

ESTUDIO QUÍMICO DE LOS TALLOS DE CINCHONA PUBESCENS

CHEMICAL STUDY OF CINCHONA PUBESCENS STEMS

Karin Loayza O.¹, Brás H. de Oliveira², Elena Cóndor C.¹ y Víctor Reyna P.¹

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú;

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

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 fue 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.

ABSTRACT

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

Keywords: Quinine; *Cinchona pubescens*; quinoline alkaloids.

INTRODUCCION

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

Las dos especies más estudiadas son *Cinchona calisaya*, *Cinchona officinalis*, sus alcaloides han sido aislados y caracterizados por HPLC [1]. Se han aislado más de 25 alcaloides siendo la quinina y quinidina los alcaloides más importantes. Entre estos dos se ha obtenido la mayor producción comercial: al año 1988 la producción estimada era de 300 a 500 toneladas por año, lo cual significa que debieron procesar entre 5 a 10 mil toneladas de corteza de *Cinchona*s [2].

La importancia de las *Cinchona*s 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. Más adelante, hace ya 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 un renovado interés por estas plantas 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 cloroquina [2].

Los extractos de esta planta fueron introducidos como agentes médicos en el siglo XVII en Europa, luego que la condesa de Chinchón, esposa del virrey español en el Perú, fuera tratada y curada de la malaria. Linneo introdujo la denominación latina *Cinchona* en honor de dicha condesa en el año 1638 (Epperson *et al.*, 1995).

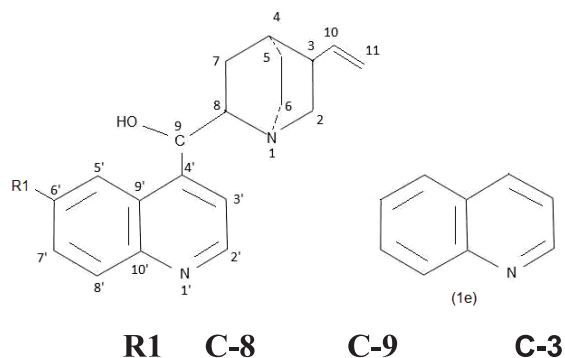
El uso de plantas del género *Cinchona* fue muy difundido y explotado en particular por sus propiedades febrífugas y antipalúdicas, por la presencia de alcaloides en la corteza, siendo explotadas en las expediciones llamadas cinchoneras.

En el Perú se bebe la decocción en casos de arritmias cardiacas, fiebre, calambres musculares, resfríos e indigestión. La etnia campa-asháninka, perteneciente a la Amazonia peruana, emplea la decocción de corteza en el tratamiento de paludismo, reumatismo y diarreas. En la Amazonia Boliviana se emplea la corteza raspada y hervida con alcohol, como remedio antidiarreico.

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].

Los alcaloides quinina (1^a) y quinidina (1^b), en la corteza de Cinchona se encuentran metoxilados: cinconidina (1^c) y cinconina (1^d), 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 farmacológica [2], y es la que utilizaremos en este trabajo.

El análisis cualitativo realizado por Hoet, Gómez y Kanamori (1980) [4] mediante el método de Bruselas – 1948 proporciono 0,02% y 0,08% de los alcaloides totales en dos muestras de *Cinchona pubescens*, colectada en la Convención (Cusco) y en San Ignacio (Cajamarca).



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)
1e estructura básica de los alcaloides quinolínicos.				

Figura 1. Principales alcaloides presentes en corteza 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 y Carbono, ¹H-¹H COSY, se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DRX400 (400MHz) (Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Minas Gerais – Brasil)

Materia Vegetal

La muestra de *Cinchona pubescens* fue colectada en Yuracmallo (1 380msnm) ubicada en el distrito de San Juan de Oro (Provincia de Sandia, Dpto. Puno) el 12 de Octubre de 2005, por la Blga. Joaquina Albán C. y nos fueron entregadas 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 de San Marcos. Lima.

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

Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)

Los tallos de *Cinchona pubescens* se analizaron mediante los procedimientos de Rondina & Coussio (1969) [5] y de Miranda (2002) [6] encontramos que contienen: Alcaloides (+++), aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), catequinas (+), taninos (++) , triterpenos y esteroides (+), quinonas, antraquinonas o antranoles (+), flavonoides y saponinas. Estos resultados se confirmaron con las pruebas específicas de Villacrez (1995) [2] .

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

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

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 900ml 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 dio test negativo de Mayer.

El extracto orgánico se concentró en el rotavapor (40°C, 300-400mbar) hasta casi obtener sequedad. El extracto orgánico fue tratado con ácido sulfúrico 0,5N (4x200ml), para formar las sales de alcaloides; y la solución ácida fue lavada con cloroformo (2x350ml).

A continuación la solución ácida, fue alcalinizada con una solución de amoníaco 7,5N (36ml) (pH final = 9), realizando la separación de los alcaloides mediante su extracción con cloroformo (35x100ml). El extracto orgánico se concentró en el rotavapor (30°C, 300-400mbar) hasta lograr casi sequedad. Sobre el residuo de alcaloides se agregó 100ml de cloroformo y se volvió a concentrar a sequedad en el rotavapor, (30°C, 300-400mbar), repitiéndose esta operación un total de cuatro veces. Esto tiene por objeto eliminar las bases volátiles (amoníaco, $\text{NH}_{3(g)}$) que estuvieran disueltas en el extracto.

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

Purificación cromatográfica

La purificación del extracto bruto de alcaloides –EBA (1,6g) 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 (1,6 g) se realizó en una columna (h=38cm, $\phi = 5\text{cm}$) que contenía 90 g (h=15cm) de

absorbente 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 (200ml, fracción N° 1), seguido de 200ml 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 500ml. 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 741mg (eluentes: 20 % y 30% de metanol en acetato de etilo, respectivamente).

Cromatografía en capa delgada centrifugada, CCDC

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

Estas cuatro secuencias cromatográficas se resumen a continuación:

CCDC N° 1

i.- Muestra a purificar: fracciones N° 3-4 (741mg) obtenido de CCV.

ii.- Resultados: se obtuvieron 23 fracciones de 15 ml c/u. las fracciones N° 16-19 (231mg) contenían quinina impura*.

CCDC N° 2

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

ii.- Resultados: se obtuvieron 20 fracciones de 10mL c/u. Las fracciones N° 3-7 (180mg) contenían quinina impura*.

CCDC N° 3

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

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

*El análisis de las fracciones se realizó mediante CCF: adsorbente: Placas de aluminio, Kieselgel 60F-254, 0,2mm; eluyente acetona: $\text{CHCl}_3:\text{NH}_3$ 15N (17:10:1).

ii.- Resultados: se obtuvieron 32 fracciones de 10ml c/u. Las fracciones N° 3-5 (133mg) contenían quinina impura.

CCDC N° 4

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

ii.- Resultados: se obtuvieron 20 fracciones de 10ml c/u. Las fracciones N° 17-26 (14mg) contenían quinina pura**.

Las condiciones de trabajo y el procedimiento de separación fueron similares para las cuatro eluciones cromatográficas. 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 (133mg) obtenida en CCDC N°3.

ii.- Placa de vidrio = 24cm, 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 2mm).

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

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

Procedimiento

i.- Se humedeció la placa haciéndose pasar el eluyente, luego se adicionó la muestra disuelta en 0,5ml de etanol.

ii.- Se adicionó 320ml de acetato de etilo:diclorometano: NH_{3(ac)} 15N(10:1:0,2).

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

iv.- Se colectaron 20 fracciones de 10 ml cada una (tubos 100x15mm, la mayoría de las cuales eran incoloras. Las fracciones N° 17-26 (14mg) proporcionaron un sólido blanco, cuyo análisis por RMN¹H y CCF nos indica que se trata de la quinina pura.

**De acuerdo a CCF y RMN¹H.

*** Los eluentes para las otras eluciones cromatográficas fueron: CCDCN°1:CH₂Cl₂:NH_{3(ac)}15N(10:0,3);CH₂Cl₂:AcEt:NH_{3(ac)} 15N (75:75:4,5).

CCDCN°2: Metanol:AcEt: NH_{3(ac)}15N(2:8:0,1) y metanol.
CCDCN°3: AcEt: NH_{3(ac)}15N(5:0,2) y methanol.

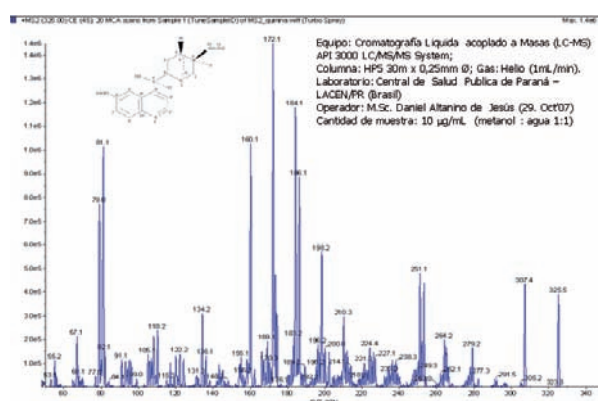
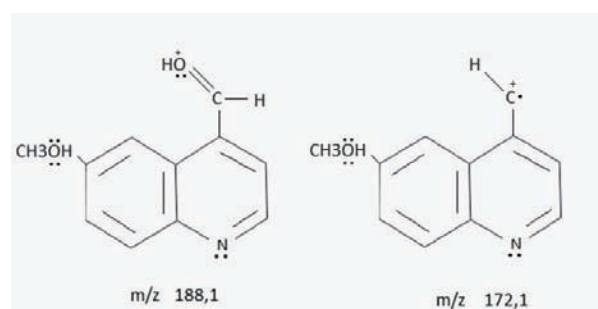
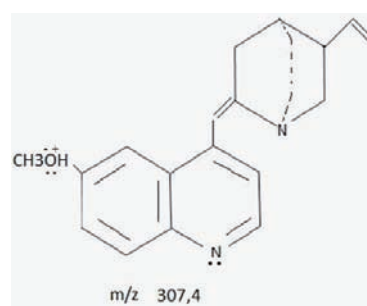
RESULTADOS Y DISCUSION

(Identificación espectroscópica de la quinina)²

Espectro de Masas. Espectro 1

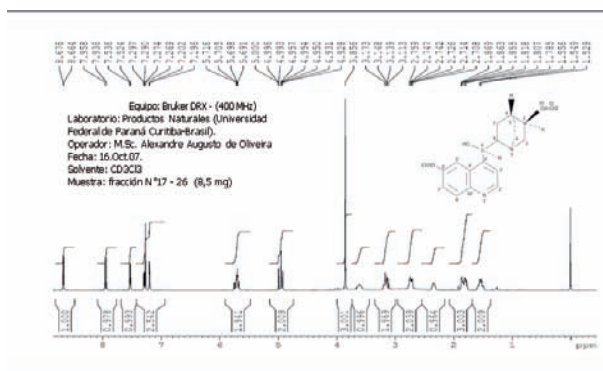
Características del espectro: m/z 325.5 (ión molecular, M⁺ + 1), 304,4 (M⁺- H₂O): 255,1; 188,1; 172,1 (pico base), 160,1; 81,1.

Los fragmentos que corresponden a los iones m/z 307,4; m/z 188,1 y m/z 172,1 son los siguientes:



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

**Espectro de RMN¹H (400 MHz en CDCl₃).
Espectro 2**



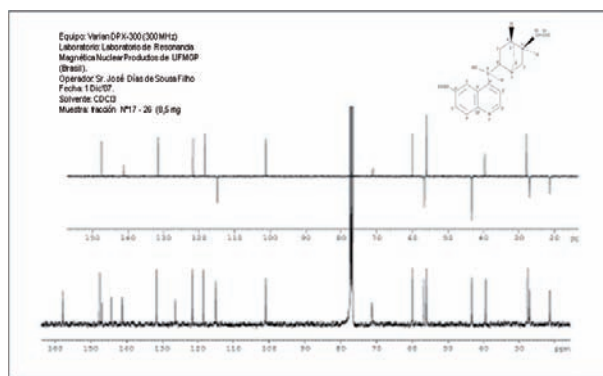
Espectro 2. Espectro de RMN¹H (400MHz) de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*

Características del espectro:

δ (ppm): 1,52 ppm (m, H-7eq*); 1,54 ppm (m, H- 6eq); 1,71 ppm (m, H-6 ax*); 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-5 eq); 3,12 ppm (m, H-2ax); 3,15 ppm (m, H-8); 3,17 ppm (t ancho, H-5ax); 3,85 ppm (s, -OCH₃); 4,95 ppm (d, H-11 gem); 4,97 ppm (d, H-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] [8].

**Espectro de RMN¹³C (400 MHz en CDCl₃).
Espectro 3**



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

*eq = ecuatorial
ax = axial

a) Características del espectro DEPT-135
Señales hacia 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); 118,4 (C₃); 121,6 (C₇); 131,6 (C₈); 141,1 (C₁₀); 147,5 (C₄).
- Señales hacia abajo (5): carbonos secundarios (CH₂): δ (ppm): 2,13 (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:

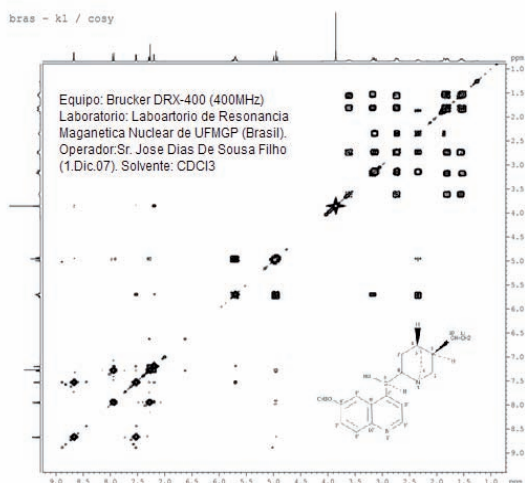
δ (ppm): 21,3 (CH₂); 27,1 (CH₂); 27,7 (CH); 43,3 (CH₂); 55,8 (O-CH₃); 56,6 (CH₂); 59,9 (CH); 71,1 (CH); 101,1 (CH-aromático); 114,8 (CH₂ vinilo); 119,4 (CH-aromático); 121,6 (CH-aromático); 126,4 (C-aromático); 131,5 (CH-aromático); 141,1 (CH-vinilo); 144,2 (C-aromático); 146,9 (C-aromático); 147,5 (CH-aromático); 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 CDCl₃).
Espectro 4**

Características del espectro

H (δ ppm) correlacionado	Hidrógenos
H-7eq (1, 52)	H-6ax(1,71); H-4(1,84); H-7ax (1,86)
H-6eq (1, 54)	H-5eq(2,75); H-8(3,15); H-5ax(3,17)
H-6ax (1, 71)	H-5eq(2,75), H-5ax(3,17)
H-4 (1, 84)	H-3 (2, 70)
H-7 ax (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-11gem (4, 95-4, 97)	H-10 (5, 70)
H-9 (5, 69)	H - 3' (7, 52)
H-7' (7, 28)	H - 8' (7, 94)
H3' (7, 52)	H- 2' (8, 66)



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

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 y ^1H - ^1H COSY.

Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) presentes en los tallos de la *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, triterpenos y esteroides, quinonas, antraquinonas, antronas o antranoles, saponinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, aminoácidos libres o aminas en general.

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 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 RMN ^1H , RMN ^{13}C , al Instituto 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.

REFERENCIAS

- [1] Keene, A. et al., J. of Chromatography, 260,123-128 (1983). "Investigation of Cinchona Leaf Alkaloids by High Performance Liquid Chromatography". Content of Callus Cultures of Cinchona pubescens".
- [2] Verpoorte, R. et al., "Cinchona Alkaloids", in: Brossi, A. Ed., The Alkaloids Chemistry and Pharmacology, vol. 34, Academia Press, 1988, pag. 358-369.
- [3] Verpoorte, R. et al. J. of Medicinal, vol. 46, pag. 15-18 (1982). " The effects of Plant Growth Regulators and Culture Conditions on the Growth and the Alkaloid Content of Callus Cultures of Cinchona pubescens".
- [4] Hoet, P. Gómez, a. Kanamori, C. et al., Estudio Cuantitativo de los alcaloides en Cinchona (Rubiaceae) del Perú. Boletín Soc. Quim. (Perú); 46, 298-309 (1980).
- [5] Rondina R. y J. Coussio. Revista de Investigación Agropecuaria. INTA, Buenos Aires- Argentina, 1969, Serie 2. vol. VI. Nº 22. pag. 351-366.
- [6] Miranda, M., Farmacognosia y Productos Naturales, Universidad de La Habana, Cuba, 2002, pág. 41-49.
- [7] Villacrez, O., Víctor, Bioactividad de Plantas amazónicas, Ed., Ab Yala, Ecuador, 1995, pag. 154-171.
- [8] Mills, T. et al., Instrumental Data for Drug Analysis, vol. 4, Taylor & Francis. Group CRC Press, 3° Ed., 2006, pag. 2744-2745.

E-mail: jessy_uni9@hotmail.com