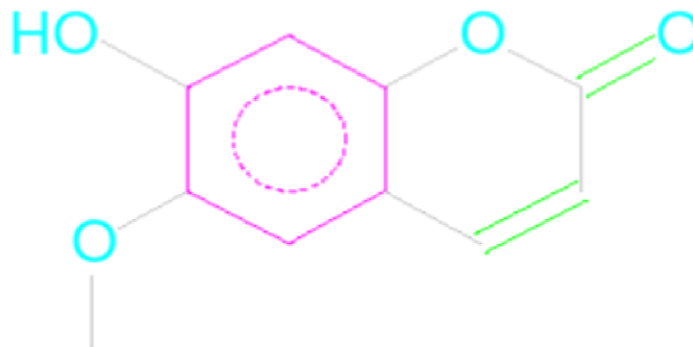
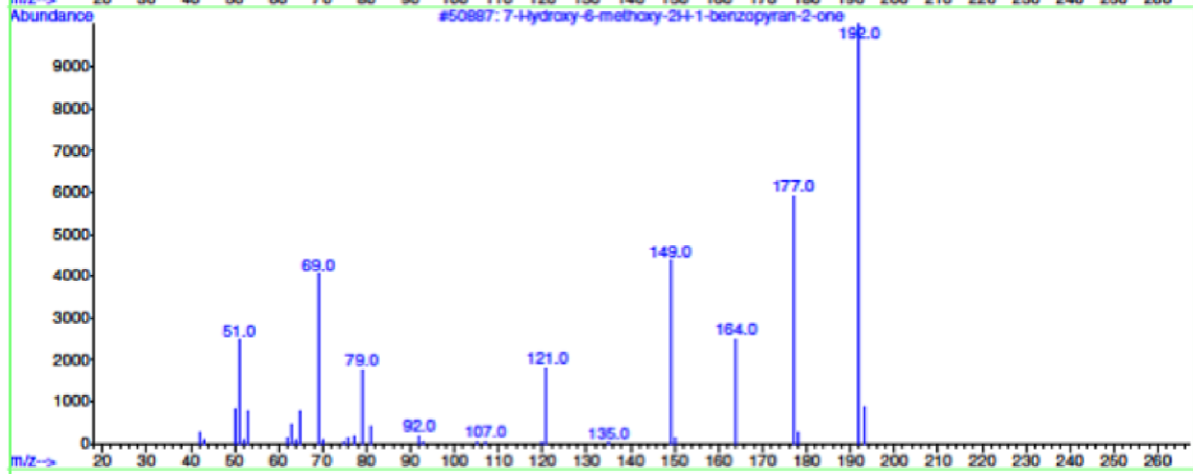
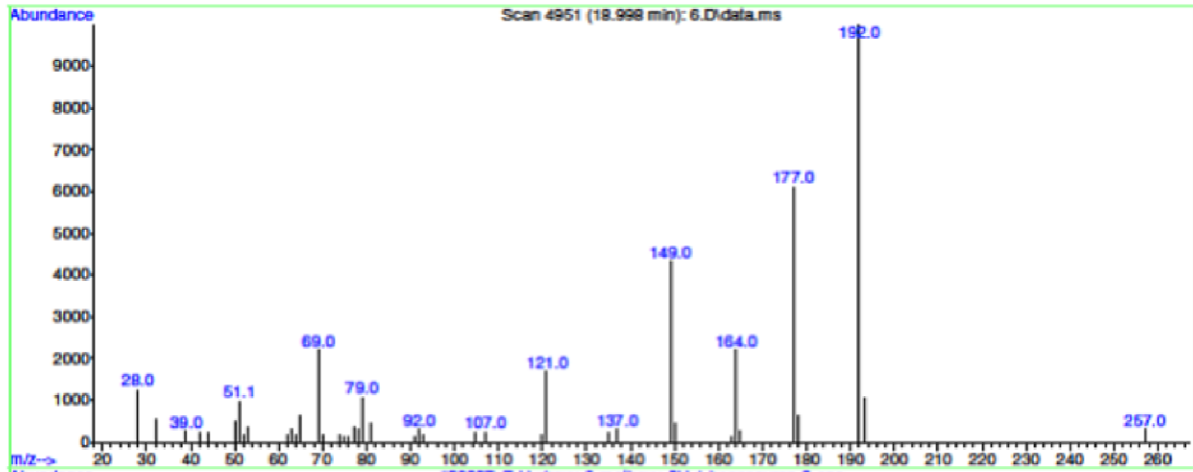


Figura 18. Espectro de masas de la Escopoletina. Pv-2.

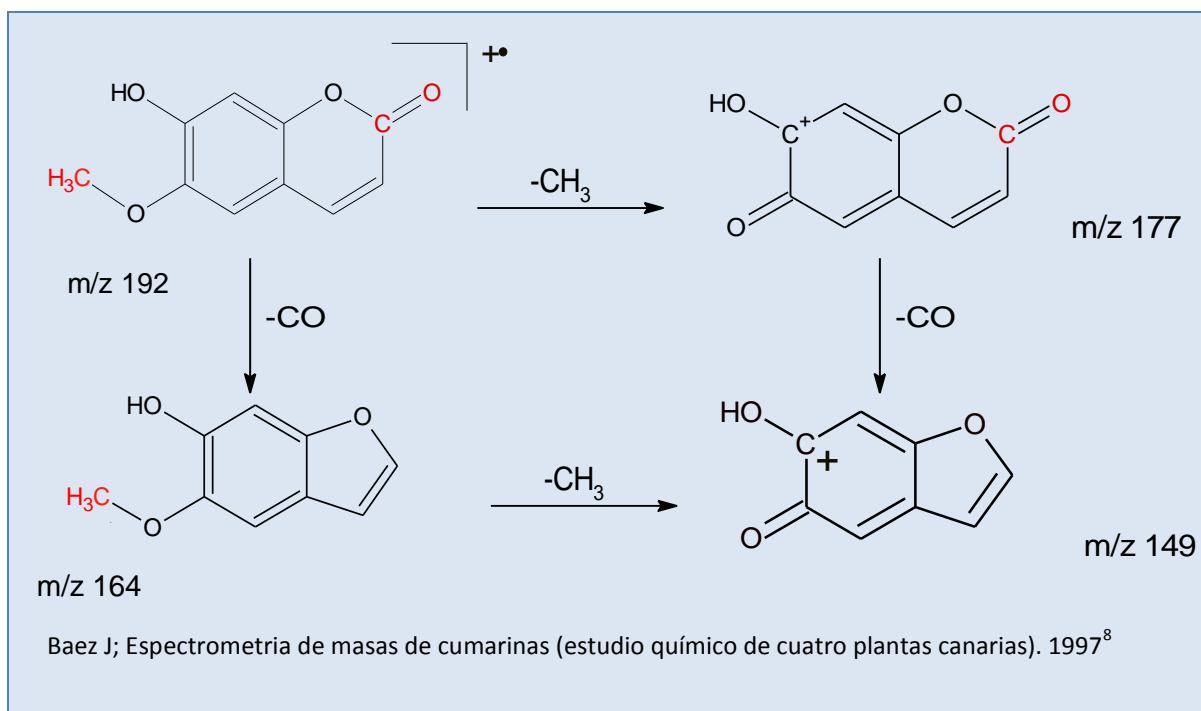


Figura 19. Esquema de fragmentación de la Escopoletina.

En el espectro de masa de la figura 19, se observa el ión molecular $m/z 192$ que corresponde con la fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$. El fragmento $m/z 177$ indica la pérdida de un grupo metilo (a partir del ión molecular), el fragmento a $m/z 164$ indica la pérdida de un carbonilo, el fragmento a $m/z 149$ corresponde a la pérdida de un fragmento de metilo (CH_3)⁵¹.

4.2.3 Compuesto Pv-3

Es un sólido amarillo (7,1 mg), obtenido a partir del extracto éter de petróleo; utilizando una columna utilizando con Sílica gel 60H y eluida con petrol: Me₂CO (7,5:2,5) unto de fusión de 142° - 146°C, un Rf de 0,68 en Sílica gel, éter: Me₂CO 8:2, (Ver Figura 20) positivo a la prueba de Lieberman–Burchard, lo que permite suponer que se trata de uno o más esteroides.



Figura 20. Cromatograma de **Pv-3**. Fase estacionaria Sílica gel. Éter de petróleo-Me₂CO (8:2). Revelada con vainillina. Fuente: el Autor.

El análisis se llevó a cabo por CG-MS en un equipo *Agilent* 6850 serie II, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975B, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (260°C, relación de *split* 15:1), y un inyector automático *Agilent* 6850 series.

Se utilizó una columna capilar de sílice fundida TR-50MS de 30 m x 0,25 mm (d.i) x 0,25 μm (df), con fase estacionaria 50% fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80°C (1 min), luego se incrementó hasta 310°C (2min) a 10°C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía 70eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285°C respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1mL/min. Los espectros de masa y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4,75 *scan s*-1 en el rango de masas *m/z* 20-300uma. El reconocimiento de los

compuestos presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos NIST-05

El cromatograma indica la presencia de una mezcla de compuestos (Figura 21), solo se asignan los picos con más del 90% de coincidencia. Estigmasterol, con un tiempo de retención de 15.260 min, con una coincidencia del 95%; 7,16-dien-3-ol-Estigmasterol con un tiempo de retención de 15,567 min, con una coincidencia del 93%; Gamma sitosterol, con un tiempo de retención de 15.627 min, con un porcentaje de coincidencia del 99 %.

El cromatograma se encuentra en la figura 21, y los espectros de masas se encuentran en las figura 22 a 24.

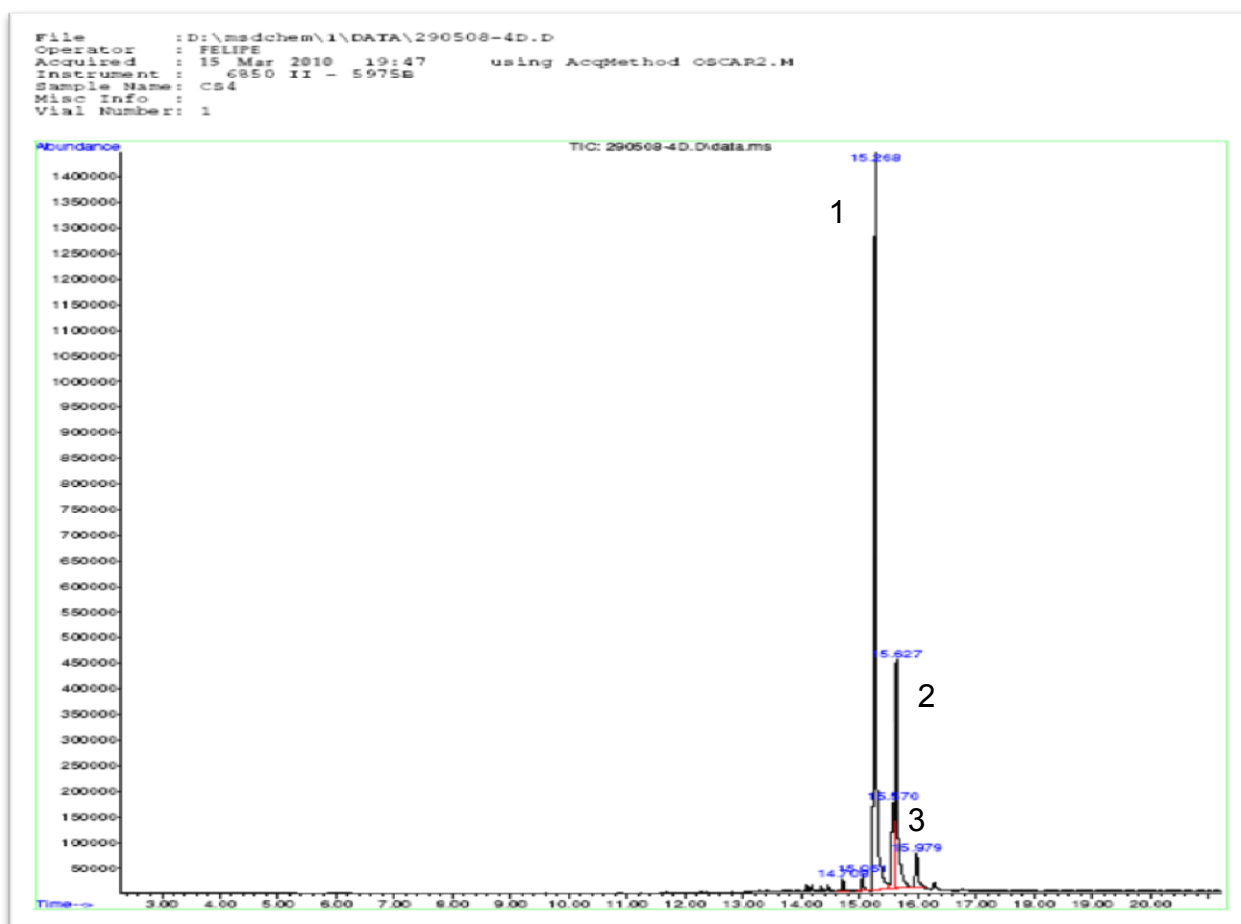


Figura 21. Cromatograma de la fracción **Pv-3**.

1. Estigmasterol (coincidencia con la librería del 95%).
2. Gamma Sitosterol (coincidencia con la librería del 99%).
3. 7,16-dien-3-ol-estigmasterol (coincidencia con la librería del 93%).

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L
Quality : 95
ID : Stigmasterol

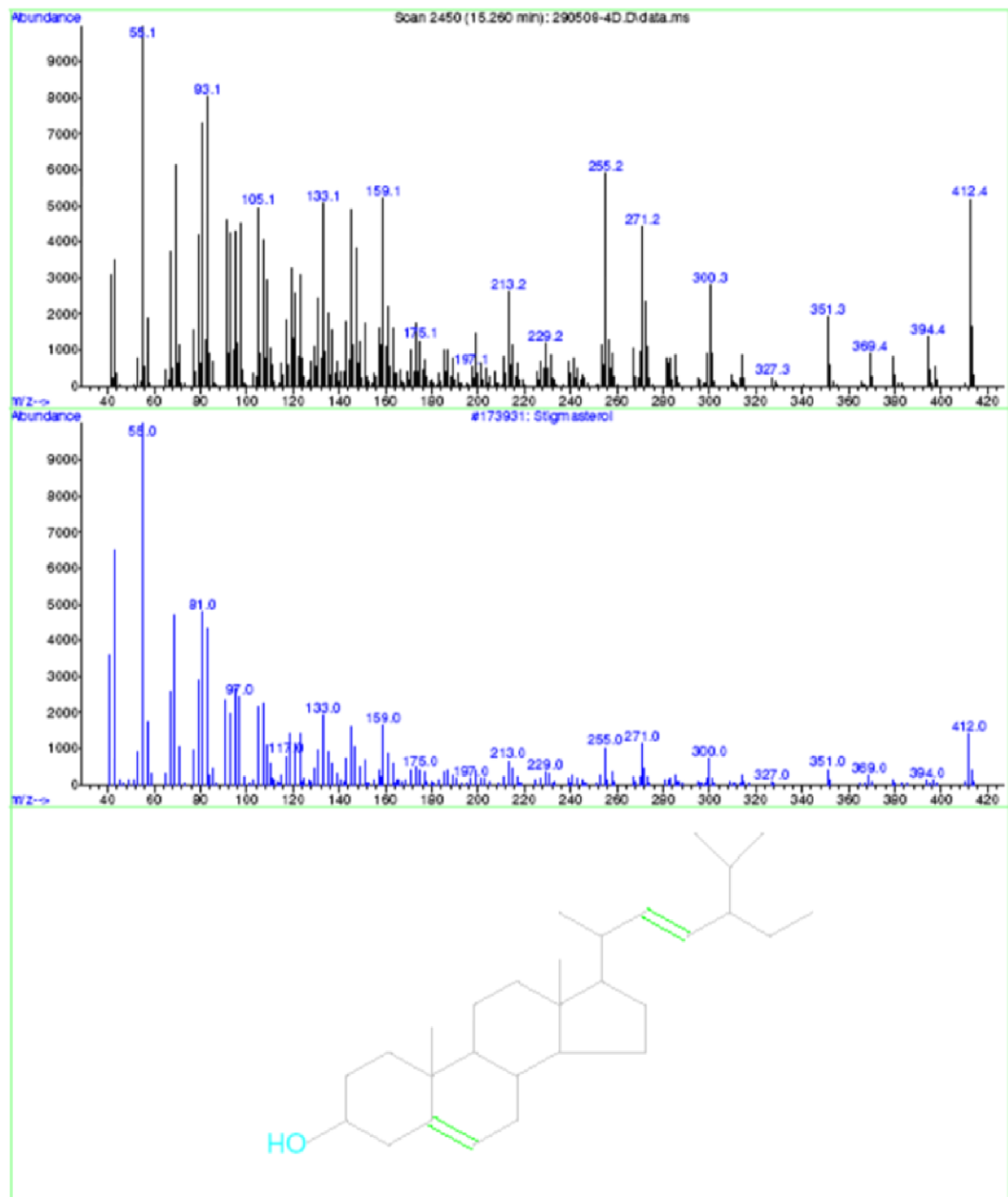


Figura 22. Espectro de masas del Estigmasterol Pv-3.

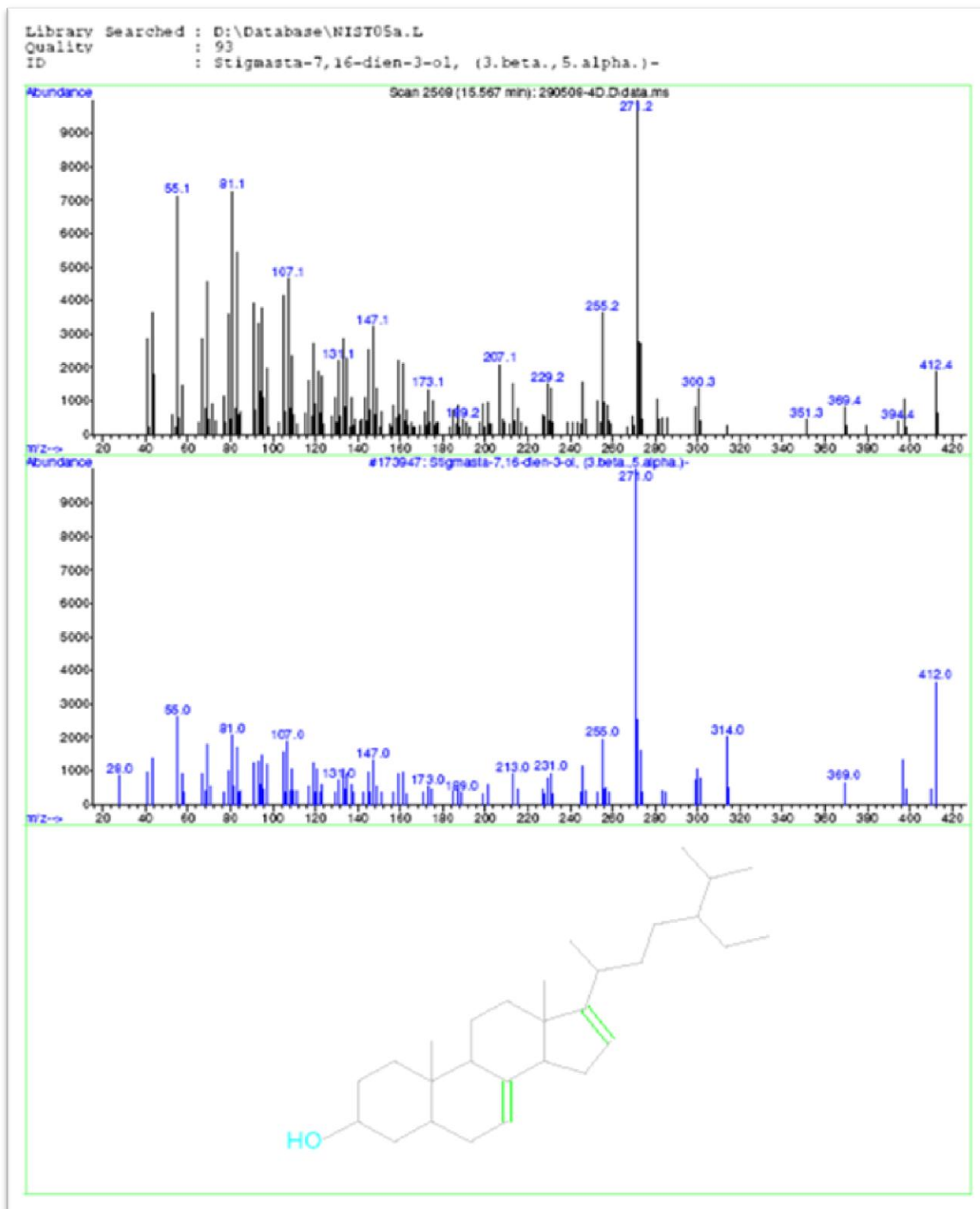


Figura 23. Espectro MS del 7,16-dien-3-ol-Estigmasterol. Pv-3.

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L
Quality : 99
ID : .gamma.-sitosterol

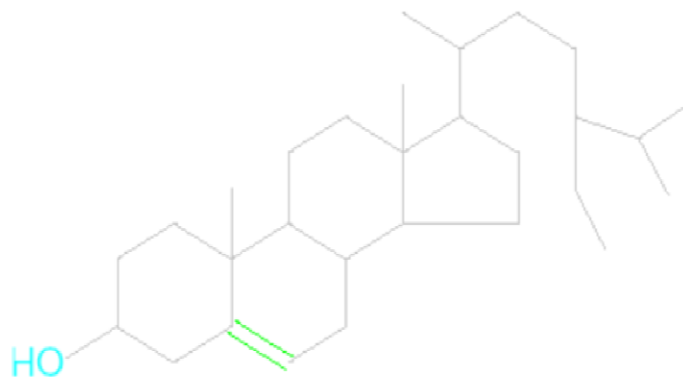
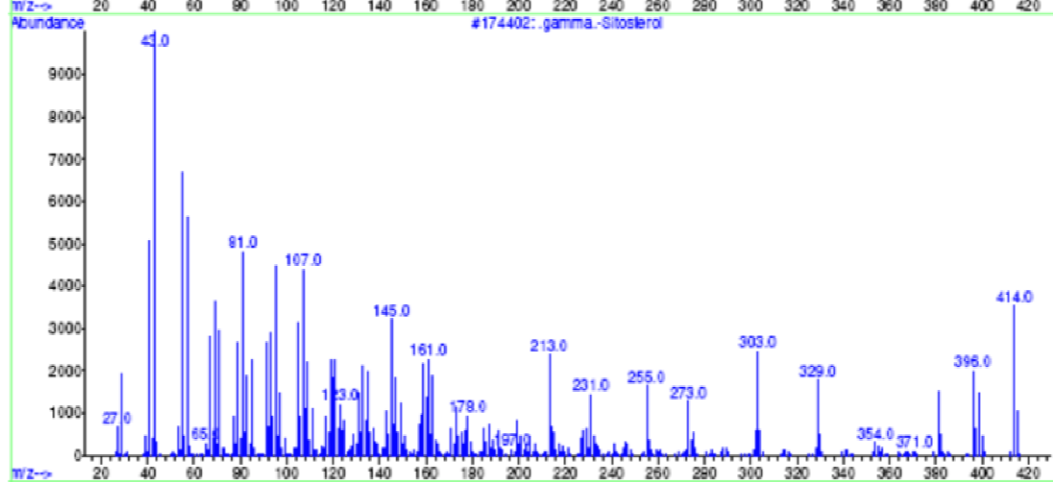
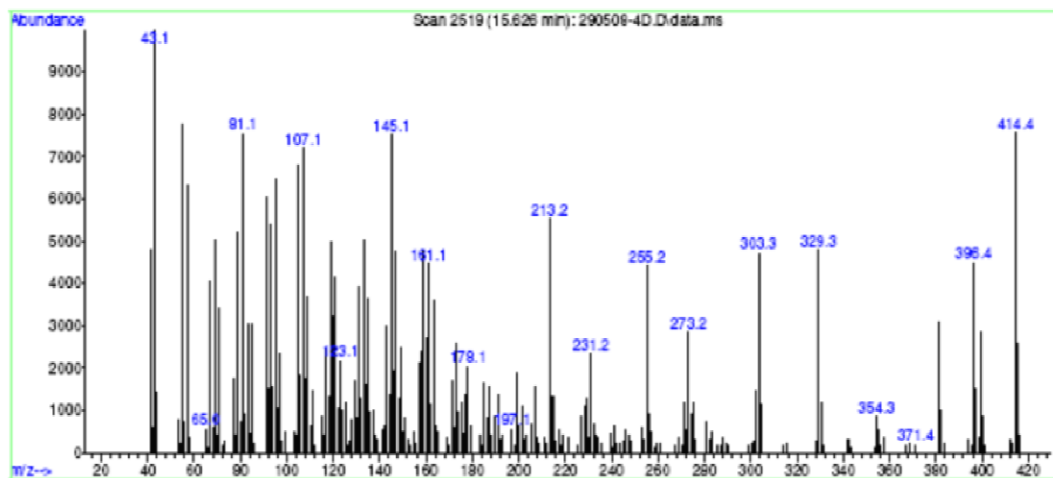
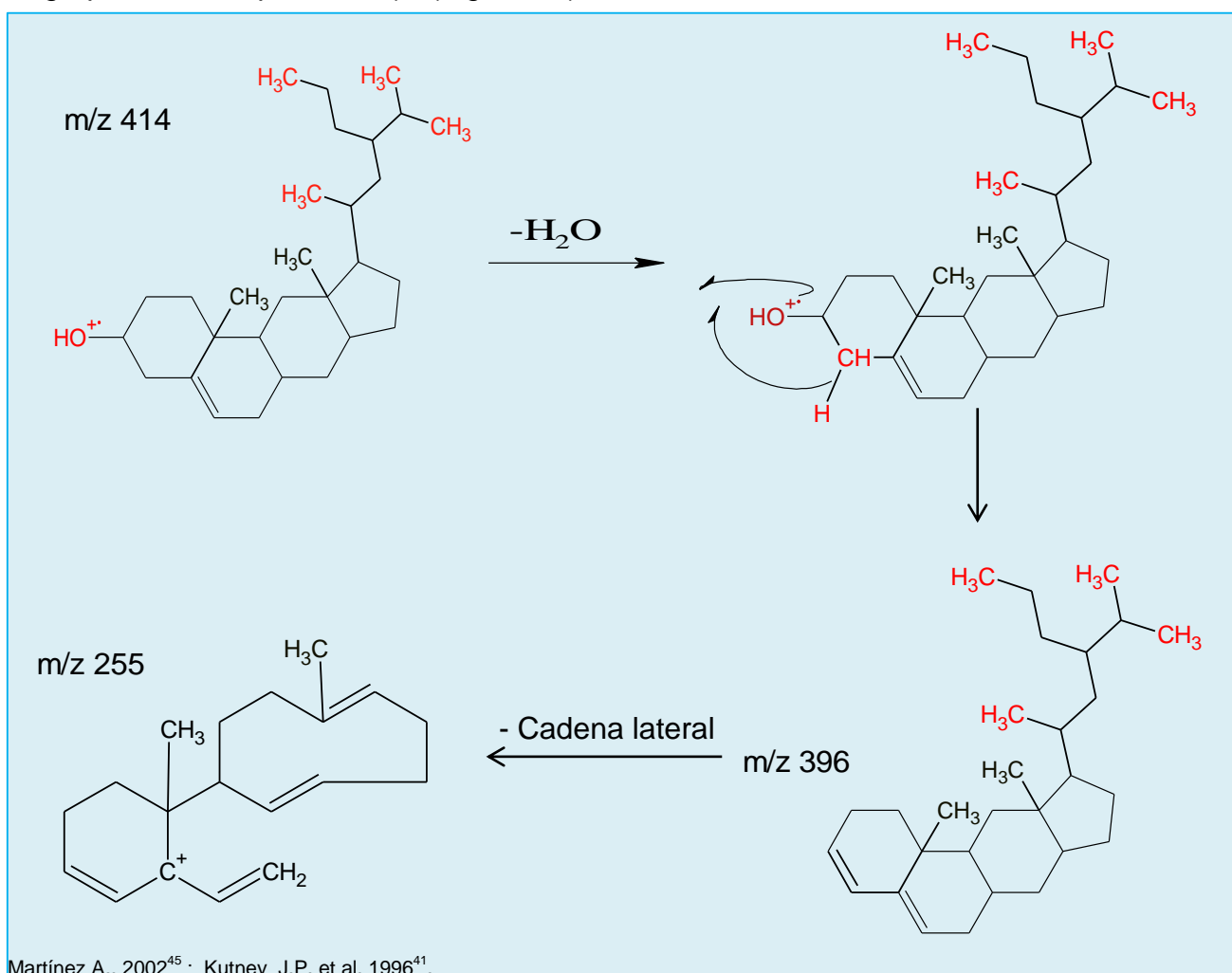


Figura 24. Espectro de masas del Gama Sitosterol. Pv-3.

Los espectros de masas obtenidos a partir de la muestra **Pv-3** indican con un elevado porcentaje de coincidencia, que se trata de compuestos tipo esteroide, lo que concuerda con la polaridad con que fueron obtenidas estas sustancias de las columnas de separación.

En los espectros de masas (figura 22, figura 23 y figura 24) se puede observar la secuencia característica de fragmentación de esteroides^{58,43}, en la cual se obtienen fragmentos m/z 396, correspondientes a un fragmento del esteroide con una pérdida de 18 unidades debida a una molécula de agua, (proveniente del grupo OH de la posición 3), este fragmento sufre una nueva fragmentación dando origen al fragmento de m/z 255, el cual se forma por la pérdida de la cadena lateral unida al ciclo pentano perhidrofenanatreño (Figura 25); por otra parte, se ven claramente los fragmentos del esteroide obtenidos a partir de la pérdida de la cadena lateral por parte del esteroide original, sin pérdida aún de agua, $273 m/z$ ⁶⁸ y la posterior pérdida de 18 unidades debida a la molécula de agua, (proveniente del grupo OH de la posición 3), (Figura 26).



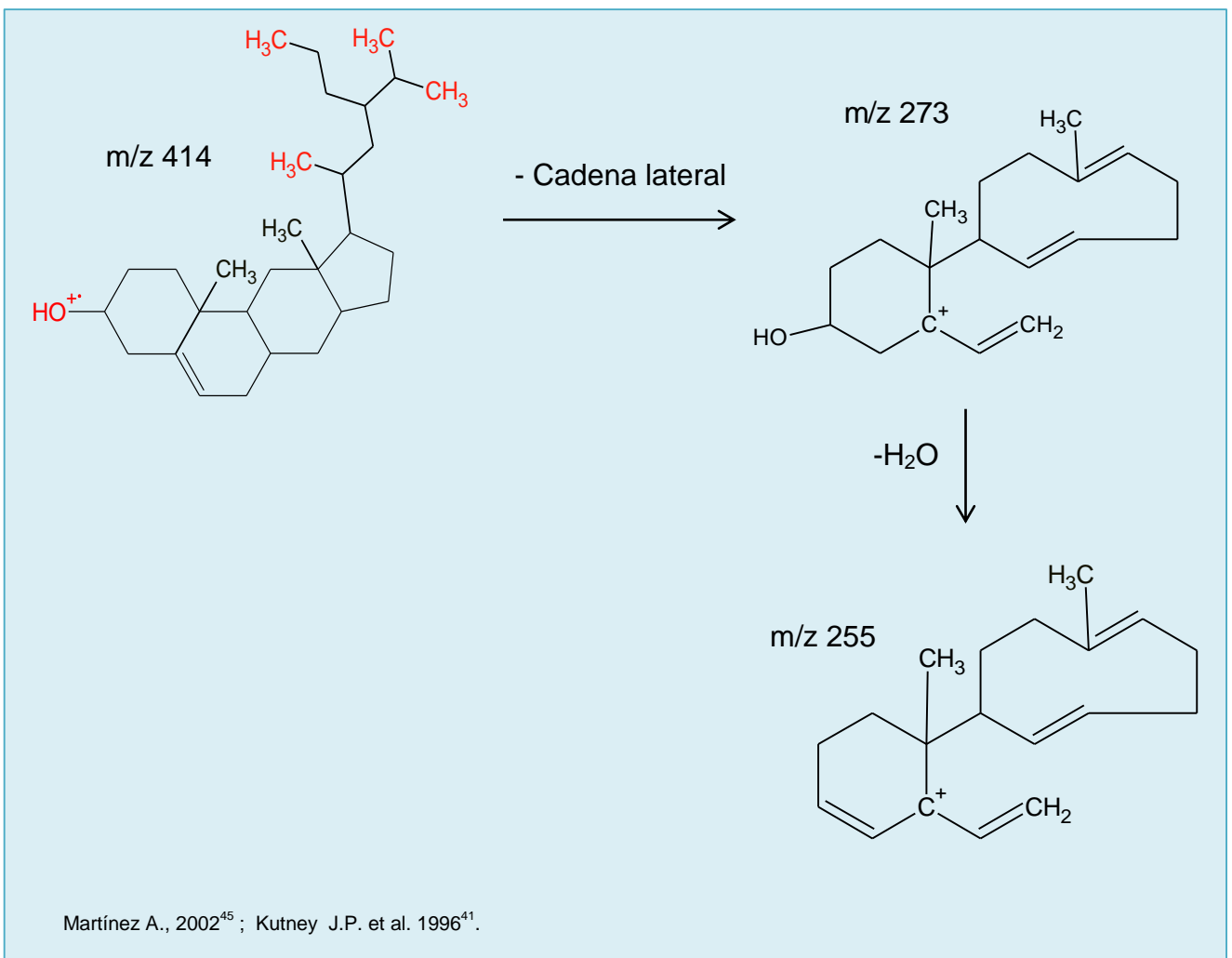


Figura 26. Esquema de fragmentación para el Gama Sitosterol.

4.2.4 Compuesto Pv-4

Es un sólido blanco (15.2 mg), obtenido a partir del extracto éter de petróleo; fue obtenido a partir de una columna utilizando Sílica gel 60H y eluida con petrol:Me₂CO (8:2). Punto de fusión de 139° - 143°C, un Rf de 0,56 en Sílica gel, éter:Me₂CO 8: 2, (Figura 27) positivo a la prueba de Lieberman–Burchard, lo que permite suponer que se trata de uno o más esteroides.

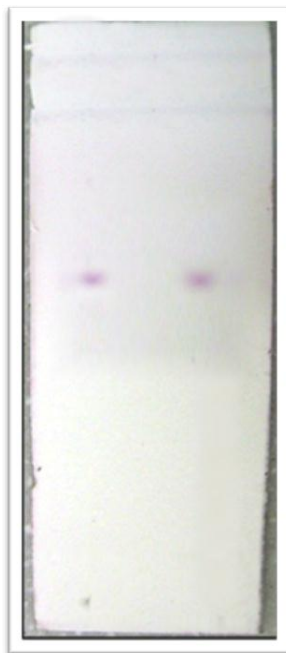


Figura 27. Cromatograma de **Pv-4**. Fase estacionaria Sílica gel. Éter de petróleo-Me₂CO (8:2). Revelada con vainillina. Fuente: el Autor.

El análisis se llevó a cabo por CG-MS en un equipo *Agilent* 6850 serie II, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975B, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (260°C, relación de *split* 15:1), y un inyector automático *Agilent* 6850 series.

Se utilizó una columna capilar de sílice fundida TR-50MS de 30 m x 0,25 mm (d.i) x 0,25 μm (df), con fase estacionaria 50% fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80°C (1 min), luego se incrementó hasta 310°C (2min) a 10°C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía 70eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285°C respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1mL/min. Los espectros de

masa y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4,75 *scan s*-1 en el rango de masas *m/z* 20-300uma. El reconocimiento de los compuestos presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos NIST-05

El cromatograma indica la presencia de una mezcla de compuestos (Figura 28), solo se identificaron los picos con más del 90% de coincidencia con la librería. Estigmasterol, con un tiempo de retención de 15.269 min., *m/z* 412 (M^{+}), *m/z* 255, *m/z* 93, con una coincidencia del 95%; gama Sitosterol, con un tiempo de retención de 15.624 min., *m/z* 414 (M^{+}), *m/z* 145, *m/z* 43, con una coincidencia de 99%. El cromatograma se encuentra en la figura 28 y los espectros de masas se encuentran en las figura 29 y 30.

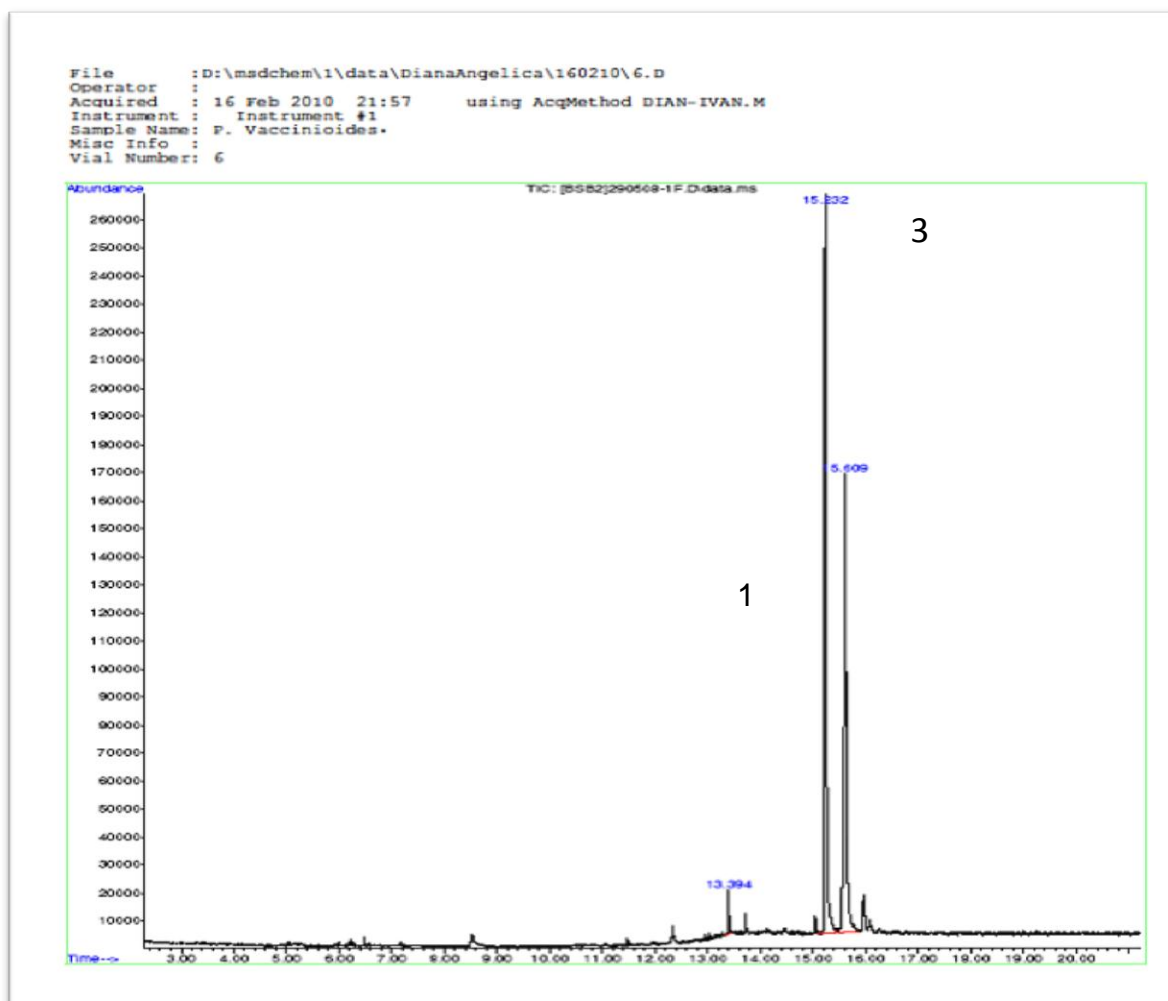


Figura 28. Cromatograma CG de la fracción **Pv-4**.

1. No identificado
2. Gamma Sitosterol (coincidencia con la librería del 99%)
3. Estigmasterol (coincidencia con la librería del 95%).

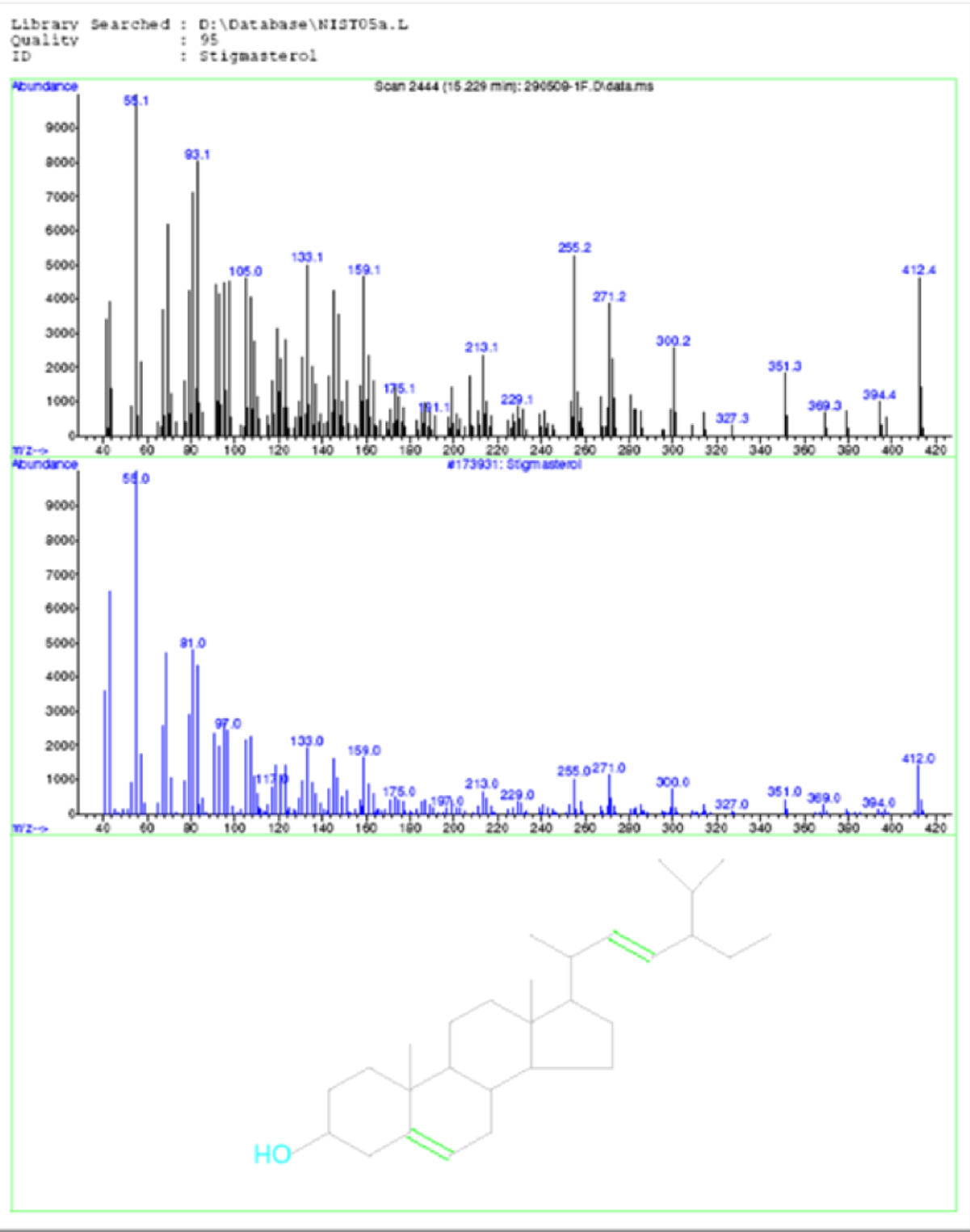


Figura 29. Espectro de masas del Estigmasterol. Pv-4.

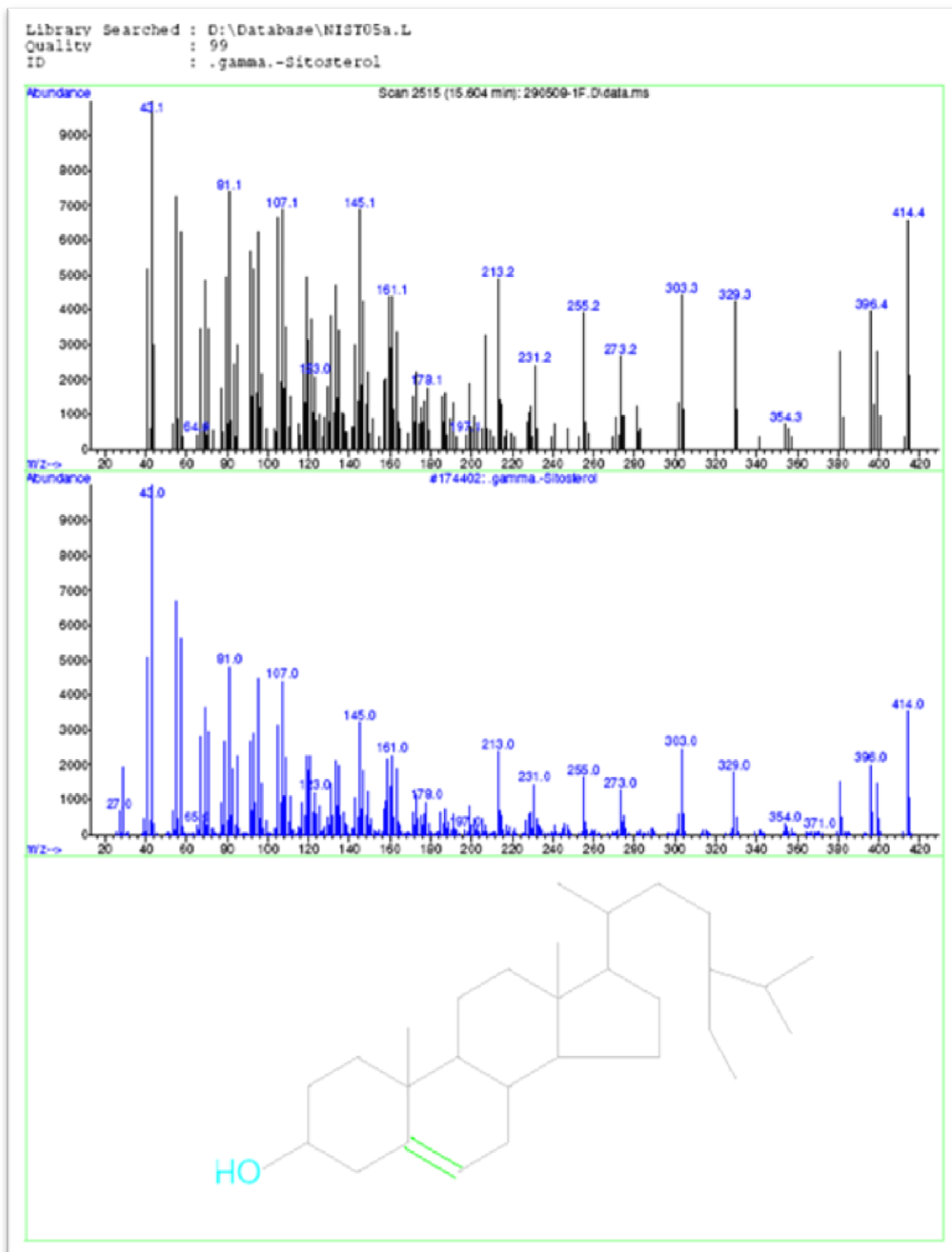


Figura 30. Espectro de masas del gama Sitosterol. Pv-4.

Los espectros de masas obtenidos a partir de la muestra **Pv-4** indican con un elevado porcentaje de coincidencia, que se trata de compuestos tipo esteroide, lo que concuerda con la polaridad con que fueron obtenidas estas sustancias,.

En los espectros de masas (figura 29, y figura 30) se puede observar la secuencia característica de fragmentación de esteroides^{58,43}, en la cual se obtienen fragmentos de m/z de 396, correspondientes a un fragmento del esteroide con una pérdida de 18 unidades debida a una molécula de agua, (proveniente del grupo OH de la posición 3), este fragmento sufre una nueva fragmentación dando origen al fragmento de m/z 255, el cual se forma por la pérdida de la cadena lateral unida al ciclopentanoperhidrofenanatreño (Figura 25); por otra parte, se ven claramente los fragmentos del esteroide obtenidos a partir de la pérdida de la cadena lateral por parte del esteroide original, sin pérdida aún de agua, 273 m/z⁶⁸ y la posterior pérdida de 18 unidades debida a la molécula de agua, m/z255, (Figura 26).

Luego de un proceso de cristalización con el que se intentó separar estos compuestos, se efectuó un análisis por resonancia magnética nuclear, experimentos de H¹ y C¹³, de una de las sustancias obtenidas, logrando los espectros que se muestran a continuación en las figuras 31 y 32.

Se confirman picos y desplazamientos de los espectros de RMN H¹ en CD₃Cl a 400 MHz y de C¹³ en CD₃Cl a 100 MHz de la sustancia **Pv-4** con artículos encontrados en la literatura mostrando concordancia con los datos obtenidos por Andréa M; Dionéia C. R.⁵ y Pollyanna L⁵³.

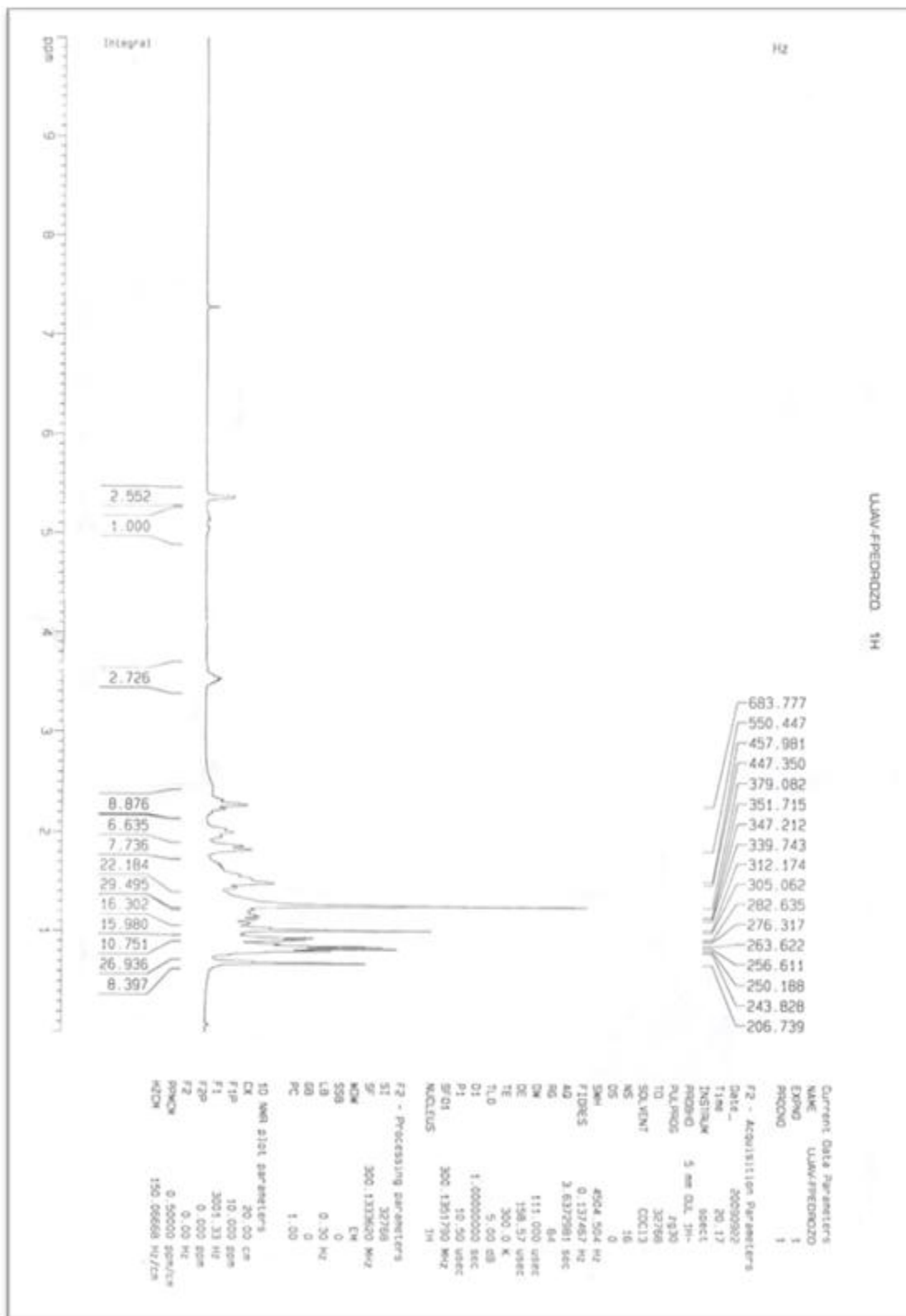


Figura 31. Espectro de resonancia magnética nuclear H^1 , disuelta en CD_3Cl a 400 MHz de **Pv-4** tras la cristalización.

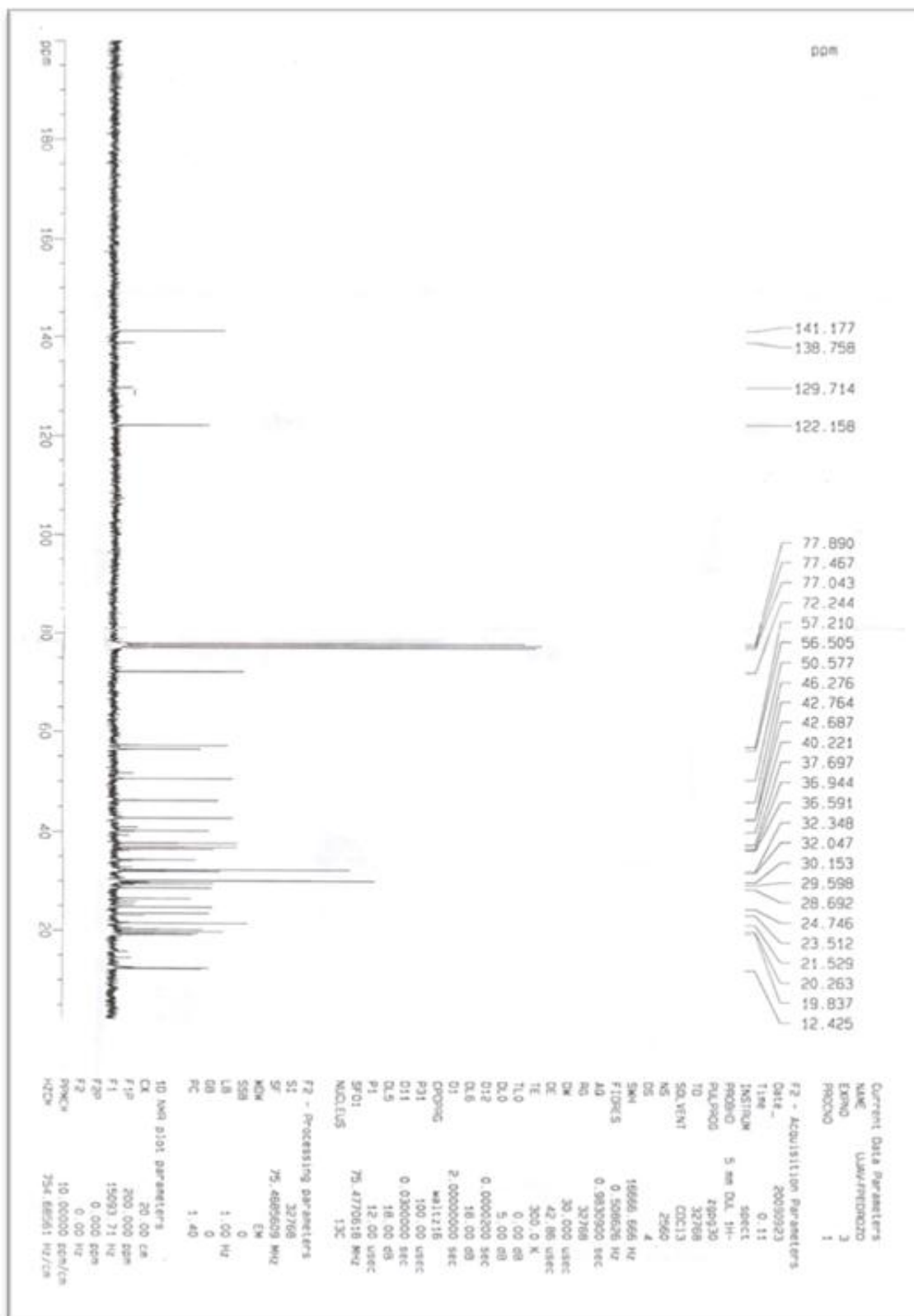


Figura 32. Espectro de resonancia magnética nuclear C^{13} , disuelta en CD_3Cl a 100 MHz de Pv-4 tras la cristalización.

En forma general en un espectro RMN ^1H de esteroides se observan las señales de protones metílicos en la región de 0-1 ppm con constantes de acoplamiento de 6-7 Hz cuando tienen carbonos saturados vecinos. El protón ligado al carbono 3 se observa como un multiplete alrededor de 3.53 ppm. En el caso de los esteroides con enlace doble entre los carbonos 5 y 6, el protón del carbono 6 se observa como un "doblete" ancho alrededor de 5.35 ppm. En el espectro de RMN ^1H de la sustancia proveniente de la fracción **Pv-4**, se pueden apreciar las señales características de los esteroides; aparecen señales entre 0, 7 y 1,3 ppm, las cuales se deben a los hidrógenos unidos a carbonos sp^3 , tanto los que forman parte de los anillos como los que conforman la cadena lateral del esteroide, se destacan, además, unas señales que aparecen en la zona cercana a 5,1 ppm, que tienen una intensidad mínima, pero que sin embargo son apreciables.

Si se tratara del espectro de resonancia de una sustancia pura la integración de dichas señales no correspondería con el espectro obtenido, la baja intensidad de esas señales permite afirmar que la sustancia no se encuentra totalmente pura, que efectivamente son esteroides mezclados – gamma sitosterol y estigmasterol-, sin embargo son mucho más intensas las señales correspondientes al gamma Sitosterol, el cual no tiene doble enlace entre los carbonos 22 y 23 de la cadena lateral.

El espectro de resonancia de ^{13}C muestra de igual forma señales que corresponden a una mezcla de esteroides, de igual manera aparecen en mayor intensidad las señales correspondientes al gamma sitosterol, pero aparecen también señales correspondientes a los carbonos que forman el doble enlace en la cadena lateral del estigmasterol (129 y 138 ppm).

Teniendo en cuenta esto, se puede afirmar que el proceso de purificación dio como resultado una mezcla, en la cual el componente mayoritario es el gamma sitosterol.

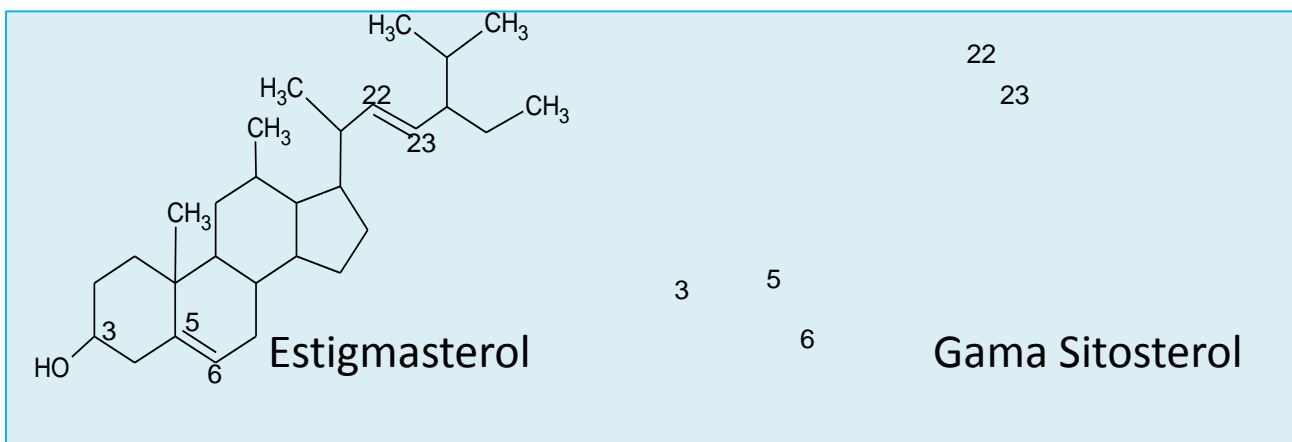


Figura 33. Estructura química del Estigmasterol y Gama Sitosterol. Fuente: el Autor.

4.2.5 Compuesto Pv-5

El compuesto **Pv-5** es un sólido amarillo claro con peso 5,6 mg el cual presentó un p.f de 144°C el cual coincide con el reportado en la literatura para la 6,7-dimetoxicumarina (p.f lit. 142°C)^{18,36} fluorescencia celeste bajo la luz U.V de onda larga, un Rf de 0,75 en placas de Sílica gel corridas con CHCl₃-MeOH 9,5:0,5.

Se obtuvo a partir del extracto etanólico, utilizando una columna con Sílica gel 60H y eluida con éter de petróleo:Me₂CO (8,5:1,5) y su pureza fue seguida mediante CCD. (Figura 34)



Figura 34. Cromatograma de **Pv-5**. Fase estacionaria Sílica gel. Éter de petróleo-Me₂CO (8:2). Observada bajo la luz U.V de onda larga. Fuente: el Autor.

El análisis se llevó a cabo por CG-MS en un equipo *Agilent* 6850 serie II, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975B, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (260°C, relación de *split* 15:1), y un inyector automático *Agilent* 6850 series.

Se utilizó una columna capilar de sílice fundida TR-50MS de 30 m x 0,25 mm (d.i) x 0,25 µm (df), con fase estacionaria 50% fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80°C (1 min), luego se incrementó hasta 310°C (2min) a 10°C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía 70eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285°C respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1mL/min. Los espectros de masa y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia a 4,75 scan s⁻¹ en el rango de masas m/z 20-300 uma. El reconocimiento de los

compuestos presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos NIST-05

El cromatograma indica que este sólido es 6,7 dimetoxi-2H-1-benzopyran-2-ona (Escoporona), con un tiempo de retención de 19,150 min, Ion molecular $[M^{+}]$ m/z 206 (100%), m/z 191 (40%) de mediana intensidad característico de este compuesto, m/z 163 (20%) de baja intensidad.

El cromatograma se encuentra en la figura 35, y el espectro de masas se encuentra en la figura 36. Se comparó además con una muestra patrón de cumarina, suministrada por el grupo de Investigación Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ).

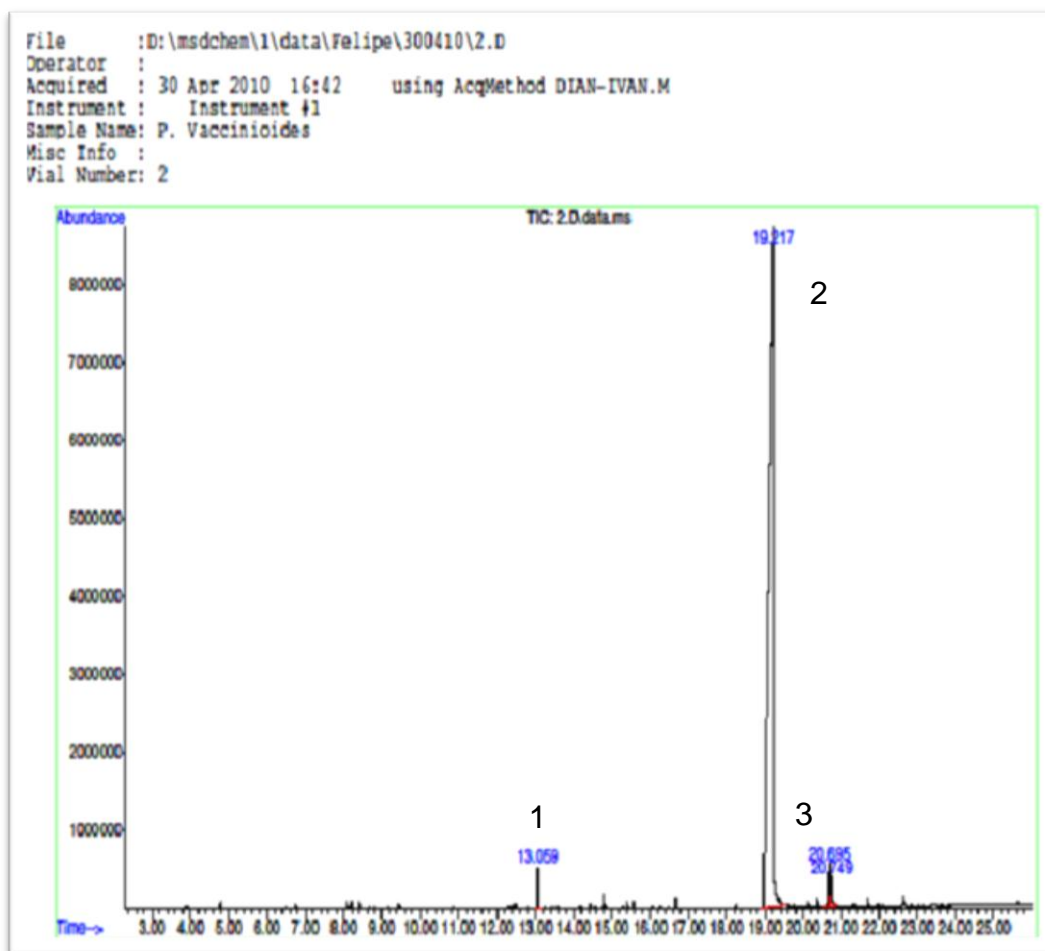


Figura 35. Cromatograma de la sustancia **Pv-5**

1. No identificado
2. Escoporona ó 6,7-dimetoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (coincidencia con la librería del 98%).
3. No identificado

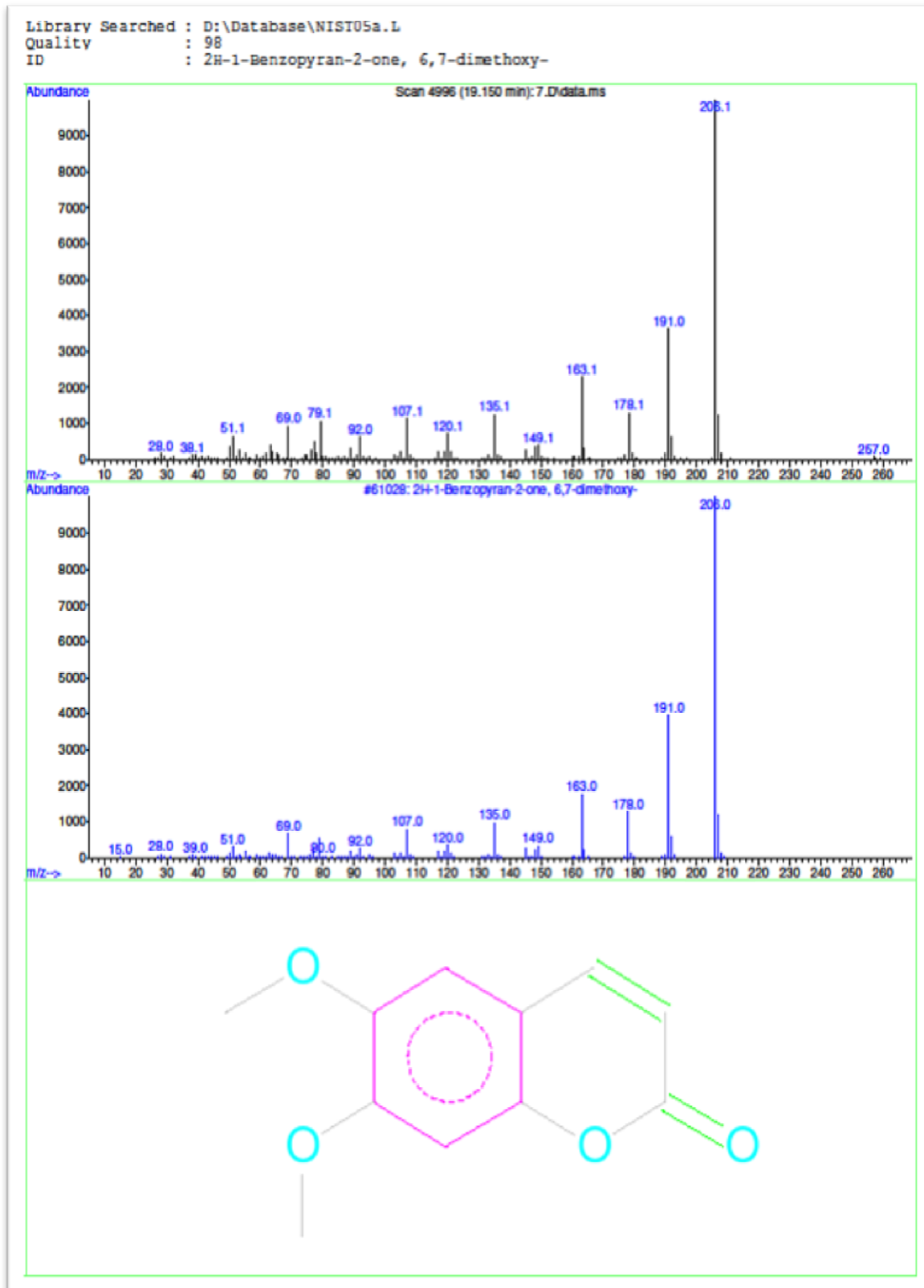


Figura 36. Espectro de masas de la Escoporona. Pv-5.

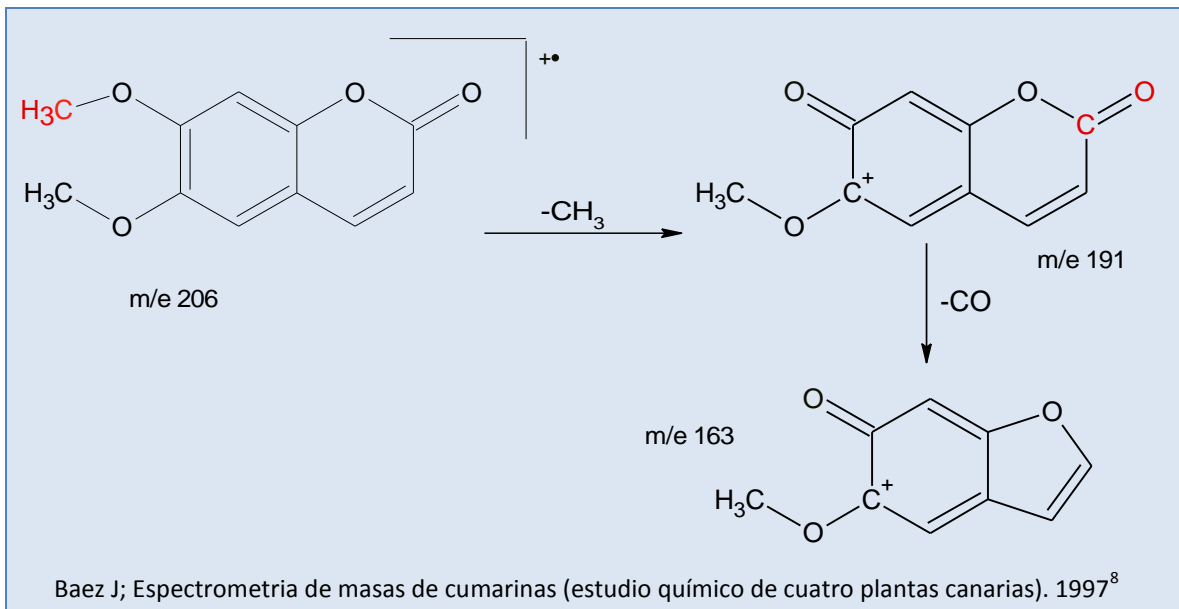


Figura 37. Esquema de fragmentación de la Escoporona.

En el espectro de masa de la figura 36, se observa el ión molecular a m/z 206 que corresponde con la fórmula $C_{11}H_{10}O_4$. El fragmento a m/z 191 indica la pérdida de un grupo metilo (a partir del ión molecular), el fragmento a m/z 163 indica la pérdida de monóxido de carbono⁸ (figura 37).

4. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las tres especies de *Pentacalia* (*P. nitida*, *P. abietina* y *P. vaccinioides*) estudiadas en los ensayos preliminares y cotejando con la información obtenida por el grupo de investigación GIFUJ en otras especies del mismo género se puede aseverar que las sustancias esteroidales y cumarínicas son comunes en el género *Pentacalia* y que es en la especie *P. vaccinioides* donde se presenta mayor concentración de estos metabolitos. De acuerdo a lo anterior los compuestos encontrados en las hojas de la especie *Pentacalia vaccinioides* representan un gran aporte al estudio fitoquímico de esta especie vegetal, de la cual no se conocen estudios, se realiza también un gran aporte quimiotaxonómico a la familia Asteraceae y en especial al género *Pentacalia* en cuanto a sustancias esteroidales y cumarinas.

Cumarinas

Se aislaron e identificaron tres Cumarinas y dos mezclas de esteroides, dos de las cumarinas (**Cumarina y Escopoletina**) y las mezclas de esteroides se aislaron del extracto etéreo, la otra cumarina (**Escoporona**) del extracto etanólico de la fracción diclorometano, es el extracto etéreo con un rendimiento 5,85% de donde se aislaron la gran mayoría de los metabolitos secundarios de interés en esta investigación (cumarinas y esteroides).

La **Cumarina** es considerada el miembro más simple y el precursor, a su vez de las otras cumarinas 7-oxigenadas como la **Escopoletina** y la **Escoporona**, es la primera vez que se aísla la **Cumarina** en el género *Pentacalia* constituyéndose esto como uno de los aportes principales de esta investigación. La función principal de las cumarinas en las especies vegetales pertenecientes al género *Pentacalia* es actuar como un excelente mecanismo de defensa natural al ataque de bacterias, hongos e insectos²², es por esto que se encontró en gran proporción en las hojas de la *Pentacalia vaccinioides*.

Las cumarinas son utilizadas como principios activos de algunos medicamentos como el Acenocumarol o Acenocumarina que es un anticoagulante que actúa inhibiendo la acción de la vitamina K o el Venalot que es utilizado en el tratamiento del edema vascular y/o linfático, además son utilizadas en la industria de la síntesis de aromatizantes y tiene una acción biológica reconocida como fotosensibilizadoras de la piel, antiespasmódica y vasodilatadora de coronarias, acción antiinflamatoria, antibacteriana, hipotérmica, analgésica y anticoagulante entre otras, de aquí su importancia a nivel económico y terapéutico⁵¹.

La especie colombiana *Pentacalia vaccinioides* presenta tres cumarinas la **Cumarina**, **Escopoletina** y **Escoporona** en cantidades significativas todas con actividad biológica comprobada⁵¹ y con gran importancia económica, permitiendo catalogar esta especie como una nueva fuente natural de cumarinas, además estos resultados aportan información que enriquecen los criterios quimiotaxonómicos del género *Pentacalia*.

Esteroles

Los esteroles son sustancias que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se han reportado la presencia de diferentes sustancias esteroideas tales como estigmasterol en *P. pulchella*²⁸, β -sitosterol en *P. Corymbosa* y Cicloartanol en *P.nítida*⁶⁶. Los esteroles identificados en esta investigación fueron **Estigmasterol**, **7,16-dien-3-ol-Estigmasterol** y **Gamma sitosterol** contribuyendo con estos resultados al estudio fitoquímico y quimiotaxonómico del género *Pentacalia*.

En general, se ha ignorado la importancia relativa de los esteroles de origen vegetal, aunque a la mayoría no se les conoce actividad biológica específica en la naturaleza, excepto como componentes de las membranas celulares, se han reportado diversas acciones al ser ingeridos en determinadas dosis, entre ellas,

reducción del colesterol sérico^{38,68}, inhibición del crecimiento en células de cáncer⁴⁻⁵⁵, antiinflamación^{32,69}, antipirética³², liberación de insulina³⁹⁻⁴⁶, e inmunomodulación¹⁶⁻²⁷.

Los esteroides son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica por sus propiedades físico-químicas y farmacológicas, se comercializan en varias formas, según sus aplicaciones. En la industria farmacéutica para la síntesis de principios activos como hormonas, corticoides, anticonceptivo, en la industria alimentaria se usan como nutracéuticos y como aditivos, en la industria de cosméticos en productos de tocador. Actualmente solo en Europa se comercializan con 3.000 toneladas de esteroides al año.

La especie colombiana *Pentacalia vaccinioides* presenta dos mezclas de esteroides compuestas por los esteroides **Estigmasterol**, **7,16-dien-3-ol-Estigmasterol** y **Gamma Sitosterol** en cantidades significativas comparadas con las fuentes naturales que se utilizan actualmente en la industria, permitiendo catalogar esta especie como una nueva fuente natural de sustancias esteroideas, además estos resultados aportan información que enriquecen los criterios quimiotaxonómicos del género *Pentacalia*.

6. CONCLUSIONES

Se encontraron dos nuevas sustancias 2-H-1- Benzopiren -2-ona (Cumarina) y 7,16-dien-3-Estigmasterol las cuales aportan información que enriquecen los criterios quimiotaxonómicos del género *Pentacalia*. Por lo tanto permite, catalogar a la especie *Pentacalia vaccinioides* como una nueva fuente natural de cumarinas y sustancias esteroideas.

Se logró identificar por diferentes técnicas cromatograficas y espectroscópicas, dos compuestos cumarinicos conocidos como 2-H-1- Benzopiren -2-ona (Cumarina) y 7-Hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (Escopoletina) junto con tres compuestos esteroideas conocidos como Estigmasterol, 7,16-dien-3-ol-Estigmasterol y Gamma Sitosterol a partir del extracto éter de petróleo de la especie *Pentacalia vaccinioides*.

Del extracto etanólico de la especie *Pentacalia vaccinioides* y por diferentes técnicas cromatograficas y espectroscópicas, se logró identificar un compuesto Cumarínico conocido como 6,7-dimetoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (escoporona).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ADLERCREUTZ H., MAZUR W. 1997. Phytoestrogens and Western Diseases. The Finish Medical Society, DUODECIM, Ann. Med., 29, 95-120.
2. AWAD A.B., DOWNIE A., FINK C.S., KIM U. Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell grown in SCID mice. Anticancer Res., 20, 821- 824, 2000.
3. AWAD A.B. AND FINK C.S. Phytosterol as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. J. Nutr., 130, 2127-2130, 2000.
4. AWAD A.B., FINKS C.S., WILLIAMS H., KIM U. In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. Europ. J. Cancer Prev., 10, 507-513, 2001.
5. ANDREA M. DO NASCIMENTO; DIONEIA C.R. DE OLIVEIRA; Kaurene Diterpenes and Other Chemical Constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. J. Braz. Chem. Soc. vol.12 no.4 São Paulo July/Aug. 2001.
6. BERGES R.R., WIDELER J., TRAMPISCH H.J., SENGE TH. And the b-phytosterol study group. Randomised, placebo controlled, double blind clinical trial of b-phytosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. The Lancet, 345, 1529-1532, 1995.
7. BOHLMANN F, CASTRO V, ZIESCHE J 1984. New sesquiterpenes from *Pentacalia* species. *Rev Latinoamer Quím* 14:103-106.
8. BAEZ J., Espectrometría de masas de Cumarinas (estudio químico de cuatro plantas canarias). Tesis de grado para optar por el título de Químico. Universidad La Laguna. Escuela universitaria de ingeniería técnica industrial de las palmas. 1977.
9. BOLLIGER H., BRENNER M., GANSHIRT H., SEILER H., STANHI E., WALDI D. 1965. Thin layer chromatography a laboratory handbook. Academic Press. Springer Verlac. 553 p.
10. BOUIC P.J.D. Immunomodulation of HIV/AIDS: The Tygerberg/Stellenbosch University experience. AIDS Bull., 6, 18-20, 1997.

11. BOUIC P.J.D. et al. The effects of b-sitosterol (BSS) and b-sitosterolglucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *Int. J. Sports Med.*, 20, 258-262, 1999.
12. BOUIC P.J.D. The role of phytosterols and phytosterolins in immunomodulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 4, 471-5, 2001.
13. BOUIC P.J.D., LAMPRECHT J.H., Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating properties, *Altern. Med. Rev.*, 4, 170-177, 1999.
14. BORREGO S. et al. Procedimiento para obtener androstadiendiona (ADD) y androstendiona (AD) a partir de los fitosteroles de la caña de azúcar. Patente CU 22899, 2000.
15. BRAILOWSKY S. 1995. Las sustancias de los sueños: neuropsico farmacología. México: Fondo de Cultura Económica.
16. BREYTENBACH U., CLARK A., LAMPRECHT J., BOUIC P. Flow cytometric analysis of the Th1-Th2 balance in healthy individuals and patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) receiving a plant sterol/sterolin mixture. *Cell Biol. Int.*, 25, 43-9, 2001.
17. CABEZA, G. 1994. Metabolitos secundarios y actividad antifúngica de *Pentacalia corymbosa* (Benth) Cuatr. (*Asteraceae-Senecioneae*). Santafé de Bogotá. Tesis de Master en Biología. Universidad Javeriana.
18. CAMPBELL, W., PROVAM, G. and WATERMAN, P. 1982. Simple coumarins from two populations of *Diosmaacmaeophylla*. *Phytochemistry*, 21:1457-1458.
19. CANNELL R., 1998. *Natural Products Isolation*. Humana Press. 472 p.
20. CASSINI, H. 1827. Senecionées. En G.L. Cuvier, *Dictionnaire des Sciences Naturelles* 48: 446-466. (en reimpression R.M. King & H.W. Dawson 1975. Cassini on Compositae 3 vols. Oriole Editions, New York).
21. Compositae (Asteraceae) (en inglés). *Major Groups, Families and Genera. The Royal Botanic Gardens, Kew.* (2004 en adelante).

22. CORTES, D & ESCOBAR, M. 2001. Evaluación del efecto anti fúngico de sustancias obtenidas a partir de *Pentacalia corymbosa* (Benth) Cuatr (Guasquin) frente a *Botrytis cinérea* aislado de un cultivo de clavel. Trabajo de grado para optar el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 122 pp.
23. DE STEFANI et al. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer*, 37, 140-4, 2000.
24. DÍAZ, S. Y CUATRASAS, J. 1999. Asteraceas de la flora de Colombia Senecioneae. Géneros *Dendrophorbium* y *Pentacalia*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Jorge Álvarez Lleras No 12. Bogotá, Colombia. 25-26 p.
25. DÍAZ-PIEDRAHITA S. 1999. Asteraceas de la flora Colombiana: Senecioneae, géneros *Dendrophorbium* y *Pentacalia*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Santafé de Bogotá. 389 pp.
26. DOMÍNGUEZ X. 1985. Métodos de investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México.
27. DONALD P.R. et al. A randomised placebo controlled trial of the efficacy of beta-sitosterolan its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1, 518-22, 1997.
28. FORERO, C. 1994. Fitoquímica y actividad antimicrobiana de *Pentacalia pulchella*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá, Colombia. 186 p.
29. GARCÍA –BARRIGA, H. 1975. Flora medicinal de Colombia. Vol 2. Editorial Imprenta Nacional. Bogotá, Colombia. Pg 293, 398-409.
30. GERENA, Y. 1994. Química y propiedades fungitoxicas de estructuras florales y hojas de *Pentacalia ledifolia* (H.B.K) Cuatr (*Asteraceae-Senecioneae*) Santafé de Bogotá. Tesis Magister en Biología. Universidad Javeriana.
31. GRANADOS A. 2000. Estudio químico comparativo de *Pentacalia* originarias de paramo, y evaluación de su actividad antifúngica. Tesis de Grado para optar por el título de Magister en Biología con énfasis en Fitoquímica. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

32. GUPTA M.B. et al. Anti-inflammatory and anti-pyretic activities of b-sitosterol. *Planta Med.*, 39, 157-163, 1980.
33. HANIFA MOURSI S.A. AND AL-KHATIB I.M. Effect of *Melia azedarach* fruits on gipsing-restraint stress-induced ulcers in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 36, 527-33, 1984.
34. HARBORNE J., WILLIAMS C., 2000. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry*. Vol 55. p. 481 – 504.
35. HENDRIKS H.F.J., WESTSTRATE J.A., VAN VLIET T., MEIJER G.M. 1999. Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Europ. J. Clin. Nutr.*, 53, 319-327.
36. HERZ, W., BHAT, S. and SANTHANAM, P. 1970. Coumarins of *Artemisa dracunculoides* and 3,6 – dimethoxy – 4,5,7 – trihydroxyflavone in *A. arctica*. *Phytochemistry*, 9:891-894.
37. HOSTETTMANN K, GUPTA M, MARSTON A, FERREIRA E. 2008. Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. SECAB. Bogotá.
38. HOWARD B.V., KRITCHETSKY D. Phytochemicals and cardiovascular disease. *Circulation*, 95, 2591, 1997.
39. IVORRA M.D., D. OCON M.P., PAYA M., VILLAR A. Antihyperglycemic and insulin releasing effects of b-sitosterol 3-b-D-glycoside and its aglycone b-sitosterol. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 296, 224-231, 1988.
40. JEFFREY, C. 2007. *Compositae: Introduction with key to tribes*. Pages 61-87 in *Families and Genera of Vascular Plants*, vol. VIII, Flowering Plants, Eudicots, Asterales (J. W. Kadereit and C. Jeffrey, eds.). Springer-Verlag, Berlin.
41. KUTNEY J.P. et al. Process of isolating a phytosterol composition from pulping soap. US Patent 5770749, 1996.
42. KUTNEY J.P. et al. Sterol composition from pulping soap. CA Patent 2201328, 1995.

43. KUTNEY J.P., MILANOVA R.K., VASSILEV C.D., STEFANOV S., NEDELICHEVA, N.V. Process for the microbial conversion of phytosterols to androstenedione and adrostadienedione. WO Patent 99/49075, 1999.
44. MARTÍNEZ A, VALENCIA G, JIMÉNEZ N, MESA M, GALEANO E., 2008. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y Fitoquímica. Medellín, Colombia.
45. MARTÍNEZ. A., Esteroles. Monografía, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, abril, 2002.
46. MARLES J.R., FARNSWORTH N.R. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2, 137-189, 1995.
47. MOGHADASIAN M.H. Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations. *Life Sci.*, 67, 605-615, 2000.
48. MOREIRA R, CARLOS I, VILEGA W. 2001. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. *Biol Pharm Bull* 24:201-4.
49. MUÑOZ, D. 2008 Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad fungicida e insecticida de la especie *Piper eriopodon* (Piperaceae). Trabajo de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
50. OKUYAMA E, YAMAZAKI M. The principles of Tetragoniatetragonoides having an anti-ulcerogenic activity: Isolation and identification of sterylglucoside mixture (compound A). *J. Pharm. Soc. Jap.*, 103, 43-48, 1983.
51. PEDROZO J. 2001. Química y propiedades antimicrobianas de plantas autóctonas de paramos colombianos. Tesis de Grado para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.
52. PEGEL K.H. 1997. The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *South African J. Sc.*, 93, 263- 267.
53. POLLYANA L., Contribuicao ao estudo de espécies da familia *Rubiaceae*: Fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* AULB. Tesis de Grado para optar por el título de Magíster. Universidad federal de Goiás. Instituto de Química. 2009.

54. QUILEZ J., GARCÍA-LORDA P., SALAS- SALVADO J. 2003. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.*, 22, 343-51.
55. RAICHT R.F. et al. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.*, 40, 403-405, 1980.
56. RIESEBERG, L. H., et al. 2003. Major et al ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301: 1211-1216.
57. SCOOT G.,
www.afroaidsinfo.org/content/healthworkers/altmeds/camtreatment.pdf,
Complementary and alternative medicines (CAM) in the treatment of HIV/AIDS: Paper presented at the 1st. Int. IOCD-Symposium, Victoria Falls, Zimbabwe, 1996.
58. SILVERSTAIN M., BASSLER G., MORRYN T., 1983. *Identification of organic compounds*. Fourth Edition. John Wiley and sons. New York.
59. STEINBERG, D. AND PORAN, S.1999. The effect of extracellular polysaccharides from *Staphylococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils. *Archives of Oral Biology*, 44:437-444.
60. STEVENSON, I., The diffusion of disaster: The phylloxera outbreak in the department of the Herault, 1862–1880. *Journal of Historical Geography* 1980, 6, (1), 47-63.
61. STURM, H. Y RANGEL, O.1985. Ecología de los páramos andinos: una visión preliminar integrada. Instituto de Ciencias Naturales-Museo de Historia Natural, Biblioteca José Jerónimo Triana. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. No 9.
62. TAJIMA A. et al. Effects of Moristerol (anti-cholesterolaemic agent) on benign prostatic hypertrophy. *Hinyokika Kyo*, 29, 365-9, 1983.
63. TALAPATRA, S., BHOR, D. AND TALAPATRA, B. 1974. Flavonoid and terpenoid constituents of *Eupatorium odoratum*. *Phytochemistry*, 13:284-285.
64. TORRENEGRA,R; PEDROZO,J 1998. Identificación de sustancias antimicrobianas en hojas y raíces de cuatro especies colombianas utilizadas

por la medicina tradicional y perteneciente a los géneros *Pentacalia* y *Ageratina* (*Compositae-Asteraceae*). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Septiembre, 1998.

65. TORRENEGRA R, PEDROZO J, TELLEZ A, CABEZA G. 2000. Química y Actividad Antifúngica de *Pentacalia corymbosa* (Asteraceae-Senecioneae). *Revista Latinoamericana de Química*. 28: 31-343.
66. TRILLOS, C. 1992. Aislamiento de compuestos de *Pentacalia nítida*. Tesis de Grado para optar por el título de Magíster en Biología con énfasis en Fitoquímica. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.
67. VALDIR, A., AMANDA L. SA; Three new natural cyclopentenedione derivatives from *Piper carniconnectivum*, J. Braz. Chem. Soc. vol.15 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2004.
68. WESTSTRATE J.A., AYESH R. BAUER-PLANKC. AND DREWITT P.N. 1999. Safety evaluation of phytosterol-esters. Part 4: Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol enriched margarine. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1063-1071.
69. WHITTAKER D. 2000. *Interpreting organic spectra*. Royal Society of Chemistry. Cambridge.
70. YAMAMOTO M. et al. Anti-inflammatory active constituent of Aloe arborescens Miller. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1627-1629, 1991.
71. DANIELLE S. PINTO; ANNA CLAUDIA DE A; Metabólitos secundários isolados de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). *Rev. bras. farmacogn.* vol.18 no.3 João Pessoa July/Sept. 2008.

ESTUDIO DE HOJAS DE *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr COMO NUEVA FUENTE NATURAL DE SUSTANCIAS ESTEROIDALES Y CUMARINAS

Carlos Felipe Garibello^{1*}, Julio Armando Pedrozo¹

¹ Grupo de Investigación Fitoquímica (GIFUJ). Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. **Colombia**

* cgaribello@javeriana.edu.co

Resumen

Objetivo. Reconocer la especie *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr como una nueva fuente natural de sustancias esteroideas y cumarinas, contribuir al estudio quimiotaxonómico del género *Pentacalia*. **Materiales y métodos.** El material vegetal (hojas) se colectó en el páramo de Cruz Verde-Cundinamarca (Colombia). Se prepararon dos extractos uno en éter de petróleo y el otro en etanol (EtOH), al extracto etanólico se le realizaron dos fraccionamiento líquido-líquido (FL/L) uno con éter de petróleo y el otro con diclorometano (CH₂Cl₂), extractos y fracciones fueron trabajados con diferentes técnicas cromatográficas, los metabolitos aislados fueron identificados con base en sus propiedades físicas (punto de fusión y valor de R_f) reacciones químicas cualitativas y técnicas como Cromatografía de Gases acoplada a Masas (CG-MS), y Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C en una dimensión, dependiendo de la complejidad de cada una. **Resultados.** Del extracto éter de petróleo se aislaron dos cumarinas y dos mezclas de esteroides, las cumarinas 2-H-1-Benzopiren-2-ona (Cumarina) y 7-Hidroxi-6-metoxi-2-H-1-benzopiren-2-ona (Escopoletina) y las mezclas de esteroides Estigmasterol-7,16-dien-3-ol-Estigmasterol-Gamma sitosterol y Estigmasterol-Gamma sitosterol, de la fracción CH₂Cl₂ del extracto EtOH se aisló la Cumarina 6,7-dimetoxi-2-H-1-benzopiren-2-ona (Escoporona). **Conclusiones.** Se identificaron dos sustancias la Cumarina y el 7,16-dien-3-ol-Estigmasterol de las cuales no existen reportes de su presencia en la especie *Pentacalia*. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede catalogar a la especie *Pentacalia vaccinioides* como una nueva fuente natural de cumarinas y sustancias esteroideas. Estos resultados aportan información que enriquecen los criterios quimiotaxonómicos del género *Pentacalia*.

Palabras clave: Cumarinas, Esteroides, *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr.

Abstract

Aim. To recognize the *Pentacalia vaccinioides* specie (Kunth) Cuatr as a new natural source of steroidal and coumarine substances, to contribute to the chemical taxonomical study of the *Pentacalia* type. **Materials and Methods.** The plant material (Leaves) was collected in the "cruz verde" moor in Cundinamarca (Colombia) two extracts were prepared one in petroleum ether and other in ethanol

(EtOH) two liquid divisions (LD-L) were applied to the ethanolic extracts. One with petroleum ether and the other with dichlorine methane (CH₂Cl₂), extracts and divisions were worked with different chromatography techniques, the isolated metabolites identification was recognized based on their physical properties (melting point and R_f value) qualitative and chemical reactions and techniques like gas chromatography fitted in doughs (CG-MS) and the nuclear magnetic resonance of ¹H y ¹³C in a dimension depending on the complexity of each one.

Results. From the petroleum ether extract two cumarine and sterol cumarine mixtures were isolated the cumarine ones 2-H-1-Benzopyren-2-ona (Cumarine) and 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-Benzopyren-2-ona (scopoletine) and the sterol mixtures stigmasterol; 7,16-dien-3-ol-stigmasterol; gamma sitosterol and stigmasterol- gamma Sitosterol, from the division CH₂Cl from EtOH extract was isolated the cumarin 6,7-dimetoxi-2-H-1-benzopyran-2-ona (scoporona).

Conclusions. Were identified two substances, the 2-H-1-Benzopyren-2-ona (Cumarine) and 7,16-dien-3-ol-stigmasterol dine in which there are no reports of their presence in the *Pentacalia vaccinioides* specie can be catalogued a new natural source of cumarines and steroidal substances. These results support information than enrich the chemical taxonomical criteria of the *Pentacalia* type.

Key Words: Cumarines, Esterols, *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr.

Introducción

Pentacalia vaccinioides (Kunth) Cuatr. (Asteraceae-Senecioneae), son arbustos autóctonos de los páramos andinos colombianos (altitudes entre 2900-3100 m.s.n.m).

El género *Pentacalia* incluye un total de 217 especies, de las cuales casi la mitad están representadas en Colombia las cuales han sido poco estudiadas, sólo se reportan en la literatura los estudios de aceites esenciales de *P. ephiphytica*, *P. andicola*, *P. firmipes* y *P. archieri*, de los cuales se aislaron nerolidol, humuleno, farneseno, curcumeno, santaleno, germacreno D, varios cadinenos, cicloartenol, friedelina y 5-metoxieugenol. El grupo de investigación GIFUJ, ha trabajado con los extractos en éter de petróleo y etanol de hojas de *P.*

corymbosa y *P. ledifolia*, obteniendo sitosterol, eicosanol, friedelina, dos quinoles (jacaranona y metiljacaranona), dos cumarinas (escopoletina y 7-geraniloxilescopletina) y dos flavonoides (quercetina y rutina).

Después de un análisis cromatográfico y de pruebas químicas preliminares para algunas especies del género *Pentacalia* (*P. nítida*, *P. abietina* y *P. vaccinioides*) y cotejando con la información obtenida por el grupo de investigación GIFUJ de la Universidad Javeriana en otras especies del mismo género se ha encontrado en la especie *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr. la presencia de cumarinas y esteroides en cantidades representativas.

En esta investigación se tiene como objetivo principal reconocer la especie *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) Cuatr como una nueva fuente natural de sustancias esteroidales y cumarinas, y

contribuir al estudio quimiotaxonómico del género *Pentacalia*.

Materiales y métodos

Se tomaron 640 g del material vegetal (partes aéreas) seco que fueron extraídos mediante sistema continuo tipo soxhlet con éter de petróleo y etanol. El extracto etanólico se fraccionó por el método de separación líquido-líquido continuo con éter de petróleo y diclorometano. Extractos y fracciones a su vez fueron trabajadas mediante cromatografía en columna (sílica gel 60G) con éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo, puros y en mezclas de polaridad creciente; monitoreados mediante cromatografía en capa delgada.

Del extracto éter de petróleo se aislaron 4 sólidos Pv-1, Pv-2, Pv-3 y Pv-4, de la fracción diclorometano del extracto etanólico se aisló un sólido denominado como Pv-5.

El análisis se llevó a cabo por CG-MS en un equipo *Agilent* 6850 serie II, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975B, en la pontificia Universidad Javeriana, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (260°C, relación de *split* 15:1), y un inyector automático *Agilent* 6850 series. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida TR-50MS de 30 m x 0,25 mm (d.i) x 0,25 µm (df), con fase estacionaria 50% fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80°C (1 min), luego se incrementó hasta 310°C (2min) a 10°C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía

70eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285°C respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1mL/min. Los espectros de masa y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia a 4,75 scan s-1 en el rango de masas m/z 20-300 uma.

El reconocimiento de los compuestos presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos NIST-05

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica RMN-¹H y de carbono 13 RMN-¹³C, fueron tomados en un instrumento Bruker AM 400 de 400 Mega Hertz utilizando como solvente CD₃Cl en la Universidad Nacional de Colombia

RESULTADOS

Compuesto Pv-1

El compuesto **Pv-1** es un sólido blanco con peso 18,3mg el cual presentó un p.f de 68°C, el cual coincide con el reportado en la literatura para la 2H-1-Benzopiran-2-ona (Cumarina), (p.f lit. 67°C) tiene fluorescencia celeste bajo la luz U.V de onda larga, un R_f de 0,75 en placas de Sílica gel corridas con CHCl₃-MeOH 9,5:0,5. Se obtuvo a partir del extracto petrol, utilizando una columna con Sílica gel 60H y eluida con éter de petróleo y su pureza fue seguida mediante CCD.

EL cromatograma obtenido indica que este sólido es el 2H-1-Benzopiren-2-ona (Cumarina), con un tiempo de retención de 13,118 min, ion molecular $[M^{+}]$ m/z 146 de alta intensidad (70%), el pico base m/z 118 (100%) característico de este compuesto, se observa un pico de mediana intensidad m/z 90 (40%) y el resto de picos de baja intensidad.

El fragmento m/z 118 indica la pérdida de un grupo carbonilo (a partir del ion molecular), el fragmento a m/z 90 indica la pérdida de un grupo carbonilo, el fragmento a m/z 89 indica la pérdida de un radical H^{\bullet}

Con el ánimo de corroborar la identidad de la sustancia se realizó un análisis de la sustancia por Resonancia Magnética Nuclear, tomando el siguiente espectro de H^1 , (RMN- H^1).

El compuesto **Pv-1** fue identificado como 2-H-1- Benzopiran -2-ona (Cumarina); **RMN- H^1** (400 MHz, CD_3Cl , δ): 6,45 (1H, d, $J=9,5$ Hz), 7,73 (1H, d, $J=9,5$ Hz), 7,52 (1H, d, $J_1=7,84$ Hz; $J_2=1,71$ Hz; $J_3=0,53$ Hz), 7,35 (1H, d, $J_1=8,12$ Hz; $J_2=1,45$ Hz; $J_3=0,53$ Hz), 7,56 (1H, t, $J_1=8,12$ Hz; $J_1=7,68$ Hz; $J_2=1,71$ Hz), 7,31 (1H, t, $J_1=7,84$ Hz; $J_1=7,68$ Hz; $J_2=1,45$ Hz).

Compuesto Pv-2

El compuesto **Pv-2** es un sólido amarillo claro con peso 6,8 mg el cual presentó un p.f de 203°C, el cual coincide con el reportado en la literatura (p.f lit. 204°C) para la 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiran-2-ona (Escopoletina) presenta fluorescencia celeste bajo la luz

U.V de onda larga, un R_f de 0,70 en placas de Sílica gel corridas con $CHCl_3$ -MeOH 10:1.

Se obtuvo a partir del extracto petrol, utilizando una columna con Sílica gel 60H y eluida con petrol:Me₂CO (8,5:1,5) y su pureza fue seguida mediante CCD.

Escopoletina con un tiempo de retención de 18,997 min, ion molecular $[M^{+}]$ m/z 192 (100%), m/z 177(60%) de mediana intensidad característico de este compuesto, m/z 164 (20%) de baja intensidad, m/z 149 (40%) y el resto de picos de baja intensidad.

En el espectro de masa se observa el ion molecular m/z192 que corresponde con la fórmula $C_{10}H_8O_4$. El fragmento m/z 177 indica la pérdida de un grupo metilo (a partir del ion molecular), el fragmento a m/z 164 indica la pérdida de un carbonilo, el fragmento a m/z 149 corresponde a la pérdida de un fragmento de metilo (CH_3).

Compuesto Pv-3

Es un sólido amarillo (7,1 mg), obtenido a partir del extracto éter de petróleo; utilizando una columna utilizando con Sílica gel 60H y eluida con petrol: Me₂CO (7,5:2,5). Punto de fusión de 142° - 146°C, un R_f de 0,68 en Sílica gel, éter: Me₂CO 8:2, (Ver Figura 20) positivo a la prueba de Lieberman-Burchard, lo que permite suponer que se trata de uno o más esteroides.

Se obtuvo a partir del extracto éter de petróleo; utilizando una columna con Sílica gel 60 y eluida con éter de petróleo: Me₂CO (7,5:2,5).

Estigmasterol, con un tiempo de retención de 15.260 min, con una coincidencia del 95%; 7,16-dien-3-ol-Estigmasterol con un tiempo de retención de 15,567 min, con una coincidencia del 93%; Gamma sitosterol, con un tiempo de retención de 15.627 min, con un porcentaje de coincidencia del 99 %.

En los espectros de masas se puede observar la secuencia característica de fragmentación de esteroides, en la cual se obtienen fragmentos m/z 396, correspondientes a un fragmento del esteroide con una pérdida de 18 unidades debida a una molécula de agua, (proveniente del grupo OH de la posición 3), este fragmento sufre una nueva fragmentación dando origen al fragmento de m/z 255, el cual se forma por la pérdida de la cadena lateral unida al ciclo pentano perhidrofenanatreño; por otra parte, se ven claramente los fragmentos del esteroide obtenidos a partir de la pérdida de la cadena lateral por parte del esteroide original, sin pérdida aún de agua, 273 m/z y la posterior pérdida de 18 unidades debida a la molécula de agua, (proveniente del grupo OH de la posición 3),

Compuesto Pv-4

Es un sólido blanco (15.2 mg), obtenido a partir del extracto éter de petróleo; fue obtenido a partir de una columna utilizando Sílica gel 60H y eluida con petrol:Me₂CO (8:2). Punto de fusión de 139° - 143°C, un Rf de 0,56 en Sílica gel, éter:Me₂CO 8: 2, (Figura 27) positivo a la

prueba de Lieberman–Burchard, lo que permite suponer que se trata de uno o más esteroides.

Se obtuvo a partir del extracto éter de petróleo; utilizando una columna con Sílica gel 60 y eluida con éter de petróleo:Me₂CO (6,5:3,5).

. Estigmasterol, con un tiempo de retención de 15.269 min., m/z 412 (M⁺), m/z 255, m/z 93, con una coincidencia del 95%; gama Sitosterol, con un tiempo de retención de 15.624 min., m/z 414 (M⁺), m/z 145, m/z 43, con una coincidencia de 99%.

Compuesto Pv-5

El compuesto **Pv-5** es un sólido amarillo claro con peso 5,6 mg el cual presentó un p.f de 144°C el cual coincide con el reportado en la literatura para la 6,7-dimetoxicumarina (p.f lit. 142°C) fluorescencia celeste bajo la luz U.V de onda larga, un Rf de 0,75 en placas de Sílica gel corridas con CHCl₃-MeOH 9,5:0,5.

Se obtuvo a partir del extracto etanólico, utilizando una columna con Sílica gel 60H y eluida con éter de petróleo:Me₂CO (8,5:1,5) y su pureza fue seguida mediante CCD

El cromatograma indica que este sólido es 6,7 dimetoxi-2H-1-benzopyran-2-ona (Escoporona), con un tiempo de retención de 19,150 min, Ion molecular [M⁺] m/z 206 (100%), m/z 191 (40%) de mediana intensidad característico de este compuesto, m/z 163 (20%) de baja intensidad.

En el espectro de masa se observa el ión molecular a m/z 206 que corresponde con la fórmula $C_{11}H_{10}O_4$. El fragmento a m/z 191 indica la pérdida de un grupo metilo (a partir del ión molecular), el fragmento a m/z 163 indica la pérdida de monóxido de carbono.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las tres especies de *Pentacalia* (*P. nitida*, *P. abietina* y *P. vaccinioides*) estudiadas en los ensayos preliminares y cotejando con la información obtenida por el grupo de investigación GIFUJ en otras especies del mismo género se puede aseverar que las sustancias esteroidales y cumarínicas son comunes en el género *Pentacalia* y que es en la especie *P. vaccinioides* donde se presenta mayor concentración de estos metabolitos. De acuerdo a lo anterior los compuestos encontrados en las hojas de la especie *Pentacalia vaccinioides* representan un gran aporte al estudio fitoquímico de esta especie vegetal, de la cual no se conocen estudios, se realiza también un gran aporte quimiotaxonómico a la familia Asteraceae y en especial al género *Pentacalia* en cuanto a sustancias esteroidales y cumarinas.

Cumarinas

Se aislaron e identificaron tres Cumarinas y dos mezclas de esteroides, dos de las cumarinas (**Cumarina y Escopoletina**) y las mezclas de esteroides se aislaron del extracto etéreo, la otra cumarina (**Escoporona**) del extracto etanólico de

la fracción diclorometano, es el extracto etéreo con un rendimiento 5,85% de donde se aislaron la gran mayoría de los metabolitos secundarios de interés en esta investigación (cumarinas y esteroides).

La **Cumarina** es considerada el miembro más simple y el precursor, a su vez de las otras cumarinas 7-oxigenadas como la **Escopoletina** y la **Escoporona**, es la primera vez que se aísla la **Cumarina** en el género *Pentacalia* constituyéndose esto como uno de los aportes principales de esta investigación. La función principal de las cumarinas en las especies vegetales pertenecientes al género *Pentacalia* es actuar como un excelente mecanismo de defensa natural al ataque de bacterias, hongos e insectos, es por esto que se encontró en gran proporción en las hojas de la *Pentacalia vaccinioides*.

Las cumarinas son utilizadas como principios activos de algunos medicamentos como el Acenocumarol o Acenocumarina que es un anticoagulante que actúa inhibiendo la acción de la vitamina K o el Venalot que es utilizado en el tratamiento del edema vascular y/o linfático, además son utilizadas en la industria de la síntesis de aromatizantes y tiene una acción biológica reconocida como fotosensibilizadoras de la piel, antiespasmódica y vasodilatadora de coronarias, acción antiinflamatoria, antibacteriana, hipotérmica, analgésica y anticoagulante entre otras, de aquí su importancia a nivel económico y terapéutico.

La especie colombiana *Pentacalia vaccinioides* presenta tres cumarinas la **Cumarina**, **Escopoletina** y **Escoporona** en cantidades significativas todas con actividad biológica comprobada y con gran importancia económica, permitiendo catalogar esta especie como una nueva fuente natural de cumarinas, además estos resultados aportan información que enriquecen los criterios quimiotaxonómicos del género *Pentacalia*.

Esteroles

Los esteroides son sustancias que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se han reportado la presencia de diferentes sustancias esteroideas tales como estigmasterol en *P. pulchella*, β -sitosterol en *P. Corymbosa* y Cicloartanol en *P.nítida*. Los esteroides identificados en esta investigación fueron **Estigmasterol**, **7,16-dien-3-ol-Estigmasterol** y **Gamma sitosterol** contribuyendo con estos resultados al estudio fitoquímico y quimiotaxonómico del género *Pentacalia*.

En general, se ha ignorado la importancia relativa de los esteroides de origen vegetal, aunque a la mayoría no se les conoce actividad biológica específica en la naturaleza, excepto como componentes de las membranas celulares, se han reportado diversas acciones al ser ingeridos en determinadas dosis, entre ellas, reducción del colesterol sérico, inhibición del crecimiento en células de cáncer, antiinflamación, antipirética, liberación de insulina, e inmunomodulación.

Los esteroides son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, cosmética y

farmacéutica por sus propiedades físico-químicas y farmacológicas, se comercializan en varias formas, según sus aplicaciones. En la industria farmacéutica para la síntesis de principios activos como hormonas, corticoides, anticonceptivo, en la industria alimentaria se usan como nutracéuticos y como aditivos, en la industria de cosméticos en productos de tocador. Actualmente solo en Europa se comercializan con 3.000 toneladas de esteroides al año.

La especie colombiana *Pentacalia vaccinioides* presenta dos mezclas de esteroides compuestas por los esteroides **Estigmasterol**, **7,16-dien-3-ol-Estigmasterol** y **Gamma Sitosterol** en cantidades significativas comparadas con las fuentes naturales que se utilizan actualmente en la industria, permitiendo catalogar esta especie como una nueva fuente natural de sustancias esteroideas, además estos resultados aportan información que enriquecen los criterios quimiotaxonómicos del género *Pentacalia*.

CONCLUSIONES

Se encontraron dos nuevas sustancias 2-H-1- Benzopiren -2-ona (Cumarina) y 7,16-dien-3-Estigmasterol las cuales aportan información que enriquecen los criterios quimiotaxonómicos del género *Pentacalia*. Por lo tanto permite, catalogar a la especie *Pentacalia vaccinioides* como una nueva fuente natural de cumarinas y sustancias esteroideas.

Se logró identificar por diferentes técnicas cromatográficas y

espectroscópicas, dos compuestos cumarínicos conocidos como 2-H-1-Benzopiren -2-ona (Cumarina) y 7-Hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (Escopoletina) junto con tres compuestos esteroideos conocidos como Estigmasterol, 7,16-dien-3-ol-Estigmasterol y Gamma Sitosterol a partir del extracto éter de petróleo de la especie *Pentacalia vaccinioides*.

Del extracto etanólico de la especie *Pentacalia vaccinioides* y por diferentes técnicas cromatográficas y espectroscópicas, se logró identificar un compuesto Cumarínico conocido como 6,7-dimetoxi-2H-1-benzopiren-2-ona (escoporona).

BIBLIOGRAFIA

1. ADLERCREUTZ H., MAZUR W. 1997. Phytoestrogens and Western Diseases. The Finish Medical Society, DUODECIM, Ann. Med., 29, 95-120.
2. AWAD A.B., DOWNIE A., FINK C.S., KIM U. Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell grown in SCID mice. Anticancer Res., 20, 821- 824, 2000.
3. AWAD A.B. AND FINK C.S. Phytosterol as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. J. Nutr., 130, 2127-2130, 2000.
4. AWAD A.B., FINKS C.S., WILLIAMS H., KIM U. In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. Europ. J. Cancer Prev., 10, 507-513, 2001.
5. ANDREA M. DO NASCIMENTO; DIONEIA C.R. DE OLIVEIRA; Kaurene Diterpenes and Other Chemical Constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. J. Braz. Chem. Soc. vol.12 no.4 São Paulo July/Aug. 2001.
6. BERGES R.R., WIDELER J., TRAMPISCH H.J., SENGE TH. And the b-phytosterol study group. Randomised, placebo controlled, double blind clinical trial of b-phytosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. The Lancet, 345, 1529-1532, 1995.
7. BOHLMANN F, CASTRO V, ZIESCHE J 1984. New sesquiterpenes from *Pentacalia* species. *Rev Latinoamer Quím* 14:103-106.
8. BAEZ J., Espectrometría de masas de Cumarinas (estudio químico de cuatro plantas canarias). Tesis de grado para

- optar por el título de Químico. Universidad La Laguna. Escuela universitaria de ingeniería técnica industrial de las palmas. 1977.
- reimpresión R.M. King & H.W. Dawson 1975. Cassini on Compositae 3 vols. Oriole Editions, New York).
9. BOLLIGER H., BRENNER M., GANSHIRT H., SEILER H., STANHI E., WALDI D. 1965. Thin layer chromatography a laboratory handbook. Academic Press. Springer Verlag. 553 p.
 10. CABEZA, G. 1994. Metabolitos secundarios y actividad antifúngica de *Pentacalia corymbosa* (Benth) Cuatr. (Asteraceae-Senecioneae). Santafé de Bogotá. Tesis de Master en Biología. Universidad Javeriana.
 11. CAMPBELL, W., PROVAM, G. and WATERMAN, P. 1982. Simple coumarins from two populations of *Diosmaacmaephylla*. *Phytochemistry*, 21:1457-1458.
 12. CANNELL R., 1998. *Natural Products Isolation*. Humana Press. 472 p.
 13. CASSINI, H. 1827. Senecionées. En G.L. Cuvier, *Dictionnaire des Sciences Naturelles* 48: 446-466. (en
 14. Compositae (Asteraceae) (en inglés). *Major Groups, Families and Genera. The Royal Botanic Gardens, Kew.* (2004 en adelante).
 15. CORTES, D & ESCOBAR, M. 2001. Evaluación del efecto anti fúngico de sustancias obtenidas a partir de *Pentacalia corymbosa* (Benth) Cuatr (Guasquin) frente a *Botrytis cinérea* aislado de un cultivo de clavel. Trabajo de grado para optar el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 122 pp.
 16. DE STEFANI et al. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer*, 37, 140-4, 2000.
 17. DÍAZ, S. Y CUATRASAS, J. 1999. Asteraceas de la flora de Colombia Senecioneae. Géneros *Dendrophorbium* *Pentacalia*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

- Colección Jorge Álvarez Lleras No 12. Bogotá, Colombia. 25-26 p.
18. DÍAZ-PIEDRAHITA S. 1999. Asteraceas de la flora Colombiana: Senecioneae, géneros *Dendrophorbium* y *Pentacalia*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Santafé de Bogotá. 389 pp.
 19. DOMÍNGUEZ X. 1985. Métodos de investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México.
 20. DONALD P.R. et al. A randomised placebo controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1, 518-22, 1997.
 21. FORERO, C. 1994. Fitoquímica y actividad antimicrobiana de *Pentacalia pulchella*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá, Colombia. 186 p.
 22. GRANADOS A. 2000. Estudio químico comparativo de *Pentacalia* originarias de paramo, y evaluación de su actividad antifúngica. Tesis de Grado para optar por el título de Magister en Biología con énfasis en Fitoquímica. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.
 23. GUPTA M.B. et al. Anti-inflammatory and anti-pyretic activities of beta-sitosterol. *Planta Med.*, 39, 157-163, 1980.
 24. HANIFA MOURSI S.A. AND AL-KHATIB I.M. Effect of *Melia azedarach* fruits on ginseng-restraint stress-induced ulcers in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 36, 527-33, 1984.
 25. HARBORNE J., WILLIAMS C., 2000. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry*. Vol 55. p. 481 – 504.
 26. HENDRIKS H.F.J., WESTSTRATE J.A., VAN VLIET T., MEIJER G.M. 1999. Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Europ. J. Clin. Nutr.*, 53, 319-327.

27. HERZ, W., BHAT, S. and SANTHANAM, P. 1970. Coumarins of *Artemisa dracunculoides* and 3,6 – dimethoxy – 4,5,7 – trihydroxyflavone in *A. arctica*. *Phytochemistry*, 9:891-894.
28. KUTNEY J.P. et al. Sterol composition from pulping soap. CA Patent 2201328, 1995.
29. KUTNEY J.P., MILANOVA R.K., VASSILEV C.D., STEFANOV S., NEDELICHEVA, N.V. Process for the microbial conversion of phytosterols to androstenedione and adrostadienedione. WO Patent 99/49075, 1999.
30. MARTÍNEZ A, VALENCIA G, JIMÉNEZ N, MESA M, GALEANO E., 2008. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y Fitoquímica. Medellín, Colombia.
31. MARTÍNEZ. A., Esteroles. Monografía, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, abril, 2002.
32. MARLES J.R., FARNSWORTH N.R. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2, 137-189, 1995.
33. MOGHADASIAN M.H. Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations. *Life Sci.*, 67, 605-615, 2000.
34. MOREIRA R, CARLOS I, VILEGA W. 2001. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. *Biol Pharm Bull* 24:201-4.
35. PEDROZO J. 2001. Química y propiedades antimicrobianas de plantas autóctonas de paramos colombianos. Tesis de Grado para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.
36. SILVERSTAIN M., BASSLER G., MORRYN T., 1983. *Identification of organic compounds*. Fourth Edition. John Wiley and sons. New York.
37. TAJIMA A. et al. Effects of Moristerol (anti-cholesterolaemic agent) on

benign prostatic hypertrophy.
Hinyokika Kyo, 29, 365-9, 1983.

38. TALAPATRA, S., BHOR, D. AND
TALAPATRA, B. 1974. Flavonoid and
terpenoid constituents of *Eupatorium
odoratum*. *Phytochemistry*, 13:284-
285.

39. TORRENEGRA, R.; PEDROZO, J
1998. Identificación de sustancias
antimicrobianas en hojas y raíces de
cuatro especies colombianas
utilizadas por la medicina tradicional y
perteneciente a los géneros
Pentacalia y *Ageratina* (*Compositae-
Asteraceae*).

