

ESTUDIO QUÍMICO DE LOS TALLOS DE *Cinchona pubescens* Vahl

Elena Cóndor Cuyubamba¹, Brás H. de Oliveira², Karin Loayza Ochoa^{1,3},
Víctor Reyna Pinedo*

RESUMEN

De los tallos de *Cinchona pubescens* que fueron colectados en la localidad de Yuracmallo (a 1 380 msnm, distrito de San Juan de Oro, Provincia de Sandia, Dpto. Puno) se aisló la quinina, que fué identificada mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C y ¹H-¹H COSY. Además, se realizó el análisis cualitativo de sus metabolitos secundarios.

Palabras clave: Quinina; *Cinchona pubescens*; alcaloides quinolínicos.

CHEMICAL STUDY OF THE STEMS OF *Cinchona pubescens* Vahl

ABSTRACT

From the stems of the *Cinchona pubescens*, wich were collected in the locality Yuracmallo (Province of Sandia, Puno), quinine was obtained, wich was identified by the mass spectra, RMN¹H, RMN¹³C and ¹H-¹H COSY. Furthermore, the qualitative analysis of the secondary metabolites was done.

Key words: Quinine; *Cinchona pubescens*; quinoline alkaloids.

INTRODUCCIÓN

El “árbol de la quina” o “casarilla”, símbolo en el escudo nacional de nuestra riqueza vegetal, comprende varias especies del género *Cinchona*, entre ellas *C. officinalis*, *C. calisaya* y *C. pubescens*.

La importancia de las Cinchonas desde el siglo XVII se debió al uso de la corteza y, posteriormente, de sus alcaloides, en particular de la quinina, en el tratamiento de la malaria. Desde hace varias décadas la síntesis de compuestos alternativos a la quinina desplazó el interés por las cortezas de “quinas”. Sin embargo, en los últimos años ha surgido el interés por estas plantas debido a la resistencia que han desarrollado los parásitos de la malaria a los medicamentos de síntesis.

Las dos especies de *Cinchona* más estudiadas son la *C. officinalis* y *C. calysaya*; sus alcaloides han sido aislados y caracterizados, principalmente mediante HPLC¹. Se han aislado alrededor de 25 alcaloides entre las diversas especies de Cinchonas, siendo los más importantes la quinina y su estereoisómero quinidina. Estos dos alcaloides están entre los de mayor producción comercial: al año 1988 la producción estimada era de 300 a 500 toneladas por año, lo cual significa que debieron procesarse entre 5 a 10 mil toneladas de corteza de Cinchonas².

La quinina se usa contra la malaria, y en los últimos años ha recibido un renovado interés debido a que es el único compuesto antimalárico del que no se ha reportado resistencia del parásito *Plasmodium falciparum* y, por ello, se utiliza para combatir la malaria resistente al medicamento de síntesis cloroquina².

¹ Universidad Nacional de Ingeniería. Facultad de Ciencias. Av. Túpac Amaru 210 -Lima 25

² Universidad Federal de Paraná. Departamento de Química. Curitiba - PR - Brasil - CEP 81.531-990

³ Tesis de Licenciatura en Ciencias-Mención Química, Facultad de Ciencias - UNI

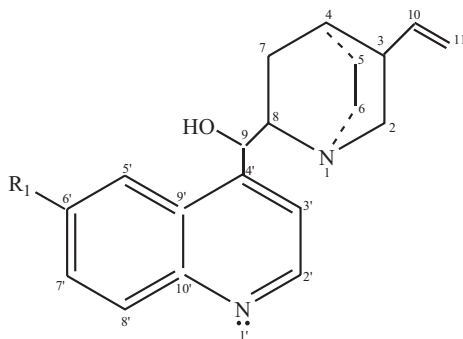
Aproximadamente el 60% de cortezas de Cinchona se utiliza en la producción de medicamentos y el 40% restante se utiliza principalmente en la industria de alimentos y bebidas, siendo el mayor producto las aguas tónicas (sabor amargo). También se utilizan estos alcaloides en síntesis de moléculas quirales².

Las últimas publicaciones referidas a *Cinchona pubescens* tratan del aislamiento e identificación de los alcaloides en diversos órganos de la planta obtenidos mediante cultivo celular^{3,4}.

Además de los alcaloides quinina (1a) y quinidina (1b), en las cortezas de Cinchona se encuentran sus análogos no metoxilados: cinconidina (1c) y cinconina (1d), figura 1. En la estructura de estos alcaloides quinolínicos se ha considerado la numeración de Rabe, la cual es la más utilizada en la literatura química y farmacológica², y es la que utilizaremos en este trabajo.

La gran importancia comercial de los alcaloides obtenidos de Cinchona ha conducido a llevar a cabo varios esquemas de síntesis total de la quinina; sin embargo, ninguna de ellas ha logrado tener un interés comercial. Asimismo, en los últimos años se ha realizado la producción de estos alcaloides mediante cultivos celulares de plantas, pero sin lograr resultados satisfactorios para su obtención a gran escala. Por lo tanto, el material vegetal continúa siendo la materia prima para la obtención de estos alcaloides.

El análisis cuantitativo realizado por Hoet, Gómez y Kanamori (1980)⁵ mediante el método de Bruselas – 1948 proporcionó 0,02% y 0,08% de alcaloides totales en dos muestras de *C. pubescens*, colectadas en la Convención (Cusco) y en San Ignacio (Cajamarca).



| | R1 | C-8 | C-9 | C-3 |
|----------------|-----------|---------------|---------------|---------------|
| 1a quinina | OMe | β H(S) | α H(R) | α H(R) |
| 1b quinidina | OMe | α H(R) | β H(S) | α H(R) |
| 1c cinconidina | H | β H(S) | α H(R) | α H(R) |
| 1d cinconina | H | α H(R) | β H(S) | α H(R) |

Figura 1. Principales alcaloides presentes en cortezas de Cinchona.

PARTE EXPERIMENTAL

El espectro de masas se registró en un espectrómetro de masas acoplado a cromatografía líquida, Applied Biosystems, modelo API300 (Laboratorio Central de Salud Pública de Paraná – LACEN/PR – Brasil); los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, Carbono, y $^1\text{H}-^1\text{HCO}\text{SY}$, se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DRX400 (400 MHz) (Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Minas Gerais - Brasil).

Material vegetal

La muestra de *Cinchona pubescens* fue colectada en la localidad de Yuracmallo (1380 msnm) ubicado en el distrito de San Juan de Oro (provincia de Sandía, Dpto. de Puno) el 12 de octubre de 2005, por la Blg. Joaquina Albán C. y nos fueron entregados en estado seco (estufa a 35 °C, 20 horas-2 días) en mayo de 2006. Esta muestra está depositada en el Herbario San Marcos (JAC 15821) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Los tallos se cortaron con tijera de podar y se pulverizó a grano fino en una picadora- molino “Moulinex” (750W), hasta malla 500 μm .

Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)

Los tallos de *Cinchona pubescens* se analizaron mediante los procedimientos de Rondina & Coussio (1969)⁶ y de Miranda (2002)⁷ encontrando que contienen: alcaloides (+++), aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), catequizas (+), taninos (++) , triterpenos y/o esteroides (+), quinonas, antraquinonas o antranoles (+), flavonoides (+) y saponinas (+). Estos resultados se confirmaron con las pruebas específicas de Villacrez (1995)⁸.

Aislamiento de la quinina

Extracción y separación*

El material seco y pulverizado (150g) se “desengrasó” con n-hexano (12x300mL) y después de dejar secar al ambiente se introdujo en un cartucho de tocuyo, que se dispuso en el cuerpo central del equipo soxhlet. Luego, la muestra se humedeció con una solución acuosa de amoníaco 15N (200mL) y se dejó en reposo durante dos horas. Sobre la muestra alcalinizada, dentro del cuerpo central del soxhlet, se adicionó 200mL de una mezcla de metanol-cloroformo (1:1) y se dejó macerar durante 24 horas. La solución adquirió un color marrón oscuro.

En el balón del equipo soxhlet se dispuso 900 mL de metanol-cloroformo-acetato de etilo (1:1:4), y se colocó a reflujo 6h/día, durante 35 días, hasta que el solvente en el cuerpo central del soxhlet dió test de Mayer negativo.

El extracto orgánico se concentró en el rotavapor (40°C, 300-400 mbar) hasta casi sequedad.

El extracto orgánico fue tratado con ácido sulfúrico 0,5N (4x200 mL), para formar las sales de alcaloides; y la solución ácida fue lavada con cloroformo (2x350 mL).

A continuación la solución ácida fue alcalinizada con una solución de amoníaco 7,5N (36 mL) (pH final = 9), realizando la separación de los alcaloides mediante su extracción con cloroformo (35x100 mL). El extracto orgánico se concentró en el rotavapor (30°C, 300-400 mbar) hasta casi sequedad. Sobre el residuo de alcaloides se agregó 100 mL de cloroformo y se volvió a concentrar a sequedad en el rotavapor, (30° C, 300-400 mbar), repitiéndose esta operación un total de cuatro veces. Esto tiene por objeto eliminar las bases volátiles (amoníaco, $\text{NH}_{3(\text{g})}$) que estuvieran disueltas en el extracto.

* Esta parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Ingeniería.

La eliminación del solvente orgánico en el rotavapor (30° C, 300-400 mbar) hasta sequedad proporcionó el extracto bruto de alcaloides, en forma de un sólido de color marrón oscuro (1,6 g). El análisis por CCF* nos indicó que el extracto contiene quinina.

Purificación cromatográfica**

La purificación del extracto bruto de alcaloides-EBA (1,6 g) se realizó mediante dos técnicas cromatográficas: Primero por cromatografía en columna a vacío-CCV del EBA, seguida de cromatografía en capa delgada centrifugada –CCDC (4 ensayos consecutivos) de las fracciones purificadas (que contenían el alcaloide quinina).

Cromatografía en columna a vacío, CCV

La cromatografía en columna a vacío del EBA (1,6g) se realizó en una columna (h = 38 cm, = 5 cm) que contenía 90 g (h = 15 cm) de adsorbente sílica gel 60 para CC (porosidad 0,040-0,063).

El EBA se disolvió en 5mL de cloruro de metileno y se dispuso en la columna, agregándose como eluyente acetato de etilo (200 mL, fracción N° 1), seguido de 200 mL de mezclas de acetato de etilo con cantidades crecientes de metanol (10%, fracción N° 2; 20%, fracción N° 3, etc.), hasta agregar metanol puro (fracción N° 12), recibiendo las fracciones en balones de 500 mL. Todas las fracciones tenían una coloración amarilla y se llevaron a sequedad en el rotavapor (40-50 °C). De las 12 fracciones obtenidas, la quinina se presentó parcialmente pura en las fracciones N° 3 y N° 4 con un total de 741 mg (eluentes: 20% y 30% de metanol en acetato de etilo, respectivamente).

Cromatografía en capa delgada centrifugada, CCDC***

Las fracciones purificadas por CCV (741 mg) se sometió a cromatografía en capa delgada centrifugada CCDC-N°1, obteniéndose quinina impura (fracción N° 16-19, 231 mg), la cual se sometió a una segunda cromatografía CCDC-N° 2, obteniéndose nuevamente quinina impura en las fracciones N° 3-7 (180 mg). Una tercera elución cromatográfica, CCDC-N° 3, proporcionó nuevamente quinina impura, (fracción N° 3-5, 133 mg), la cual, finalmente, fue purificado mediante CCDC-N°4, obteniéndose quinina pura (14 mg) en las fracciones N° 17-26.

Estas cuatro secuencias cromatográficas se resumen a continuación:

1 CCDC N° 1

- i Muestra a purificar: fracciones N° 3-4 (741 mg) obtenido de CCV (Sec. a).
- ii Resultados: Se obtuvieron 23 fracciones de 15 mL c/u.

Las fracciones N° 16-19 (231 mg) contenía quinina impura ****.

2 CCDC N° 2

- i Muestra a purificar: fracciones N° 16-19 (231 mg) de CCDC N° 1

* CCF: placas de sílica gel 60 F 254, eluyente: cloroformo-acetona-amoníaco (10:17:1); Revelador: UV; Rf (quinina = 0,62).

** Esta parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y Biotransformaciones de la Universidad Federal de Paraná, Curitiba (Brasil) (Del 2 al 29 de octubre de 2007).

*** Equipo utilizado: Cromatotrón Modelo 7924 T, Harrison Research.

**** El análisis de las fracciones se realizó mediante CCF: adsorbente: Placas de aluminio, Kieselgel 60F- 254, 0,2mm; eluyente acetona : CHCl₃: NH₃ 15N (17:10:1)

ii Resultados: Se obtuvieron 20 fracciones de 10 mL c/u.

Las fracciones N° 3-7 (180 mg) contenía quinina impura.

3 CCDC N° 3

i Muestra a purificar: fracciones N° 3-7 (180 mg) de CCDC N° 2

ii Resultados: Se obtuvieron 32 fracciones de 10 mL c/u.

Las fracciones N° 3-5 (133 mg) contenía quinina impura.

4 CCDC N° 4

i Muestra a purificar: fracciones N° 3-5 (133 mg) de CCDC N° 3

ii Resultados: Se obtuvieron 20 fracciones de 10 mL c/u.

Las fracciones N° 17-26 (14 mg) contenía quinina pura*.

Las condiciones de trabajo y el procedimiento de separación fueron similares para las cuatro eluciones cromatográficas y a continuación se describe lo realizado para la purificación final de la quinina (CCDC - N° 4).

Condiciones de trabajo

i Muestra: fracciones N° 3-5 (133 mg) obtenida en CCDC N° 3.

ii Placa de vidrio = 24 cm, sílica gel grado 7749 con yeso e indicador de fluorescencia; espesor de la placa 1mm.

(Observación.- sólo en la primera placa, CCDC N° 1, el espesor fue de 2 mm).

iii Eluente **: acetato de etilo: CH₂Cl₂: NH_{3(ac)} 15N (10:1:0,2) y metanol.

iv Revelador: Luz UV (254 y 360 nm); se dispuso como patrón quinina pura.

Procedimiento

i Se humedeció la placa haciendo pasar el eluente, luego se adicionó la muestra disuelta en 0,5 mL de etanol.

ii Se adicionó 320 mL de acetato de etilo: diclorometano: NH₃, 15N (10:1:0,2).

iii Finalmente, se adicionó 50 mL de metanol, con la finalidad de lavar la placa.

iv Se colectaron 32 fracciones de 10 mL cada una (tubos 100x15 mm), la mayoría de las cuales eran incoloras. Las fracciones N° 17-26 (14 mg) proporcionaron un sólido blanco, cuyo análisis por RMN¹H y CCF nos indica que se trata de quinina pura.

* De acuerdo a CCF y RMN¹H.

** Los eluentes para las otras eluciones cromatográficas fueron:

- CCD N° 1: CH₂Cl₂: NH_{3(ac)} 15N (10:0,3); CH₂Cl₂: AcEt: NH_{3(ac)} 15N (75:75:4,5)

Ac.Et: NH_{3(ac)} 15N (150:4,5) y metanol.

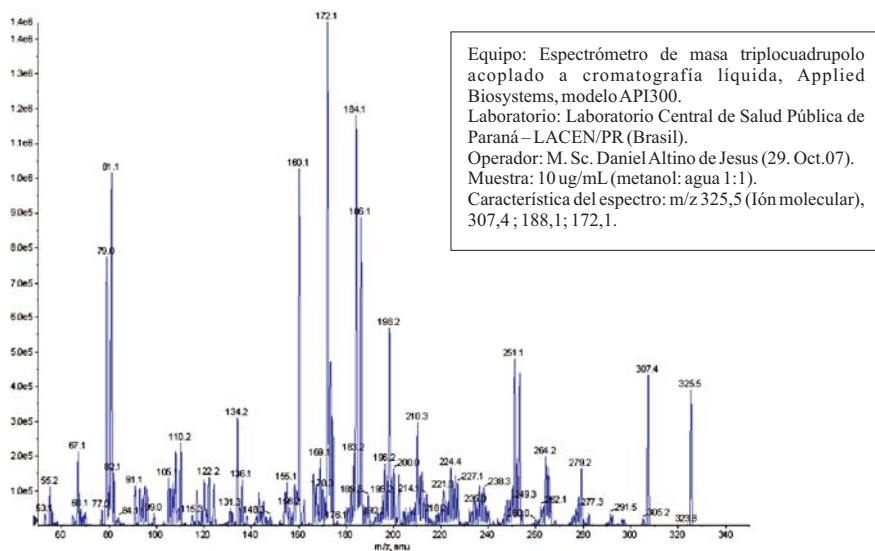
- CCD N° 2: Metanol: Ac.Et.: NH_{3(ac)} 15N (2:8:0,1) y metanol.

- CCD N° 3: AcEt: NH_{3(ac)} 15N (5:0,2) y metanol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

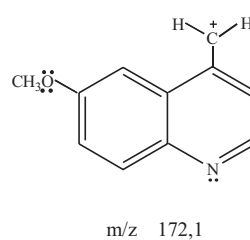
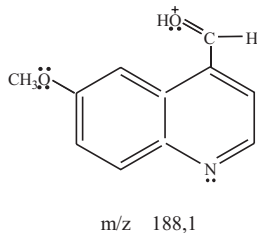
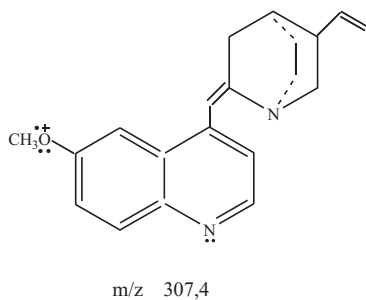
(Identificación espectroscópica de la quinina)²

Espectro de Masas. Espectro 1

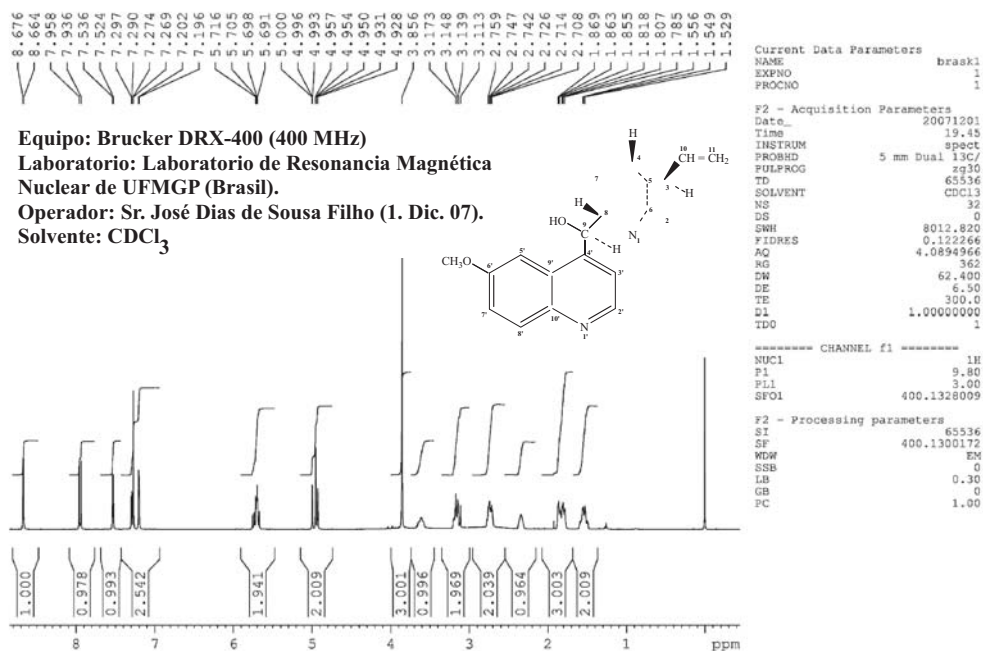
Espectro 1. Espectro de masas de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*.

Características del espectro: m/z : 325,5 (ion molecular, $M^+ + 1$), 307, ($M^+ - H_2O$): 255,1; 188,1; 172,1 (pico base), 160,1; 81,1.

Los fragmentos que corresponden a los iones m/z 301,4, m/z 188,1 y m/z 172,1 son los siguientes:



Espectro de RMN¹H (400MHZ en CDCl₃). Espectro 2



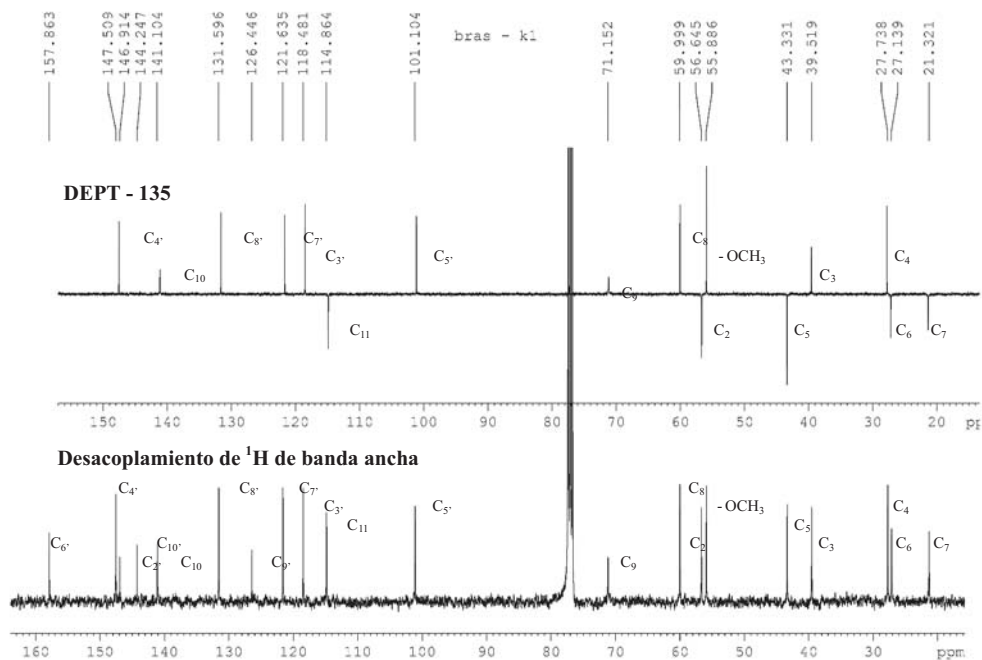
Espectro 2. Espectro de RMN¹H (400MHZ) de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*.

Características del espectro

δ (ppm): 1,52 ppm (m, H-7 eq)^{*}; 1,54 ppm (m, H-5eq), 1,71 ppm (m, H-6ax^{*}); 1,84 ppm (m, H-4); 1,86 ppm (m, H-7ax); 2,70 ppm (s ancho, H-3); 2,73 ppm (m, H-2 eq); 2,75 ppm (m, H-6 eq); 3,12 ppm (m, H-2ax); 3,15 ppm (m, H-8); 3,17 ppm (m, H-6ax); 3,85 ppm (s, -OCH₃); 4,95 ppm (d, H-11 gem); 4,97 ppm (d, 11 gem); 5,69 ppm (d, H-9); 5,70 ppm; (m, H-10); 7,19 ppm (s, H-5'); 7,28 ppm (d, H-7'); 7,52 ppm (d, H-3'); 7,94 (d, H-8'); 8,66 ppm (d, H-2').

Este espectro corresponde a lo esperado para la estructura de la quinina y es similar a lo publicado precedentemente^{2,9}.

^{*} eq = ecuatorial
 ax = axial

Espectro de RMN¹³C (400MHZ en CDCl₃). Espectro 3

Espectro 3. Espectro de RMN¹³C de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*.

a) EPT 135. Características del espectro

* Señales para arriba (11):

i Carbonos primarios (CH₃): δ (ppm): 55,8 (-OCH₃).

ii Carbonos terciarios (CH): δ (ppm): 27,7 (C₄); 39,5 (C₃); 59,9 (C₈); 71,1 (C₉); 101,1 (C₅); 119,4 (C₃); 121,6 (C₇); 131,6 (C₈); 141,1 (C₁₀); 147,5 (C₄).

* Señales hacia abajo (5): carbonos secundarios (CH₂): δ (ppm): 21,3 (C₇); 27,1 (C₆); 43,3 (C₅); 56,6 (C₂); 114,8 (C₁₁).

b) Desacoplamiento de ¹H de banda ancha. Características del espectro

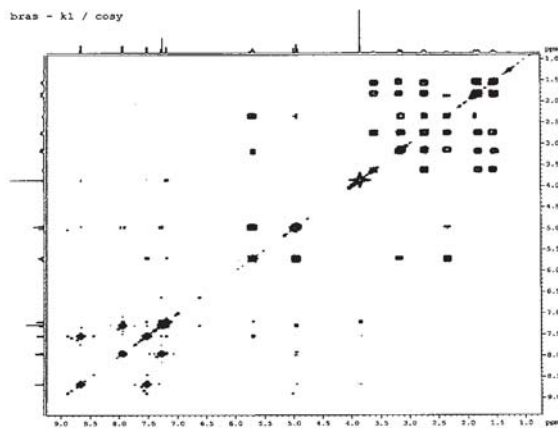
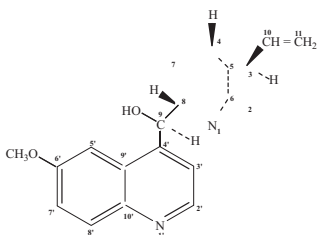
En este tipo de espectro aparecen todos los carbonos:

δ (ppm): 21,3 (CH₂); 27,1 (CH₂); 27,7 (CH); 39,5 (CH); 43,3 (CH₂); 55,8 (-OCH₃); 56,6 (CH₂); 59,9 (CH); 71,1 (CH); 101,1 (CH-aromático); 114,8 (CH₂ vinilo); 119,4 (CH - aromático); 121,6 (CH - aromático); 126,4 (C-aromático); 131,5 (CH-aromático); 141,1 (CH vinilo); 144,2 (C-aromático); 146,9 (C-aromático); 147,5 (CH-aromático); 157,8 (C-aromático).

La asignación de los valores de desplazamiento químico son análogos a lo publicado precedentemente.²

Espectro 2D ^1H - ^1H COSY (400 MHz en CDCl_3). Espectro 4

Equipo: Bruker DRX-400 (400 MHz)
Laboratorio: Laboratorio de Resonancia
Magnética Nuclear de UFMGP (Brasil).
Operador: Sr. José Dias de Sousa Filho
(1. Dic. 07). Solvente: CDCl_3



Espectro 4. Espectro 2D ^1H - ^1H COSY (400 MHz) de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*

Características del espectro

| H (δ ppm) | Hidrógenos correlacionados |
|--------------------------|---|
| H-7eq (1,52) | H-5ax (1,71), H-4 (1,84), H-7ax (1,86) |
| H-5 eq (1,54) | H-6 eq (2,75), H-8 (3,15), H-6ax (3,17) |
| H-5 ax (1,71) | H-6 eq (2,75), H-6ax (3,17) |
| H-4 (1,84) | H-3 (2,70) |
| H-7ax (1,86) | H-8 (3,15) |
| H-2 eq (2,73) | H-11 gem (4,95-4,97) |
| H-8 (3,15) | H-9 (5,69) |
| -OCH ₃ (3,85) | H-5' (7,19) |
| H-11 gem (4,95-4,97) | H-10 (5,70) |
| H-9 (5,69) | H-3' (7,52) |
| H-7' (7,28) | H-8' (7,94) |
| H-3' (7,52) | H-2' (8,66) |

CONCLUSIONES

- A partir de los tallos de *Cinchona pubescens* se aisló la quinina, la cual se identificó mediante sus espectros de masas, RMN^1H , RMN^{13}C , ^1H - ^1H COSY.
- Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) presentes en los tallos de *Cinchona pubescens* según el procedimiento de Rondina Coussio (1969) y Miranda (2002), habiéndose verificado la presencia de: alcaloides (+++), aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), taninos (++), triptenos y esteroides (+), quinonas antroquinonas o antronoles (+), catequinas (+), flavonoides (+) y saponinas (+).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Bióloga Joaquina Albán (profesora principal y jefa del Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos) por habernos proporcionado el material vegetal y por su determinación botánica; a la M.Sc. Virginia Torpoco Carmen por la elucidación de los espectros de RMN¹H y RMN¹³C; al Instituto General de Investigación de la UNI y al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias (UNI) por el apoyo económico que nos brindaron, para la realización de todo este trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Keene, A. et al., Investigation of Cinchona leaf alkaloids by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography* 1983; **260**: 123-128.
2. Verpoorte, R. et al., "Cinchona Alkaloids", in: Brossi, A. (Ed), *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*, Ac. Press, Inc., 1988, **Vol. 34**. 331-334; 358-369.
3. Verpoorte, R. et al. The effects of plant growth regulators and culture conditions on the growth and the alkaloid content of callus cultures of *Cinchona pubescens*. *Planta Médica* 1982; **46**: 15-18.
4. Verpoorte, R. et al. Identification of alkaloids and anthraquinones in *Cinchona pubescens* Callus cultures; the effect on plant growth regulators and light on the alkaloid content. *Planta Médica*. 1984; **50**: 17-20.
5. Hoet, P. Gomez, A. y Kanamori, C. et al., Estudio cuantitativo de los alcaloides en *Cinchona* (*Rubiaceae*) del Perú. *Boletín Soc. Quím. (Perú)* 1980; **46**: 298-309.
6. Rondina R., y Coussio, J. Estudio Fitoquímico de Plantas medicinales. Revista de Investigaciones Agropecuarias-INTA (Argentina) 1969; Serie 2, Vol VI, **33**: 351-366.
7. Miranda, M., "Métodos de Análisis de Drogas y Extractos", Ed. Universidad de la Habana, La Habana, 2002.
8. Villacrez, O., Victor, "Bioactividad de plantas amazónicas", Ed., Abyala, Ecuador, 1995, 154-171.
9. Mills, T. et al., *Instrumental Data for Drug Analysis*, Volumen 4, Taylor Francis. Group-CRC Press, 3^o Ed., 2006, pág. 2745.