

Universidad Nacional de Ingeniería

Facultad de Ciencias



TESIS

Estudio químico de los tallos de “Cinchona”

(Pubescens Vahl)

Para obtener el grado de licenciado en ciencias con mención en
Química.

ELABORADO POR:

Karin Jessica Loayza Ochoa

 **0009-0003-3516-4064**

ASESOR

Dr. Víctor Manuel Reyna Pinedo

 **0000-0003-1806-9834**

LIMA – PERÚ

2023

Citar como:	Loayza Ochoa [1]
Referencia	[1] K. Loayza Ochoa, “Estudio químico de los tallos de “Cinchona” (Pubescens Vahl)” [Tesis de licenciatura]. Lima (Perú):
Estilo IEEE	Universidad Nacional de Ingeniería, 2023.

Citar como:	(Loayza, 2023)
Referencia	Loayza K. (2023). Estudio químico de los tallos de “Cinchona”
Estilo APA (7ma ed.)	(Pubescens Vahl). [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Ingeniería]. Repositorio institucional UNI.

Dedicatoria

A Dios, que ilumina mi camino y guía mi vida. A mis hijos, que son mi motivación de seguir adelante. A mis padres, que siempre están apoyándome.

A toda mi familia, que tanto quiero y admire

Agradecimientos

Agradezco especialmente a mi asesor de tesis, Dr. Víctor Reyna Pinedo, profesor principal de la Facultad de Ciencias, por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

A los miembros del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, en especial a la M.Sc. Elena Córdor C., por los constantes apoyos que me brindaron durante las diferentes etapas de la realización de esta tesis; a la Dra. Joaquina Albán (Universidad Nacional Mayor de San Marcos) por la determinación botánica del material vegetal.

Asimismo, agradezco al Dr. Brás H. de Oliveira y a su grupo de investigación, por el apoyo incondicional y las facilidades que se me brindaron durante mi estadía en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Paraná (Curitiba-Brasil), en la obtención del alcaloide puro y en la identificación, utilizando técnicas espectroscópicas de Masas, y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H), Carbono (RMN¹³C) y ¹H-¹H COSY;

También deseo agradecer a la Dra. Ingrit Collantes Díaz por las referencias bibliográficas brindadas.

De igual manera, agradezco al Instituto General de Investigación de la UNI y al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias-UNI, por el apoyo económico que me brindaron, para la realización de todo este trabajo de investigación.

Finalmente, quiero agradecer al personal del laboratorio N° 12 y a todos los compañeros, amigos que me han apoyado en este presente trabajo.

Resumen

El “árbol de la Quina” o “Cascarilla” símbolo en el escudo nacional de nuestra riqueza vegetal, comprende especies del género *Cinchona*, entre ellas *Cinchona calisaya*, *Cinchona officinalis* y *Cinchona pubescens*. La Quina (*C. pubescens*) se emplea en la medicina tradicional peruana, y sus constituyentes puros (alcaloide de tipo quinolinico, quinina) se utilizan como antimalárico, para calambres musculares, reumatismo resfríos e indigestión. Silva, I., et al.(2009) reporta el análisis cuantitativo de quinina, basado en el espectro de UV de Sulfato de quinina, Mesa, A., et al. (2013) reporta la extracción, aislamiento y la purificación (análisis espectroscópico) del principal alcaloide presente en la Quina (*C. pubescens*) de los tallos y la corteza, colectadas en Antioquia, Colombia.

En nuestro laboratorio hemos realizado el secado, la molienda, el análisis cualitativo de los tallos de la Quina(*C. pubescens*), y el análisis cualitativo. Además, realizamos la determinación cuantitativa del totalde alcaloides de los tallos de la Quina (*C. pubescens*), habiéndose obtenido 0,66 % (procedimiento Pharmacopoeia 5.0 – 2005). Mesa, A., et al. – 2013 realizaron el análisis cuantitativo de quinina, presente en corteza y tallos, de la *Cinchona pubescens* reportando resultados en cuatro extractos, el más alto rendimiento fue de 1,49 %.

El análisis fitoquímico que realizamos, nos indicó la presencia de alcaloides, aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, taninos, triterpenos y esteroides, quinonas antroquinonas o antranoles, catequinas, flavonoides y saponinas. En la estadía realizadaal laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Paraná (octubre del 2007) se aisló la quinina de los tallos de la Quina, habiéndose caracterizado mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C y ¹H-¹H COSY.

Palabras Clave: *Cinchona pubescens*, Quina, quinina, marcha fitoquímica, total de alcaloides.

Abstract

The “Quina tree” or “Cascarilla”, symbol on the national coat of arms of our plant wealth, includes species of the Cinchona genus, including Cinchona calisaya, Cinchona officinalis and Cinchona pubescens. Quina (*C. pubescens*) is used in traditional Peruvian medicine, and its pure constituents (quinoline alkaloid, quinine) are used as an antimalarial, for muscle cramps, rheumatism, colds and indigestion. Silva, I., et al. (2009) reports the quantitative analysis of quinine, based on the UV spectrum of Quinine Sulfate, Mesa, A., et al. (2013) reports the extraction, isolation and purification (spectroscopy analysis) of the main alkaloid present in Cinchona (*C. pubescens*) from the stems and bark, collected in Antioquia, Colombia.

In our laboratory we have carried out the drying, grinding, qualitative analysis of the Cinchona (*C. pubescens*) stems, and qualitative analysis. In addition, we carried out the quantitative determination of the total alkaloids of the stems of Quina (*C. pubescens*), having obtained 0.66% (Pharmacopoeia 5.0 procedure – 2005). Mesa, A., et al. – 2013 carried out the quantitative analysis of quinine, present in the bark and stems, of Cinchona pubescens, reporting results in four extracts, the highest yield was 1.49%.

The phytochemical analysis that we carried out indicated the presence of alkaloids, primary and/or secondary amino groups, free phenolic groups, tannins, triterpenes and steroids, quinones, anthroquinones or anthranols, catechins, flavonoids and saponins. During the stay at the Natural Products Laboratory of the Federal University of Paraná (October 2007), quinine was isolated from the stems of Quina, having been characterized by its Mass spectra, NMR1H, NMR13C and 1H-1H COZY.

Key words: *Cinchona pubescens*, Quina, quinine, phytochemical march, total alkaloids.

Tabla de Contenido

Resumen	v
Abstract	vi
Capitulo I. Parte introductoria del trabajo	1
1.1 Objetivos del Estudio	1
1.1.1 Objetivo general	1
1.1.2 Objetivos específicos	1
1.2 Antecedentes de Investigación	2
1.2.1 Composición Química de los tallos de Cinchona	2
1.2.2 Aislamiento de la quinina de los tallos de <i>C. pubescens</i>	5
1.2.3 Identificación clásica de la quinina	8
1.2.4 Identificación espectroscópica de la quinina	8
1.2.5 Biosíntesis de la Quinina	25
1.2.6 Síntesis de la quinina	26
Capitulo II. Marco teorico y conceptual	28
2.1 Marco Teorico	28
2.1.1 Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)	28
2.1.2 Test de alcaloides	31
2.1.3 Análisis Cuantitativo de alcaloides	31
2.1.4 Aislamiento de alcaloides	35
2.1.5 Purificación de los alcaloides	39
2.1.6 Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (Reyna – 2011)	41
Capitulo III. Desarrollo del Trabajo de Investigacion	50
3.1 Presentación	50
3.2 Metodología de Investigación para el Estudio Químico (Alcaloides) de Plantas Medicinales	51
3.3 Trabajo Preliminar	52
3.3.1 Selección y recolección de la planta. Tallos de Cinchona . pubescens	52
3.3.2 Estudio etnobotánico y Etnomedicinal	52
3.3.3 Determinación sistemática (identificación botánica)	53
3.3.4 Estudio bibliográfico	53
3.4 Trabajo Experimental en el Laboratorio (Alcaloides)	53
3.4.1 Secado y molienda de la planta.	53
3.4.2 Análisis cualitativo (Marcha Fitoquímica)	53

3.4.3	<i>Análisis cuantitativo de alcaloides</i>	54
3.4.4	<i>Aislamiento de la quinina</i>	59
3.4.5	<i>Identificación Espectroscópica de la quinina.</i>	67
Capitulo IV. Analisis y Discusion de Resultados		79
Conclusiones		80
Recomendaciones		81
Referencias bibliograficas		82
Anexos		89

Indice de Figuras

Figura 1. Principales alcaloides presentes en los tallos y corteza de la Quina	4
Figura 2. Espectro de masas (ESI-MS2) de la quinina (Kudlacek, K., et al. – 2017)	9
Figura 3. Espectro de masas (EI) de la quinina (NIST Chemistry WebBook - 2014)	10
Figura 4. Espectro de Masas de la quinina (Data for Drug Analysis, 3 rd Ed. 2006).	10
Figura 5. Espectro de Masas de la quinina (Damien, R. et al. – 2006)	11
Figura 6. Espectro de Masas de la quinina (EI) (Fujiwara, H., et al -1987)	12
Figura 7. Espectro de Masas de la quinina (EI) (Furner, R. et al. – 1981)	12
Figura 8. Ecuaciones de fragmentación de los principales picos del espectro de masas de la quinina	14
Figura 9. Numeración de la estructura de la Quinina para los átomos de hidrógeno	15
Figura 10. Espectro RMN ¹ H de la Quinina (Mills, T., et al., - 2006)	16
Figura 11. Espectro RMN ¹ H (300MHz) en CDCl ₃ de la Quinina (Uccello, G., et al.- 1992)	17
Figura 12. Numeración de la estructura de la Quinina para los átomos de Carbono.	19
Figura 13. Espectro 1H 1D and 2D COSY (500MHz) en CDCl ₃ de la Quinina (Lin, L., et al.- 2016)	23
Figura 14. Espectro DQF-COSY (300MHz) en CDCl ₃ de Quinina (Uccello, G., et al. 1992)	24
Figura 15. Espectro UV de la quinina (Zidan, M., et al. – 2016)	24
Figura 16. Espectro UV de la quinina (Frosch, T., et al. – 2007)	24
Figura 17. Espectro UV de la Quinina (Mills, T., et al., 2006)	25
Figura 18. La ruta de la biosíntesis de la quinina (Mulder, Th., et al., 1982)	26
Figura 19. Woodward-Doering/Rabe-Kindler Síntesis total de Quinina (Seeman, J., -2007)	27
Figura 20. Esquema del Principio de Cromatografía en Capada Delgada Centrifugada (Stahl, 1982)	40

Figura 21. Ejemplos de Sistemas Conjugados.....	48
Figura 22. Orbitales moleculares presentes en el grupo carbonilo, C=O.....	49
Figura 23. Exceso de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_{4(ac)}$	57
Figura 24. Asignaciones de los átomos de hidrogeno en la quinina.	70
Figura 25. Asignación de los átomos carbono en quinina.	73
Figura 26. Ubicación de protones de la quinina en espectro rango de 0 a 9,0 ppm.	77
Figura 27. Ubicación de protones de la quinina en espectro rango de 0 a 9,0 ppm.	78
Figura 28. Espectro 4. Espectro 2D $^1H-^1H$ COSY (400MHz) de la quinina	78

Indice de Tablas

Tabla 1. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de hidrogeno en el espectro de RMN ¹ H de la Quinina en CDCl ₃ y derivado (Acetato de quinina).....	18
Tabla 2. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de carbono en el espectro de RMN ¹³ C de la Quinina.....	21
Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de carbono de los grupos CH, CH ₂ y CH ₃	22
Tabla 4. Correlación COSY (500 MHz) y constante de acoplamiento (Hz) para la quinina en CDCl ₃	23
Tabla 5. Máximos y mínimos de absorción para la quinina.....	25
Tabla 6. Comparación del método de determinación cuantitativa de alcaloides descrito por Pelt et al.-1967 y tesis k. loayza-2021	34
Tabla 7. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna a vacío.....	65
Tabla 8. Datos del espectro RMN ¹ H de la quinina (400 MHz) en CDCl ₃	70
Tabla 9. Desplazamientos químicos δ (ppm), de átomos de carbono de la Quinina en CDCl ₃	74
Tabla 10. Correlación COSY y constantes de acoplamientos 1H-1HCOSY de la Quinina.	76

Índice de Espectros

Espectro 1.	Espectro de Masas de la Quinina obtenida a partir de los tallos de la Quina (<i>C. pubescens</i>).....	69
Espectro 2.	RMN ¹ H de la Quinina obtenida a partir de los tallos de Quina (<i>C. pubescens</i>).....	71
Espectro 3.	RMN ¹³ C - DEPT 135 de la Quinina obtenida a partir de los tallos de la Quina.....	75

Lista de Abreviaturas

°C	Grado centígrado
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
δ	Desplazamiento químico
DEPT	Transferencia por polarización aumentada y no distorsionada
DMSO	Dimetilsulfóxido
ε	Absortividad molar
EBA	Extracto Bruto de Alcaloides
EBO	Extracto Bruto Orgánico
EM	Espectrometría de masas
Eq	Equivalente
Eq-g	Equivalente gramo
Et ₂ O	Éter etílico
EtOH	Etanol
eV	Electronvoltio
G	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión/Cromatografía Líquida de Alta Performance
L	Litro
λ máx	Longitud de onda máxima
M	Molaridad
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa/carga
M ⁺	Ión molecular
Mbar	Milibar

MeOH	Metanol
meq	Miliequivalente
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Militro
N	Normalidad
N°	Número
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanómetro
P. f.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
% T	Porcentaje de transmitancia
TMS	Tetrametilsilano
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
u ⁻¹	Número de onda
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear

Introducción

En los países en vías de desarrollo la fitoterapia es una alternativa accesible, ventajosa y natural para cualquier médico. El Perú ostenta el privilegio de poseer condiciones climáticas y topográficas excepcionales, a tal punto que en toda su extensión territorial contamos con 84 de las 103 zonas reconocidas de vida en la tierra; 28 climas de 32 existentes en el mundo. Por ello, la importancia de realizar estudios de nuestras plantas medicinales.

Para llevar a cabo la investigación, los químicos orgánicos de plantas medicinales han establecido un método general que consta de dos partes:

En primer lugar, tenemos que elegir la planta que queremos estudiar, tomar la muestra, identificar botánicamente la planta y obtener toda la información sobre ella en el campo y en la biblioteca.

La segunda parte trata de la investigación química de las plantas medicinales, que incluye el aislamiento y la identificación por métodos espectroscópicos (espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear), de la molécula o moléculas presentes en mayor cantidad o aquellas de mayor actividad biológica.

Cuando inicié este trabajo de investigación (junio del 2006), en la línea de Química Orgánica de Productos Naturales, sobre el estudio químico de alcaloides presentes en los tallos de la Quina (*Cinchona pubescens*), constituyó para mí el repaso de los cuatro cursos básicos semestrales de Química Orgánica, así como de los cursos de Proyecto de Tesis I, CQ 561 y Proyecto de Tesis II CQ 562, y del curso electivo Química de los Productos Naturales CQ 046, este conjunto de conocimientos me permitió aprender (i) qué compuestos están presentes,

(ii) porcentaje de alcaloide presente y (iii) cuáles son los principales alcaloides en los tallos de la Quina.

En este trabajo de tesis se incluyó las siguientes actividades:

Trabajo experimental en el laboratorio químico, realizado en el laboratorio de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175), ubicado en el Laboratorio

de Química Inorgánica N°12 (pabellón C) de la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería, que comprendió la molienda de los tallos de la Quina (*Cinchona pubescens*), análisis cualitativo (marcha fitoquímica), análisis cuantitativo (determinación potenciométrica) y la obtención del extracto bruto de alcaloides, EBA.

La purificación de EBA y la obtención del alcaloide Quinina, y su identificación mediante el análisis de los espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN¹H, RMN¹³C, ¹H-¹H COSY), se realizó durante mi estadía en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Paraná situada en Curitiba (Brasil) en el mes de octubre del 2007, bajo la dirección del Dr. Brás H. de Oliveira.

Análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos de los tallos de la Quina (*C. pubescens*) y de la quinina.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el Congreso Iberoamericano de Química, XXIV Congreso Peruano de Química (Cusco, Octubre – 2008); publicados en la revista de la Sociedad Química del Perú (Loayza, K. et al., 2009) y se presentó en el Encuentro Científico Internacional 2010 (Perú, Enero – 2010).

La redacción de esta tesis se inició en los meses de abril a junio del 2009 concluyendo la parte experimental y gran parte de la introducción teórica. Lamentablemente, diversos acontecimientos familiares hicieron que interrumpiera este trabajo de redacción (noviembre del 2010).

El requerimiento actual de contar con la colegiatura como Químico me dio la decisión y dedicación de tiempo para concluir por fin la redacción de esta tesis y su presentación respectivamente a la Facultad de Ciencias – UNI.

Es por esa razón que al retomar la redacción de esta tesis tuvimos que realizar el estudio bibliográfico de las publicaciones realizadas desde el año 2009, trabajos que han sido considerados en esta tesis.

Capítulo I. Parte introductoria del trabajo

1.1 Objetivos del Estudio

1.1.1 *Objetivo general*

El objetivo principal de esta tesis es aislar e identificar el alcaloide principal de los tallos de la Quina (*C. pubescens*).

El aislamiento implica las etapas de extracción por solventes, separación y purificación. Por lo tanto, se describirán los diversos métodos de extracción de alcaloides publicados en las referencias, las pruebas cualitativas para detectar los alcaloides, la aplicación de la cromatografía en capa fina como método inicial de la identificación y la purificación mediante la cromatografía en columna y capa delgada centrifugada. También, describiremos el uso de la espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear, de Hidrógeno-RMN¹H, de Carbono-RMN¹³C y ¹H-¹H COSY, en la identificación de la estructura molecular.

Las diversas etapas de la metodología de trabajo del estudio químico de alcaloides presentes en una planta, es análogo para el estudio de cualquier clase de compuestos orgánicos (metabolito secundario) contenido en un producto natural.

1.1.2 *Objetivos específicos*

- i. El aislamiento e identificación (espectroscópica) de la quinina, principal alcaloide presente en los tallos de la Quina (*Cinchona pubescens*),
- ii. El análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los metabolitos secundarios presentes en los tallos de la Quina, y
- iii. La determinación cuantitativa del total de alcaloides contenidos en los tallos de dicha planta.

1.2 Antecedentes de Investigación

Estudios Químicos Precedentes Relativos A Los Tallos De La “Quina” (Cinchona Pubescens).

La Quina o Cascarilla, comprende varias especies del género Cinchona, entre ellas *C. officinalis* (o *C. ledgeriana*, *Cinchona amarillo*), *C. calisaya*, *C. pubescens* (o *C. succirubra*, *Cinchona roja*). Se han aislado alrededor de 25 alcaloides en diversas especies de Cinchonas, siendo los más importantes la quinina y su estereoisómero quinidina. 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 que no ha reportado resistencia del parásito *Plasmodium falciparum* y por ello, se utiliza para combatir la malaria resistente al medicamento de síntesis de cloroquina. Además de su aplicación en estereoquímica y síntesis asimétrica. (Kacprzak - 2013, Alonso - 2004).

1.2.1 Composición Química de los tallos de Cinchona

a) Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)

El análisis fitoquímico se refiere a la determinación cualitativa de los *metabolitos secundarios o productos naturales*¹ presentes en plantas o cualquier organismo vivo, basado en la extracción con solventes apropiados y en el uso de pruebas de coloración y precipitación.

En las referencias revisadas no se ha encontrado ningún trabajo de análisis cualitativo de los tallos o corteza de la *Cinchona pubescens*. Sin embargo, diversos autores reportan el aislamiento de diversos constituyentes químicos (productos naturales) diferentes a los alcaloides.

Así Raffauf, R. et al. - 1978, reportan el aislamiento del ácido quinóico y de su glucósido 3-ramnosido de los tallos de *C. pubescens* (colectado en Bogotá,

¹ Metabolitos Secundarios o Productos naturales: se refiere a los compuestos orgánicos de estructura variada presentes en los organismos vivos, que tienen una distribución restringida y característica a determinada especie. Por ejemplo, los alcaloides, taninos, quinonas, triterpenos y esteroides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonoides, saponinas, etc.

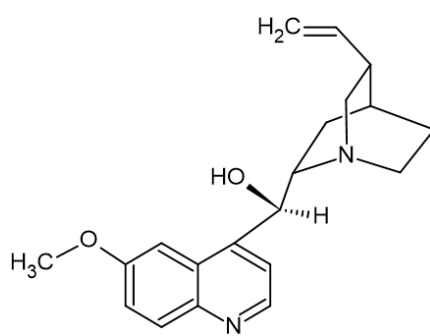
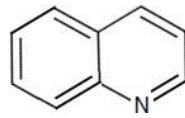
Colombia), mientras que Noriega et al. – 2015 reporta compuestos fenólicos y flavonoides (apigenina, quercetina, catechina y kaemfenol) en la corteza de *C. pubescens Vahl* (colectada en Pichincha, Ecuador).

b) Principales alcaloides presentes en los tallos y corteza de la Quina (Cinchona sp.)

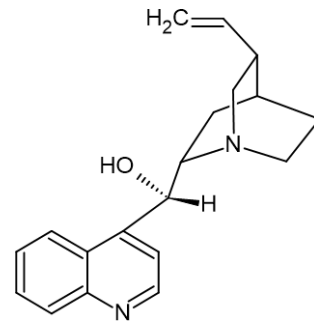
Para propósitos comerciales, las tres principales especies de *Cinchona* son: *C. pubescens Vahl* (ò *C. Succirubra Pav. ex Klotsch, Cinchona roja*), *C. Officinalis* (ò *C. ledgeriana Moens ex Trimen, Cinchona amarilla*), y *C. Calisaya Wedd*, en razón del alto contenido de alcaloides en la corteza (Kacprzak, K. – 2013, 609).

El análisis de las diferentes especies de *Cinchona* (de sus cortezas) muestra que la quinina 1 es el alcaloide más abundante, siendo el 50-90% del total de alcaloides, los otros tres alcaloides son la cinchonina 2, la quinidina 3 y la cinchonidina 4. La estructura de estos 4 alcaloides de la *Cinchona* se presenta en la Figura 1, en la cual se incluye la estructura básica de la quinolina. Además de estos 4 alcaloides se han aislado de las cortezas de Quina una veintena de alcaloides de estructuras químicas relacionadas (Kacprzak, K. – 2013, 611).

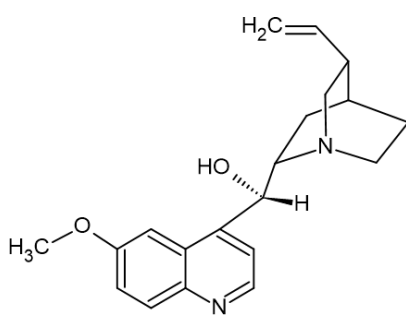
Quinolina



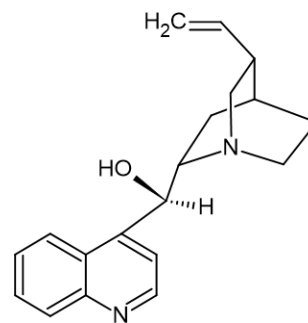
1 Quinina



2 Cinconina



3 Quinidina



4 Cinconidina

Figura 1. Principales alcaloides presentes en los tallos y corteza de la Quina

c) **Análisis Cuantitativo de alcaloides en las cortezas (tallos) de *C. pubescens***

En la bibliografía hemos encontrado dos reportes relativos al análisis cuantitativo del total de alcaloides presentes en las cortezas (tallos) de *C. pubescens*.

- i. Hoet, P. *et al.* – 1980 reportan porcentajes muy bajos para el contenido de alcaloides totales en las cortezas de *C. pubescens* provenientes de los distritos de Echarate (La Convención – Cusco) y la Coipa (San Ignacio – Cajamarca): 0.02 y 0.08%, respectivamente, aplicando el Método de Bruselas 1949: La muestra molida se basifica con una solución de CaO + NaOH; luego se extrae en Soxhlet con benceno, hasta test de Mayer negativo. Se concentra hasta 20 mL de extractos y se agrega HCl(ac). Se completa la eliminación del benceno residual, se filtra, se lava y la disolución ácida se titula con NaOH(ac).
- ii. Mesa, M. *et al.* – 2013 reportan la cuantificación de quinina en extractos de tallos de *C. pubescens*, colectada en la ciudad de Medellín (Colombia): 1,49%.

1.2.2 Aislamiento de la quinina de los tallos de *C. pubescens*

El aislamiento de alcaloides del material vegetal por lo general se lleva a cabo por “extracción en ácidos” o con “solventes orgánicos” (en medio básico) siendo la “extracción por solvente” el procedimiento más común e involucra las siguientes etapas: (Reyna, V. – 2013)

- i. Extracción sólido - líquido del material vegetal
Obtención del Extracto Bruto Orgánico - EBO
- ii. Separación líquido - líquido del EBO
Obtención del extracto Bruto del Alcaloide – EBA

iii. Purificación del EBA

Obtención del alcaloide puro

A continuación, presentamos dos trabajos que siguen esta metodología de extracción con solventes orgánicos: Mesa, A. et al. – 2013 y Staba, E. et al. – 1981.

a) Procedimiento de Mesa A, et al. – 2013.

“Cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona pubescens* y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica”

• **Muestra utilizada**

i. Muestra: Tallos de *C. pubescens* colectada en Medellín (Antioquia, Colombia).

• **Extracción sólida – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**

i. El material vegetal se llevó a un proceso de percolación hasta agotamiento utilizando etanol destilado como solvente, luego se somete a una extracción ácida.

• **Separación líquido - líquido (Obteniéndose el Extracto de Alcaloides Totales, EBA)**

ii. El extracto ácido se basicifica a pH = 9 y extracción con diclorometano.

• **Purificación e identificación de la quinina**

iv. Se realiza cromatografía en columna flash con fase estacionaria Silica Gel, iniciando con 100 % de hexano y luego con gradientes hexano: acetato de etilo (90:10) hasta un 100% del acetato de etilo (se obtuvo 12 fracciones), de la fracción 8 se obtuvo 80 mg de compuesto puro aislado de la planta de *C. pubescens*.

- v. Se identificó por técnicas espectroscópicas: espectroscopia IR, resonancia magnética nuclear, se utilizó un espectrofotómetro Bruker 300 MHz para RMN1H y 75 MHz para RMN13C usando CDCl₃ como solvente.

b) Procedimiento de Staba, E. et al. – 1981.

“Quinine and Quinidine Production by Cinchona Leaf, Root and Unorganized Cultures”.

- **Muestra utilizada**

- i. Muestra: Corteza de Cinchona

- **Extracción sólida – líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**

- i. La muestra se trata con ácido tricloroacético al 50% en metanol por 10 minuto seguidamente se añade un NH₄OH 15 N.
- ii. Se extrae con benceno en un equipo Soxhlet por 24 horas.

- **Separación líquido - líquido (Obteniéndose el Extracto de Alcaloides Totales, EBA)**

- iv. La solución orgánica se extrae con HCl 2N, se alcaliniza NH₄OH 15 N a pH= 12.
- v. La fase alcalina se extrae con cloroformo CHCl₃.

- **Purificación e identificación de la quinina**

- vi. Purificación mediante cromatografía en placa delgada, en Si gel GF (250 µm) usando como eluente (CHCl₃: MeOH: NH₄OH, 24:6:0,05), obteniéndose alcaloides puros.
- vii. Identificación: mediante ultravioleta (UV) y espectrometría de masas.
- viii. Adicionalmente, cabe mencionar que en la bibliografía se presenta el aislamiento de la quinina a partir de las hojas de Cinchona y corteza de Quina: Kenne, A. et al. – 1983 y Rojahn, C. – 1946.

1.2.3 Identificación clásica de la quinina.

a) Comportamiento cromatográfico de la quinina

i. Cromatografía en capa fina – CCF: Staba, E. et al. -1981

Adsorbente: Placa Sigel GF (250 µm) (Analtech, Newark, DE)

Eluente: Cloroformo - Metanol - Amoniacó 15 N (24:6:0,05)

Revelador: reactivo de Dragendorff modificado

Rf: 0.40 (quinina) / 0,42 (quinidina) / Cinconina (0,32), etc.

(Color naranja intenso)

ii. Cromatografía en capa fina – CCF: Suszko, A. et al. – 1964

Adsorbente: Kieselgel G for CCF. Merck N° 7731

Eluente: Cloroformo - metanol - dietilamina (80:20:1)

Revelador: Reactivo de Dragendorff modificado por Munier y Macheboeuf.

Rf: 0,45 - 0,47 (Quinina) / 0,46 - 0,48 (Quinidina) / 0,38 – 0,40 (Cinconina),

etc.

(Color naranja)

b) Punto de Fusión

Cristales, 177 °C (algo se descompone). Recristalizado con alcohol absoluto (The Merck Index -1996).

1.2.4 Identificación espectroscópica de la quinina

En la sección I.B.6 (Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos, Pág. 43) se presentarán los aspectos generales y la importancia en la determinación de la estructura molecular de las principales técnicas en la determinación de la estructura molecular: La espectrofotometría de masas, la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN¹H) y de Carbono (RMN¹³C), COSY y HECTOR, así como la espectroscopia de Infrarrojo (IR) y de Ultravioleta (UV).

a) Espectro de Masas de la quinina.

i. Kudlacek, K., et al. – 2017

Proporciona el espectro de masas y los principales fragmentos, asimismo las intensidades relativas de la quinina (ver Figura 2) empelando un cromatógrafo de líquidos UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japón) con un detector de matriz de diodos interno, seguido por un espectrómetro de masas compacto QTOF Bruker (Bruker, Alemania) con ionización ESI: 325 (ion molecular, $M^+ + 1$); 307,180; 253,134; 198, 091 y 160 (pico base es 325).

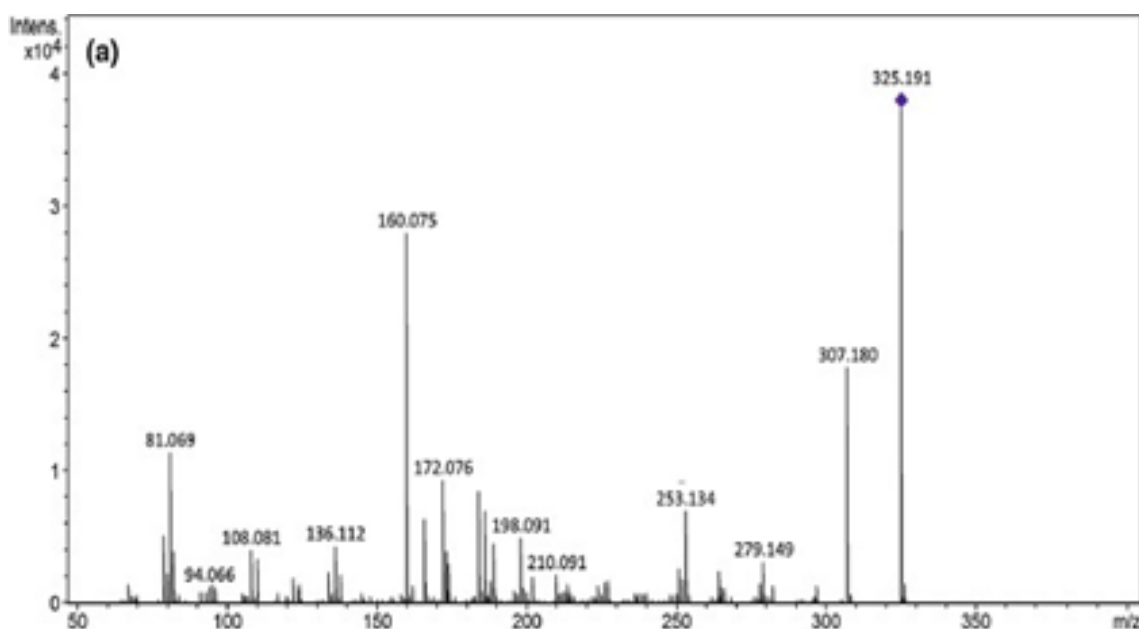


Figura 2. Espectro de masas (ESI-MS2) de la quinina (Kudlacek, K., et al. – 2017)

ii. National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectrometry Data Center – 2014

Utilizando <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C130950&Mask=200> se obtuvo el espectro de masas de la quinina proporcionada por el NIST Chemistry WebBook (ver Figura 3), en el cual se pueden observar los valores de los iones y su intensidad relativa.

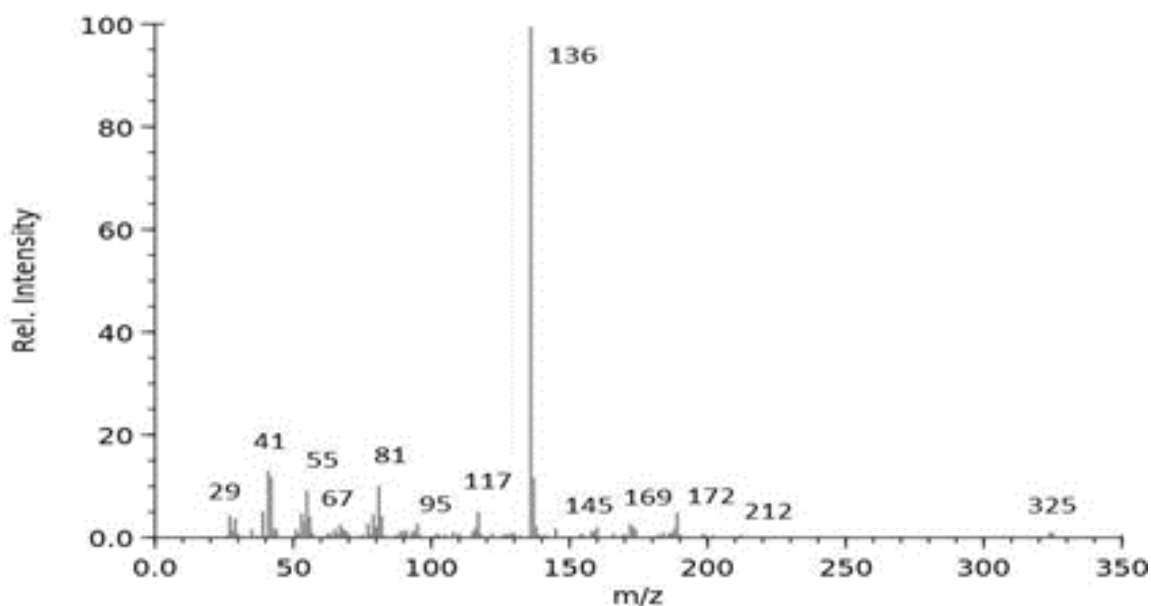


Figura 3. Espectro de masas (EI) de la quinina (NIST Chemistry WebBook - 2014)

iii. **Mills, T., et al. – 2006**

En la bibliografía encontramos la serie de libros de referencia 'Instrumental Data for Drug Analysis', en este libro se presenta el espectro de masas de la quinina (ver Figura 4) donde se observan los principales picos y sus intensidades relativas.

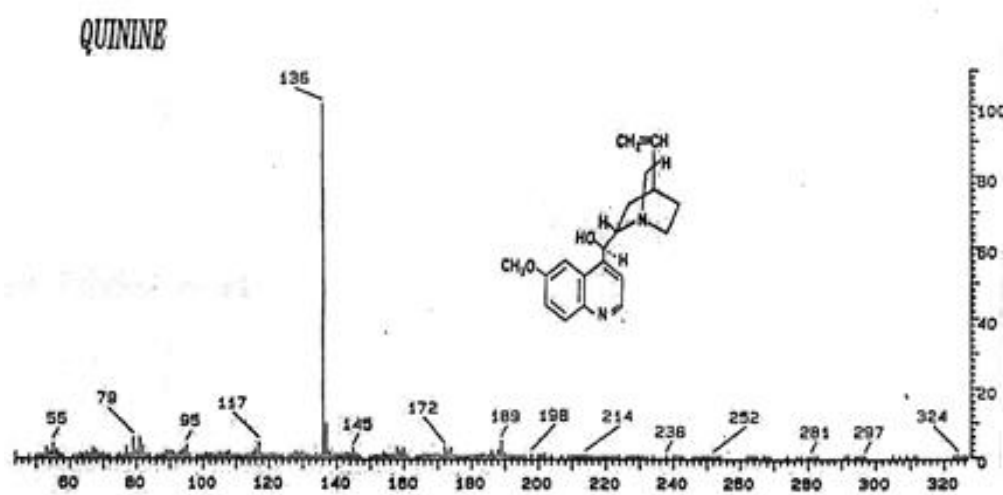


Figura 4. Espectro de Masas de la quinina (Data for Drug Analysis, 3rd Ed. 2006).

iv. **Damien, R. et al. – 2006**

Proporciona el espectro de masas de la quinina con sus fragmentos característicos, los análisis se realizaron en un HP5973espectrómetro de masas

con cromatógrafo de gases de la serie HP6890 (Agilent Technologies, Atlanta, GA, EE. UU.) (Ver Figura 5).

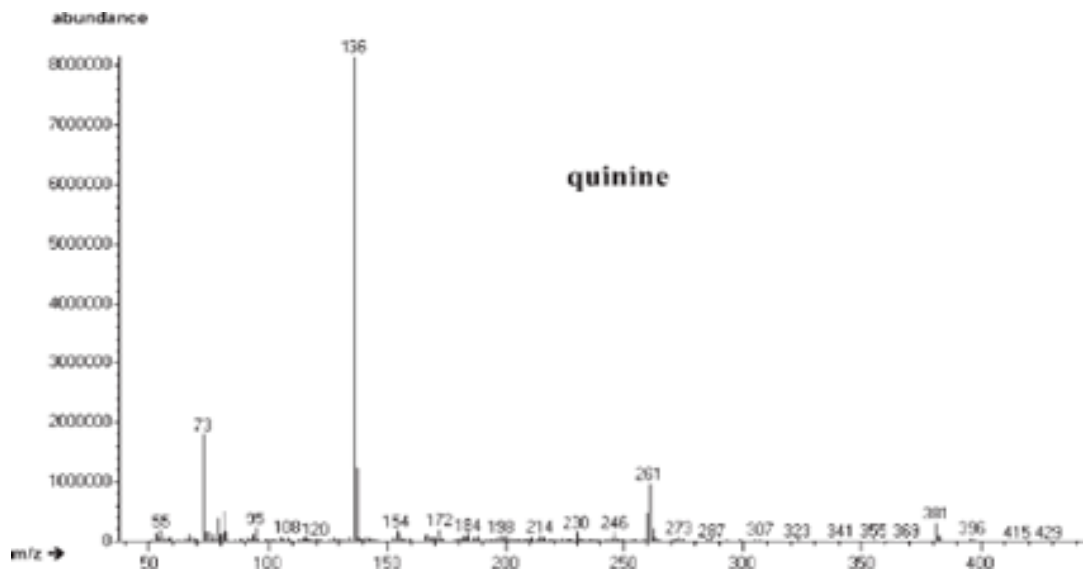


Figura 5. Espectro de Masas de la quinina (Damien, R. et al. – 2006)

v. **Ruiz, L. et al. – 2005**

Proporcionan los valores de los principales iones (y su abundancia relativa) del espectro de masas de la quinina, utilizando un cromatograma de masas Fisons Instruments EA 1108 CHN: EIMS m/z [M+] 324 (1%), 309 (1%), 296 (1%), 233 (1%), 205 (6%), 189(5%), 137 (10%), 136 (100%), 91 (78%), 81(7%).

vi. **Verpoorte, R. et al. - 1989**

Proporciona los valores de los principales iones (y su abundancia relativa) del espectro de de masas de la quinina: 136(100%), 137(13%), 81(5%), 189(5%), 79(4%), 95(3%), 82 (3%), 117(3%), 158 (2%), 172 (2%).

vii. **Fujiwara, H., et al -1987**

Proporciona el espectro de masas de la quinina y su abundancia relativa, por ionización electrónica (ver Figura 6) no indica el modelo del equipo; los valores de los principales iones (y su abundancia relativa) del espectro de masas de la quinina: 324 (ion molecular), 136(100%), 81(20 %), 189(10%), 95(10%), 81 (20%), 117(10%).

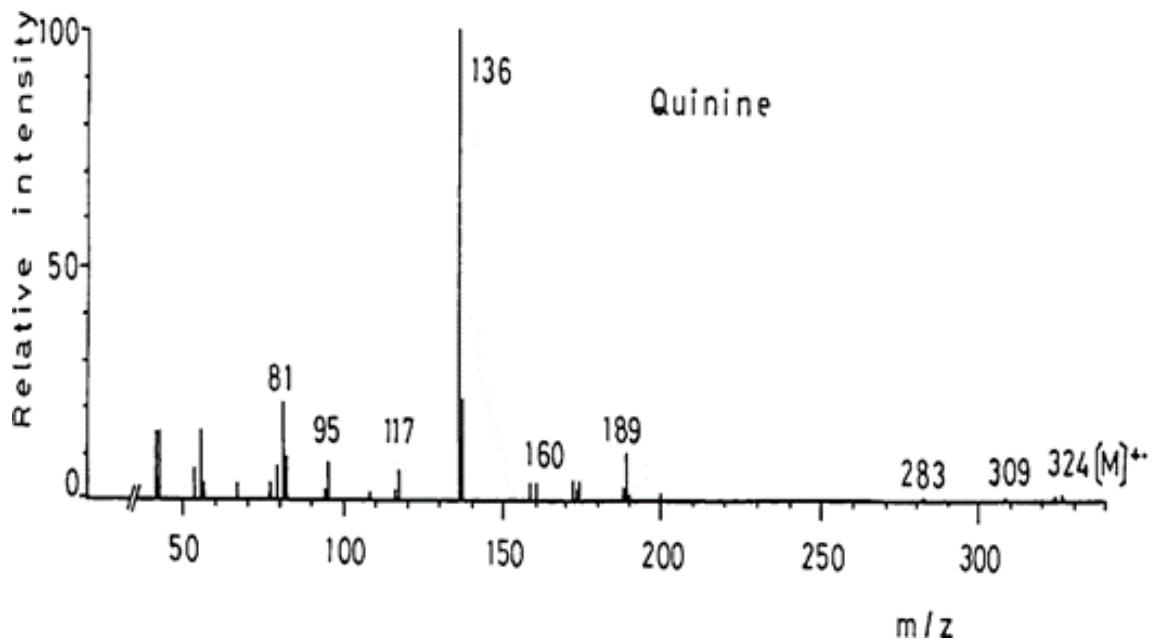


Figura 6. Espectro de Masas de la quinina (EI) (Fujiwara, H., et al -1987)

viii. **Furner, R. et al. – 1981**

Proporciona los espectros de masas de quinina y quinidina, y los principales fragmentos y su intensidad relativa. Los análisis se realizaron en un espectrómetro de masas con cromatógrafo de gases modelo HP5985A (ver Figura 7).

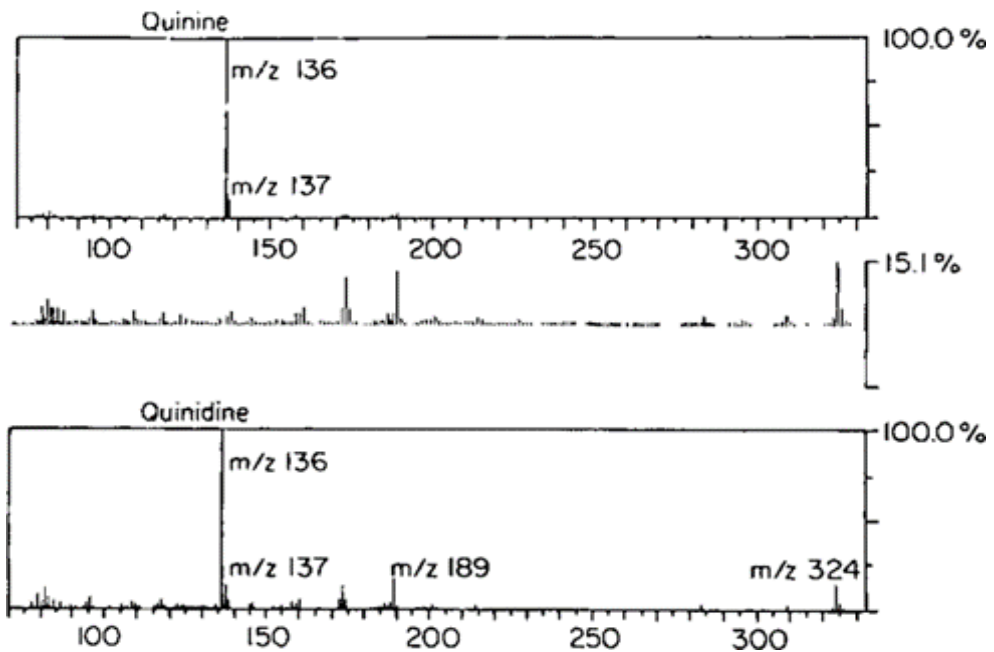


Figura 7. Espectro de Masas de la quinina (EI) (Furner, R. et al. – 1981)

ix. **Comparación de Espectros de Masas**

Podemos notar que el pico base en las referencias bibliográficas $m/z = 136$ (100%), a excepción del publicado por Kudlacek, K., et al. – 2017 que indica $m/z = 160$ (100 %), el cual es cercano a lo obtenido en nuestro trabajo 172,1 (100%), podemos observar según bibliografía revisada que estas diferencias son debido a que los equipos utilizados son de diferentes modelo, pero se puede notar el que el ion molecular si coincide. La fragmentación depende de la energía del haz de electrones con el cual se bombardea una sustancia y esto varía dependiendo el equipo utilizado.

x. **Ecuaciones de fragmentación de los principales picos**

Presentaremos las ecuaciones de fragmentación de los principales picos del espectro de masas de la quinina, a saber: m/z 325 (ion molecular; $M+ +1$); 307; 160.

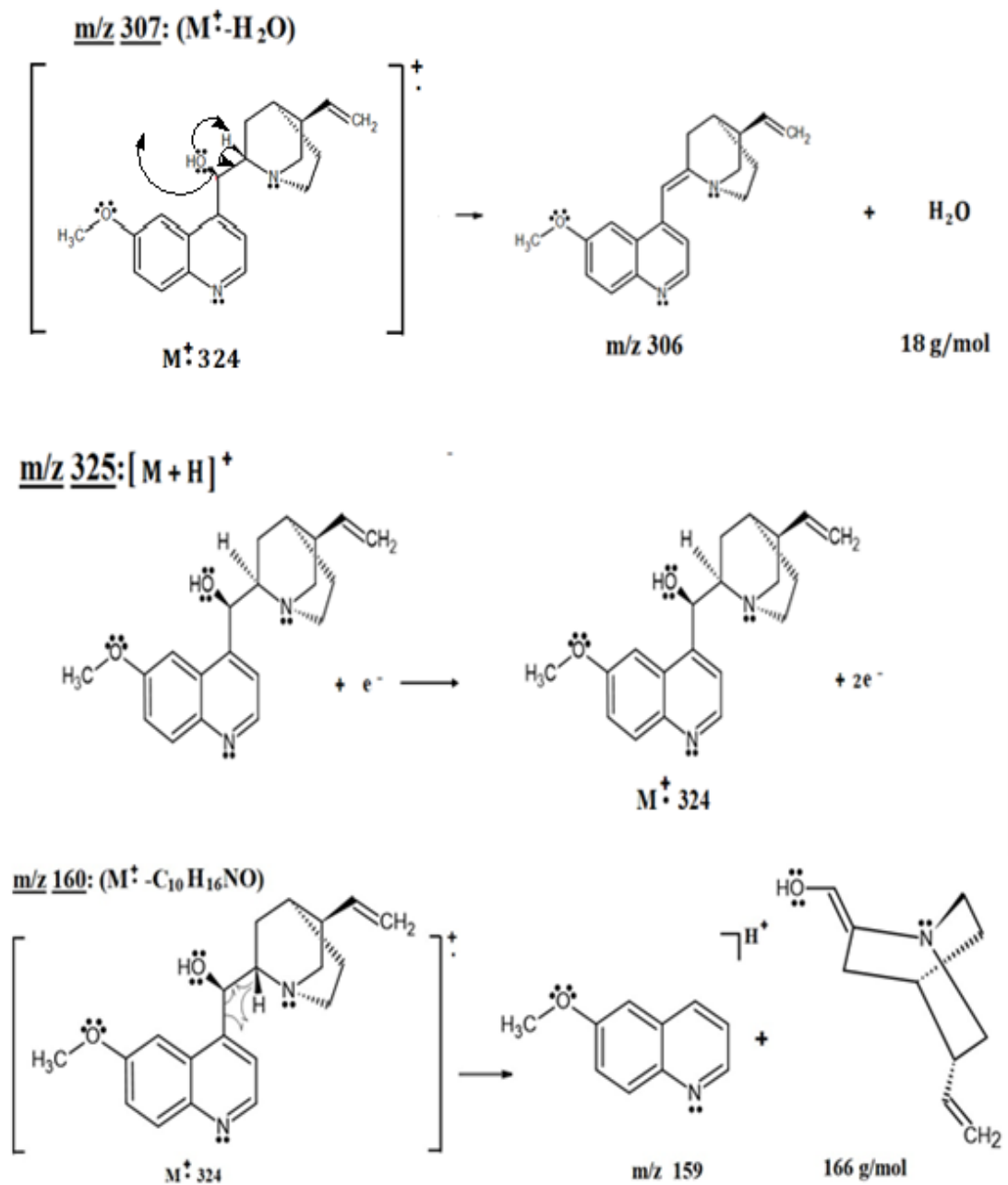


Figura 8. Ecuaciones de fragmentación de los principales picos del espectro de masas de la quinina

b) Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno, RMN¹H

En la bibliografía se presentan los espectros de RMN¹H de la quinina (ii, iii, iv, v) y del acetato de quinina (i).

Para la interpretación de los espectros RMN¹H que presentaremos en esta tesis se tendrá la siguiente notación (Verpoorte, R. *et al.* - 1989):

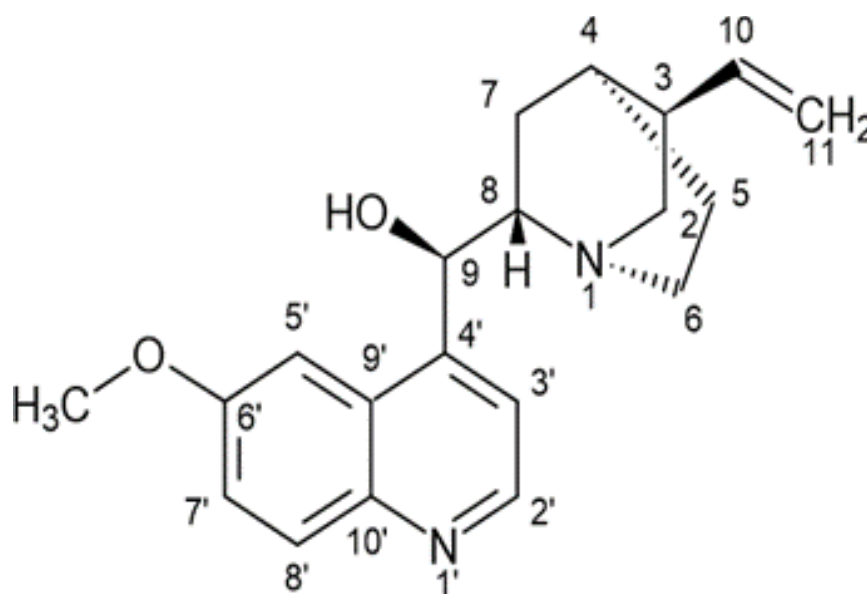


Figura 9. Numeración de la estructura de la Quinina para los átomos de hidrógeno

i. **Arana, G., et al. -2011: Acetato de Quinina**

Reporta los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) del espectro RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz) del acetato de quinina (P. fusión = 198-200 °C) en CDCl₃ como solvente, sin proporcionar el espectro RMN¹H correspondiente, y sin indicar el tipo de espectrómetro utilizado:

δ (ppm) = 8,85 (d, H-2'); 7,57 (d, H-3'); 7,13 (d, H-5'); 7,27(d, H-7'); 7,88 (d, H-8'); 3,36 (t, H-8); 5,83 (s, H-9); 5,53 (m, H-10); 4,98 (d, H-11A); 4,94 (d, H-11B); 3,27 (d, H-2 trans); 3,11 (d, H-2 cis); 2,57 (brs, H-3); 1,19 (m, H-4); 2,02 (m, H-5 endo); 1,74 (m, H-5 exo); 4,16 (m, H-6 endo); 3,00 (m, H-6 exo); 1,19 (m, H-7 endo); 1,22 (m, H-7 exo); 1,96(s, OAC).

ii. **Mills, T., et al. – 2006: Quinina**

Proporciona el espectro RMN¹H para la quinina obtenido en un Espectrómetro FTNMR (ver Figura 10).

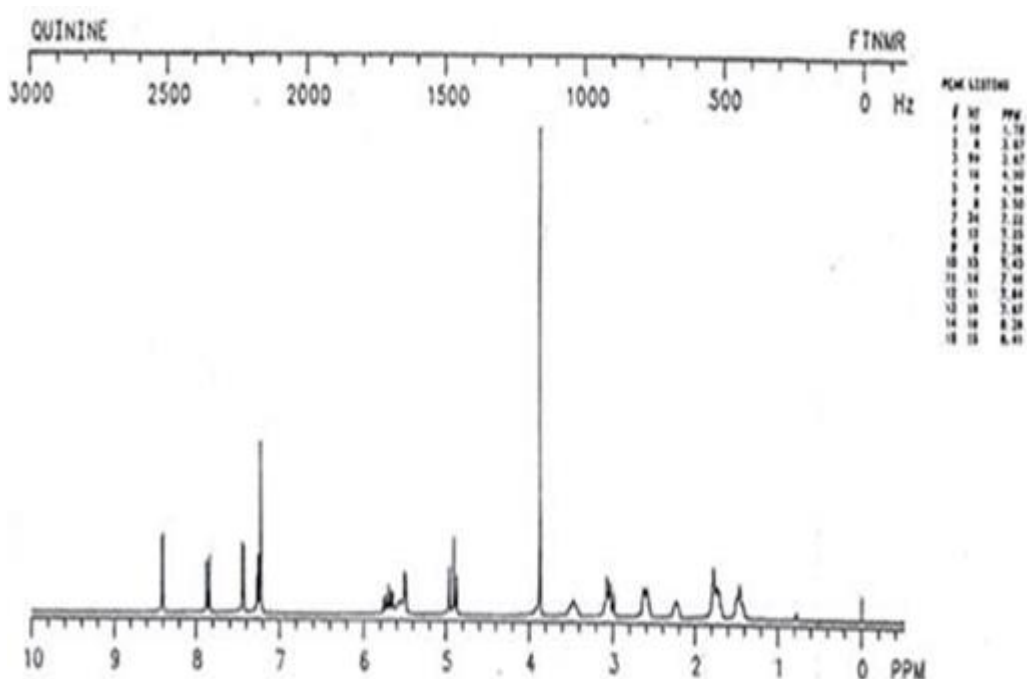


Figura 10. Espectro RMN¹H de la Quinina (Mills, T., et al., - 2006)

iii. **Ruiz, L., et al., - 2005: Quinina**

Proporcionan los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) de los hidrógenos de la quinina, obtenidos en un espectrómetro Bruker AMX2 500 MHz usando como solvente CDCl₃, sin proporcionar el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN¹H) correspondiente:

δ (ppm) = 8,62 (d, H-2'); 7,45 (s, H-5'); 7, 90 (d, H-8'); 7,31 (d, H-7'); 7,70 (d, H-3');

5,60 (d, H-10); 6,40 (s, H-9); 5,10 (d, H-11a); 4,97 (d, H-11b); 4,10 (m, H-6endo); 4,03 (s, OCH₃); 3,32 (d, H-2trans); 3,31 (m, H-8), 3,10 (m, H-2cis y H-6exo); 2,47 (m, H-3); 2,11 (m, H-5endo); 2,05 (s, H-4); 1,82 (m, H-5exo); 1,34 y 0,79 (m, H-7endo y H-7exo, respectivamente).

iv. **Uccello, G., et al. – 1992: Quinina**

Proporciona el espectro RMN¹H (300 MHz) de la quinina en CDCl₃, obtenido en un Espectrómetro Varian VXR-300, como se muestra en Figura 11.

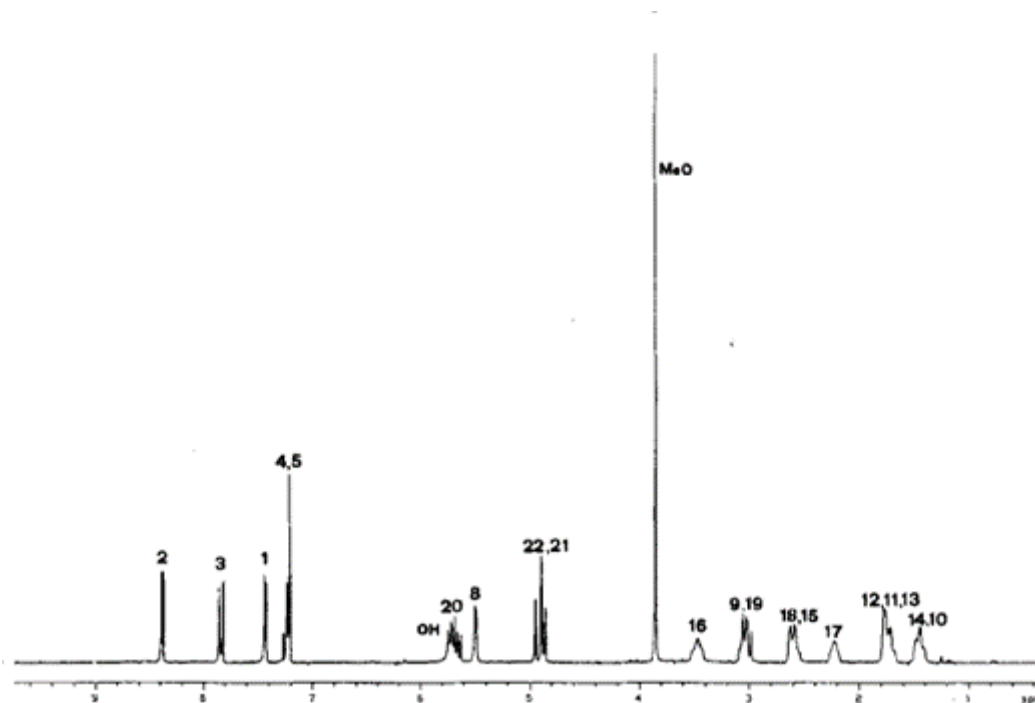


Figura 11. Espectro RMN¹H (300MHz) en CDCl₃ de la Quinina (Uccello, G., et al.-1992).

v. **Verpoorte, R., et al. -1989: Quinina**

Proporciona los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) de los hidrógenos de la quinina en CDCl₃, sin proporcionar el espectro RMN¹H correspondiente, y sin indicar el tipo de espectrómetro utilizado:

δ (ppm) = 4,92 (d, H-11); 4,97 (d,H-11); 2,67 (m,H-2); 1,58 (m,H-7); 1,71 (m,H-7); 3,15 (m,H-8); 7,24 (d,H-5'); 3,91 (s,O-CH₃); 7,33 (m,H-7'); 7,97 (d,H-8'); 5,76 (m,H-10); 2,27 (m,H-3); 3,08 (m,H-2); 1,81 (m,H-4); 1,49 (m,H-5); 1,68 (m,H-5); 2,65 (m,H-6); 3,39 (m,H-6); 5,49 (d,H-9); 7,49 (d,H-3'); 8,64 (d,H-2').

vi. **Comparación de espectros RMN¹H**

En la Tabla 1 se resumen estos resultados y, además, se incluyen los valores que obtuvimos en el espectro de RMN¹H (400 MHz) de la quinina que se aisló de las cortezas (tallos) de la Quina *C. pubescens*, en CDCl₃ (los cuales se presentan en la Sec. II. H. 2, Pág. 77), observando la correspondencia que hay entre los valores hallados.

Tabla 1. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de hidrogeno en el espectro de RMN¹H de la Quinina en CDCl₃ y derivado (Acetato de quinina).

Numeración del Átomo e Hidrogeno	Quinina					Acetato de Quinina
	Tesis Loayza, K., (2021) CDCl ₃	Mills, T., et al. (2006) CDCl ₃	Ruiz, L., et al. (2005) CDCl ₃	Uccello, G., et al. (1992) CDCl ₃	Verpoorte, R., et al. (1988) CDCl ₃	Arana, G., et al. (2011) CDCl ₃
H-7eq	1,52	1,50	0,79	1.435	1,58	1.19
H-5eq	1,54	1,52	1,82	1.439	1,49	2,02
H-5ax	1,71	1,70	2,11	1.711	1,68	1,74
H-4	1,84	1,78	2,05	1.752	1,81	1,19
H-7ax	1,86	1,82	1,34	1.715	1,71	1,22
H-3	2,70	2,60	2,47	2.214	2,27	2,57
H-2eq	2,73	2,62	3,10	2.591	2,67	3,11
H-6eq	2,75	2,69	3,10	2.582	2,65	3,00
H-2ax	3,12	3,01	3,32	3.011	3,08	3,27
H-8	3,15	3,08	3,31	3.025	3,15	3,36
H-6ax	3,17	3,12	4,10	3.467	3,39	4,16
O-CH ₃	3,85	3,87	4,03	3.848	3,91	-
H-11gem	4,95	4,90	4,97	4.373	4,92	4,98
H-11gem	4,97	4,96	5,10	4.418	4,97	4,94
H-9	5,69	5,50	6,40	5.491	5,49	5,83
H-10	5,70	5,68	5,60	5.685	5,76	5,53
H-5'	7,19	7,22	7,45	7.209	7,24	7,13
H-7'	7,28	7,26	7,31	7.229	7,33	7,27
H-3'	7,52	7,44	7,70	7.431	7,49	7,57
H-8'	7,94	7,87	7,90	7.837	7,97	7,88
H-2'	8,66	8,66	8,62	8.385	8,64	8,85

c) **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN¹³C**

En la bibliografía se presentan los espectros de RMN¹³C de la quinina.

Para la interpretación de los espectros RMN¹H que presentaremos en esta tesis se tendrá la notación de la Figura 12.

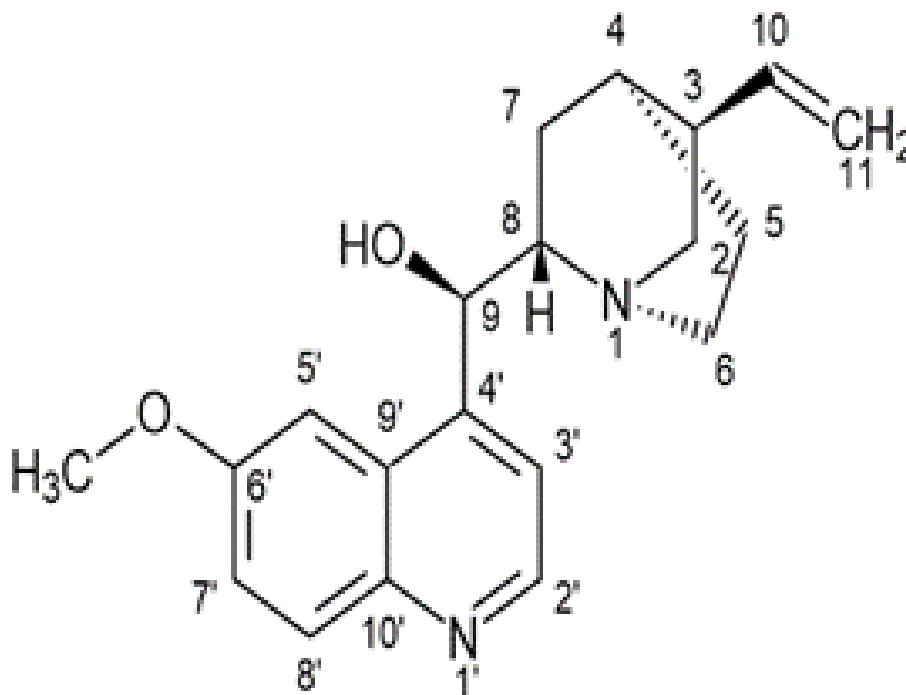


Figura 12. Numeración de la estructura de la Quinina para los átomos de Carbono.

i. **Casabianca, L., et al. – 2004⁶: Quinina**

Proporciona los desplazamientos químicos del espectro RMN¹³C (125.684 MHz) de la quinina en CH₃OD, obtenidos en espectrofotómetro VARIAN-VNMR:

δ (ppm) = C-2': 148,03; C-3': 120,48; C-4': 147,11; C-5': 102,12; C-6': 160,23; C-7': 123,87; C-8': 131,51; C-9': 127,42; C-10': 144,62.

ii. **Arana, G., et al. – 2011²: Quinina**

Proporciona los desplazamientos químicos del espectro RMN¹³C (100 MHz) de laquinina en CDCl₃, sin indicar el espectrofotómetro utilizado:

δ (ppm) = C-2': 147,2; C-3': 118,5; C-4': 145,9; C-5': 100,5; C-6': 158,2; C-7':122,0; C-8': 131,3; C-9': 125,9; C-10': 143,9; C-2: 55,5; C-3: 38,3; C-4: 27,3; C-5: 25,7; C-6: 43,4; C-7: 19,3; C-8: 59,8; C-9: 68,2; C-10: 139,2; C-11: 115,1.

iii. **Verpoorte, R., et al. – 1989⁶²: Quinina**

Proporciona los desplazamientos químicos del espectro RMN¹³C de la quinina en CDCl₃, sin indicar el espectrofotómetro utilizado:

δ (ppm) = C-2': 147,0; C-3': 121,1; C-4': 148,3; C-5': 101,4; C-6': 157,4; C-7':118,3;

C8': 130,9; C-9': 126,4; C-10': 143,7; C-2: 56,9; C-3: 39,8; C-4: 27,7; C-5: 27,5; C-6:43,0; C-7: 21,4; C-8: 59,8; C-9: 71,5; C-10: 141,7; C-11: 114,1.

iv. **Moreland, Ch., et al. – 1974³²: Quinina**

Proporciona los desplazamientos químicos del espectro RMN¹³C (24,92 MHz) de la quinina en CDCl₃, obtenido en un espectrómetro de JEOL JNM PS- 100:

δ (ppm) = C-2': 147,01; C-3': 121,09; C-4': 148,33; C-5': 101,40; C-6':157,44; C-7':118,39; C-8': 130,89; C-9': 126,43; C-10': 143,67; C-2: 56,86; C-3:39,62; C-4: 27,71; C-5: 27,46; C-6: 43,00; C-7: 21,44; C-8: 59,85; C-9: 71,51; C-10: 141,66; C-11: 114,08.

v. **Comparación de espectros RMN¹³C**

En la Tabla 2, se resumen los desplazamientos químicos de todos los carbonos de la quinina presentados anteriormente. En esta Tabla 2, hemos incluido los valores de desplazamientos químicos que obtuvimos en el espectro de RMN¹³C de la quinina que se aisló de las cortezas (tallos) de la Quina *C. pubescens*, disuelto en CDCl₃ (los cuales se presentan en la Sec. II. H. 3, Pág. 80); y se observa la correspondencia que hay entre los valores encontrados y aquellos publicados.

Tabla 2. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los átomos de carbono en el espectro de RMN¹³C de la Quinina

Quinina					
Numeración del átomo de Carbono	Tesis Loayza, K., (2021)	Casabianca, L., <i>et al.</i> (2004)	Arana, G., <i>et al.</i> (2011)	Verpoorte, R., <i>et al.</i> (1988)	Moreland, Ch., <i>et al.</i> (1974)
	CDCl ₃	CH ₃ OD	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃
C-2	56,6	-	55,5	56,9	56,86
C-3	39,5	-	38,3	39,8	39,62
C-4	27,7	-	27,3	27,7	27,71
C-5	27,1	-	25,7	27,5	27,46
C-6	43,3	-	43,4	43,0	43,00
C-7	21,3	-	19,3	21,4	21,44
C-8	59,9	-	59,8	59,8	59,85
C-9	71,1	-	68,2	71,5	71,51
C-10	141,1	-	139,2	141,7	141,66
C-11	114,8	-	115,1	114,1	114,08
C-2'	146,9	148.03	147,2	147,0	147,01
C-3'	121,6	120.48	118,5	121,1	121,09
C-4'	147,5	147.11	145,9	148,3	148,33
C-5'	101,1	102.12	100,5	101,4	101,40
C-6'	157,8	160.23	158,2	157,4	157,44
C-7'	118,4	123.87	122,0	118,3	118,39
C-8'	131,5	131.51	131,3	130,9	130,89
C-9'	126,4	127.42	125,9	126,4	126,43
C-10'	144,2	144.62	143,9	143,7	143,67
-OCH ₃	55,8	-	-	55,4	-

d) Espectroscopia DEPT-135

En la bibliografía proporcionan información sobre el número de átomos de hidrógeno unidos a cada carbono. El espectro DEPT-135 contiene señales de sólo grupos CH, CH₂ y CH₃.

vi. **Da Fonseca, A., et al. – 2019: Quinina**

Proporciona las señales para los carbonos CH, CH₂ y CH₃, en el espectro ¹³CDEPT135 NMR, obtenidas en un Bruker Avance DRX-500 (500 MHz) usando CDCl₃:

δ (ppm) = CH: C-3: 39,76; C-4: 27,71; C-8: 59,85; C-9: 71,51; C-10: 141,66; C-2': 147,01; C-3': 121,09; C-5': 101,40; C-7':118,30; C-8': 130,89. **CH₂**: C-2:56,86;C-5: 27,46; C-6: 43,00; C-7: 21,44; C-11: 114,08. **CH₃**: MeO: 55,44.

vii. **Comparación de espectros DEPT-135**

En la Tabla 3, se resumen las señales obtenidas en espectro DEPT-135 de la quinina que se aisló de las cortezas (tallos) de la Quina *C. pubescens*, disuelto en CDCl₃ y se observa la correspondencia que hay entre los valores encontrados en la bibliografía.

Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ, ppm) de los átomos de carbono de los grupos CH, CH₂ y CH₃.

Numeración del átomo de Carbono	Tesis Loayza, K., (2021)	Marqués, A., et al. (2019)
	CDCl ₃	
CH		
C-3	39,5	39,76
C-4	27,7	27,71
C-8	59,9	59,85
C-9	71,1	71,51
C-10	141,1	141,66
C-2'	146,9	147,01
C-3'	121,6	121,09
C-5'	101,1	101,40
C-7'	118,4	118,30
C-8'	131,5	130,89
CH ₂		
C-2	56,6	56,86
C-5	27,1	27,46
C-6	43,3	43,00
C-7	21,3	21,44
C-11	114,8	114,08
CH ₃		
O-CH ₃	55,8	55,44

e) **Espectroscopia de Correlación Homonuclear, COSY**

En la bibliografía se presentan los espectros de COSY de la quinina. Para la interpretación que presentaremos en esta tesis se tendrá la notación de la Figura 13.

i. **Lin, L., et al. – 2016: Quinina**

Proporciona el espectro COSY (500 MHz) de la quinina en DMSO-d₆; obtenido en espectrofotómetro Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA:

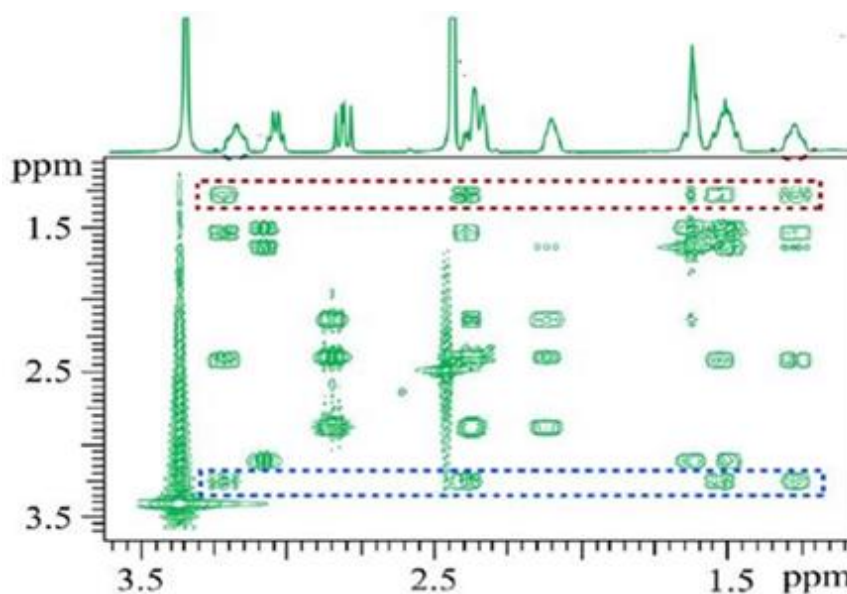


Figura 13. Espectro 1H 1D and 2D COSY (500MHz) en CDCl₃ de la Quinina (Lin, L., et al.-2016).

ii. **Uccello, G., et al. – 1992: Quinina**

Proporciona el espectro DQF-COSY (300 MHz) de la quinina en CDCl₃, obtenido en un Espectrómetro Varian VXR-300, como se muestra en Figura 14.

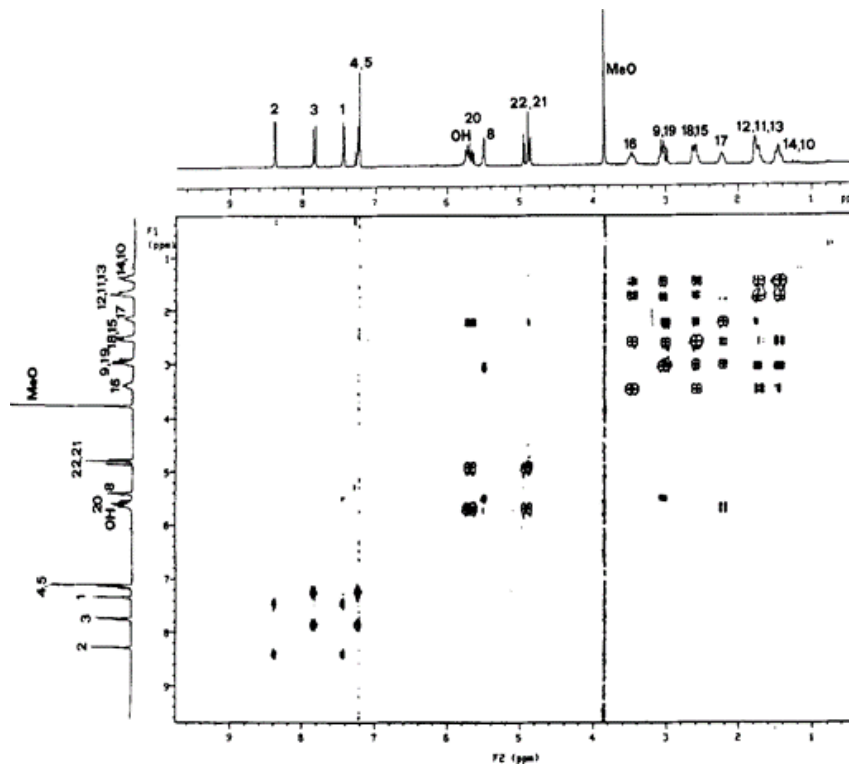


Figura 14. Espectro DQF-COSY (300MHz) en CDCl_3 de Quinina (Uccello, G., et al. 1992).

iii. Comparación de espectros COSY

Lin, L., et al. (2016) muestra partes de espectros COSY 1D 1H y 2D convencionales de quinina. Se puede observar en el espectro COSY que resonancias dentro de la región aromática de la quinina (1.0-3.5 ppm) están asociados con acoplamientos escalares complejos.

En la Tabla 4, se muestran las correlaciones existentes entre los protones de la quinina tomados del espectro COSY, así como las constantes de acoplamiento halladas:

Tabla 4. Correlación COSY (500 MHz) y constante de acoplamiento (Hz) para la quinina en CDCl₃

Quinina						
Átomos de H	Tesis Loayza, K., (2021)			Uccello, G., et al. (1992)		
δ (ppm)						
H-7eq	1,52	H-6ax (3,17); H-4 (1,84);	H-7ax 1,58	H-6ax (3,39); H-4 (1,81); H-7ax (1,71)		
H-6eq	2,75	H-5eq (1,54); H-8(3,15);	H-5ax 2,65	H-5eq (1,49); H-8 (3,15); H-5ax (1,68)		
H-6ax	1,71	H-5eq (2,75); H-5ax (3,17)	3,39	H-5eq (1,49); H-5ax (1,68)		
H-4	1,84	H-3 (2, 70)	1,81	H-3 (2, 27)		
H-7 ax	1,86	H-8(3, 15)	1,71	H-8 (3, 15)		
H-8	3,15	H-9 (5, 69); H-11 gem (4,95-4,97)	3,15	H-9 (5, 49); H-gem (4,92-4,97)		
OCH3	3,85	H-5' (7, 19)	3,91	H-5' (7, 24)		
H-11gem	4,95	H-10 (5, 70)	4,92	H-10 (5, 76)		
H-9	5,69	H - 3' (7, 52)	5,49	H - 3' (7, 33)		
H-7'	7,28	H - 8' (7, 94)	7,33	H - 8' (7, 97)		

f) Espectroscopia de Ultravioleta, UV

En la bibliografía se presentan los espectros diferentes de UV de la quinina.

A continuación, se describen los espectros correspondientes:

i. Zidan, M., et al. – 2016: Quinina

Proporcionan el espectro UV de la quinina (QUININ) en etanol obtenido en un espectrofotómetro UV–vis1601 PC Shimadzu. En este espectro se observa tres picos de absorción máximos centrados en 246, 282 y 335 nm tal como se muestra en la Figura 15.

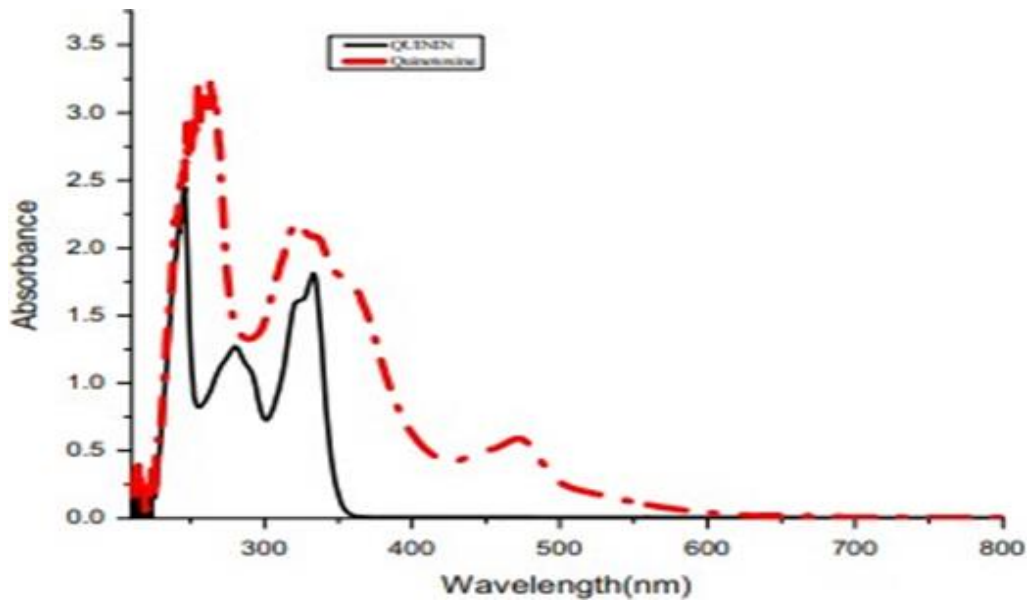


Figura 15. Espectro UV de la quinina (Zidan, M., et al. – 2016)

ii. **Frosch, T., et al. – 2007: Quinina**

Proporcionan el espectro UV de quinina obtenido en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 16. En este espectro se deduce que el máximo de absorción es 244 nm (Figura 16).

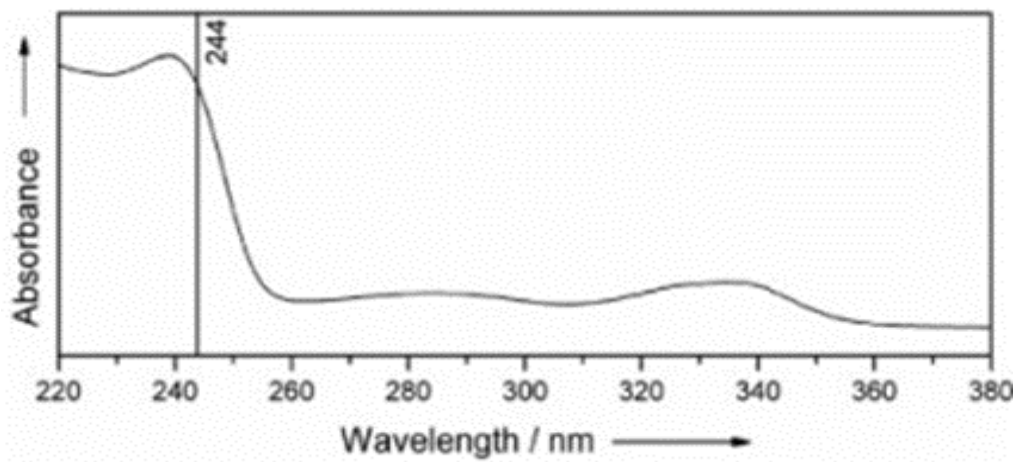


Figura 16. Espectro UV de la quinina (Frosch, T., et al. – 2007)

iii. **Mills, T., et al. – 2006: Quinina**

Proporcionan el espectro de UV de la quinina (ver Figura 17) no indica el tipo de espectrofotómetro. A partir del espectro se deduce que el máximo de absorción es: $\lambda_{max} = 258, 317 \text{ nm}$

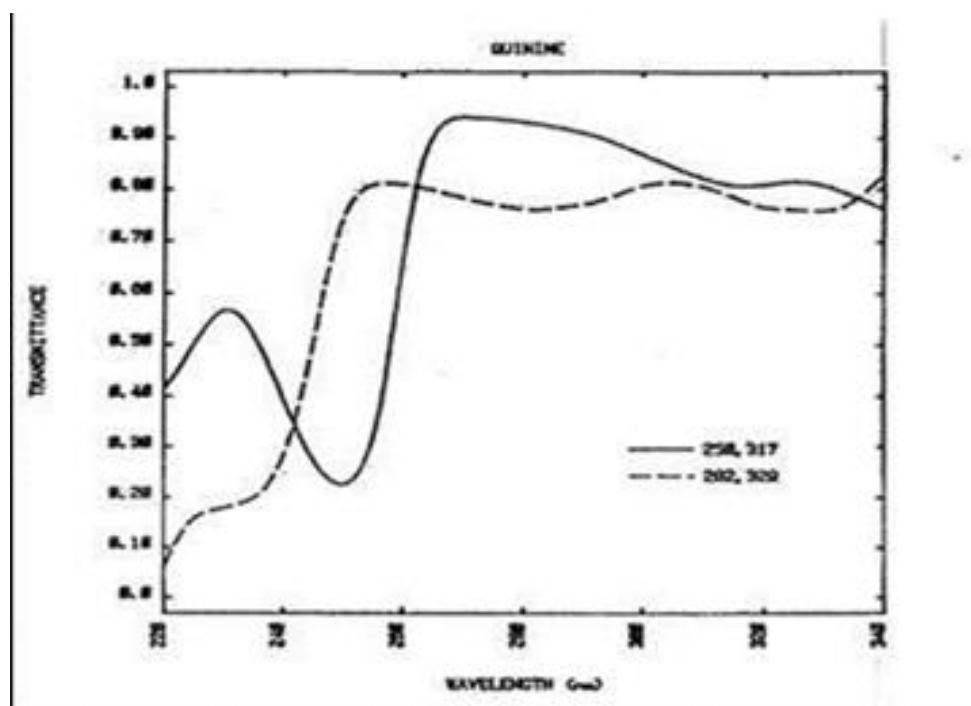


Figura 17. Espectro UV de la Quinina (Mills, T., et al., 2006)

iv. **Comparación de los espectros UV**

En la Tabla 5, se resume la absorción máxima de quinina reportado en la literatura. En esta Tabla 5 se incluye también la absorción máxima que obtuvimos en el espectro UV de la quinina que se aisló de las cortezas (tallos) de la Quina *C. pubescens*, y se puede observar que existe la correspondencia entre los valores encontrados en la literatura.

Tabla 5. Máximos y mínimos de absorción para la quinina

Máximo y mínimos de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$)(nm)			
Tesis Loayza (2021)	Zidan, M., et al.(2016)	Frosch, T., et al. (2007)	Mills, T., et al. (2006)
254	246	244	258

1.2.5 Biosíntesis de la Quinina

Biogenéticamente, los alcaloides de cinchona son alcaloides de indol - terpenoides sintetizados a partir de triptófano (anillo de quinolina) y geraniol (resto de quinuclidina).

El intermedio clave en la biosíntesis del alcaloide Cinchona es 3 a-(S)-estrictosidina (precursor general de alcaloides indol) que se forma en la reacción de Pictet-Spengler de triptamina y secologanina (Kacprzak, K., -2013).

En las hojas de *C. ledgeriana*, se han encontrado alcaloides indol. La presencia de estos alcaloides indol es un recordatorio del hecho de que los alcaloides de quinolina se forman a través de la vía de biosíntesis del alcaloide indol. No se han encontrado alcaloides indol en la raíz la corteza del tallo. La ruta de biosíntesis de se presenta la quinolina y de los alcaloides indolen la Figura 18. (Mulder, Th., et al. – 1982)

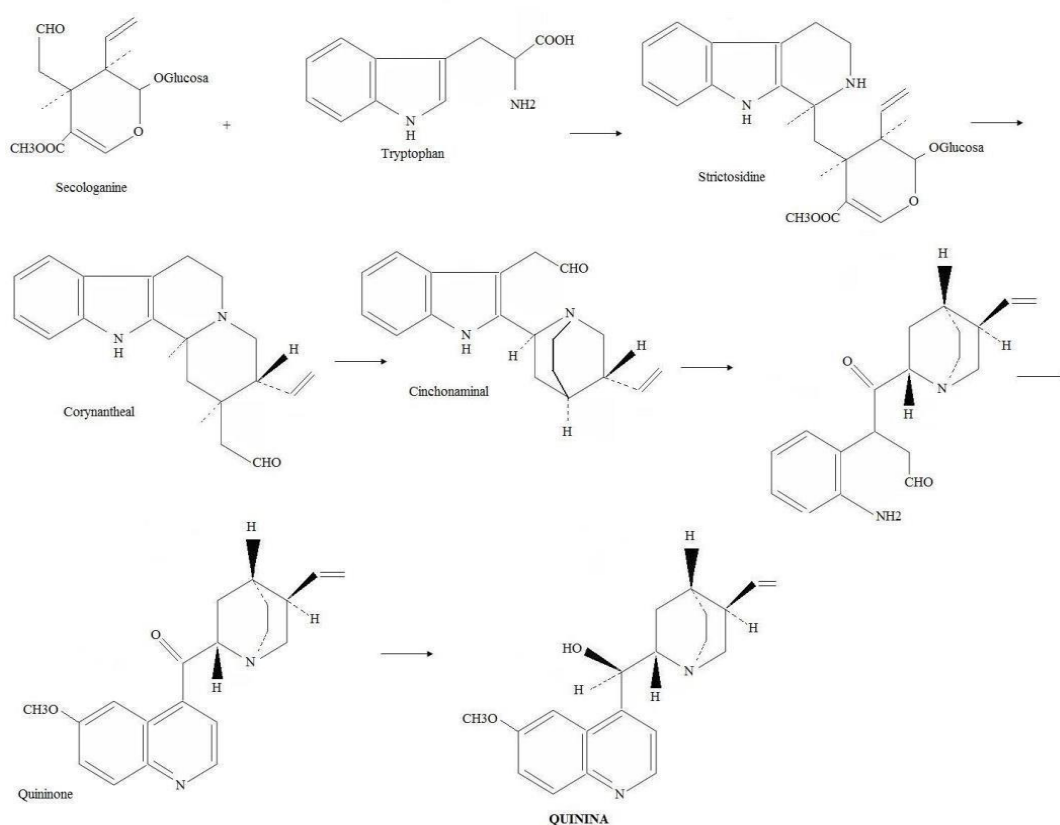


Figura 18. La ruta de la biosíntesis de la quinina (Mulder, Th., et al., 1982).

1.2.6 Síntesis de la quinina

Los alcaloides han sido de interés de los químicos orgánicos desde finales del siglo XIX, se han obtenido e identificado cientos de ellos. Al mismo tiempo, la síntesis de estas moléculasse llevó a cabo en un intento de imitar en el laboratorio el complejo proceso de biosíntesis que se lleva a cabo en la naturaleza para

producir alcaloides, con el fin de obtener más de estos importantes compuestos que directamente de las plantas. (Baldera, P., 2014)

En 1918, P. Rabe y K. Kindler reportaron los tres pasos de conversión de d-quinotoxina en quinina. En 1944, Robert B. Woodward y William von Eggers Doering reportaron la síntesis total de homomeroquinina y d-quinotoxina de 7-hidroxiisoquinolina. En 1944 – 1945, basado en las transformaciones de Rabe y Kindler, Woodward y Doering confirmaron la síntesis total de quinina (ver Figura 19). En 2000 y 2001, Gilbert Stork logra la primera síntesis estereoespecífica. (Seeman, J., -2007).

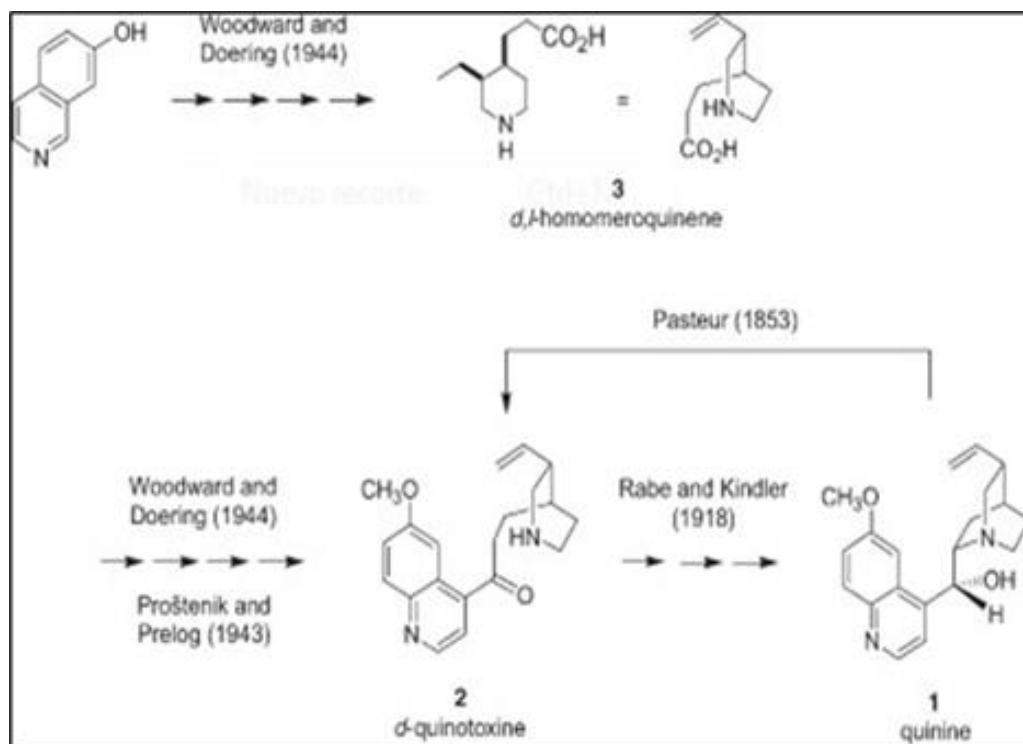


Figura 19. Woodward-Doering/Rabe-Kindler Síntesis total de Quinina (Seeman, J., - 2007)

Capítulo II. Marco teórico y conceptual

2.1 Marco Teórico

2.1.1 *Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)*

Se han revisado tres procedimientos citados en la literatura:

- a)** Reyna (1999-b), basado en Rondina & Coussio (1969) (Anexo 1).
- b)** Miranda (2002) (Anexo 2)
- c)** Villacrés (1995) (Anexo 3)

Reyna – 1999 basado en el fraccionamiento de extractos metanólicos de muestras vegetales ensayadas en diferentes solventes e identificación del tipo de principios activos presentes en cada uno de ellos mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

Miranda - 2002 siguió un procedimiento completamente diferente con el mismo resultado. Este procedimiento tiene dos desventajas: a) la utilización del éter etílico, que es un solvente muy volátil y caro, debe manipularse con mucho cuidado debido a la posible presencia de peróxidos orgánicos, y b) el uso de una gran cantidad de muestra y de solvente, ya que los extractos se obtienen por percolación².

Villacrés – 1995 se basa en procesos específicos para la determinación de metabolitos secundarios.

En esta tesis se realizaron los tres procedimientos Reyna -1999, Miranda-2002 y Villacres-1995 (Anexo 1,2 y 3).

² Percolación. - Procedimiento mediante el cual se hace pasar el solvente a través de la muestra empacada en un recipiente adecuado, por acción de la gravedad.

2.1.2 Test de alcaloides

Para la determinación cualitativa de los alcaloides presentes en plantas o en sus extractos se usan diversas pruebas (reacciones de precipitación y coloración), solo alguna de estas pruebas se les considera como generales y otros específicos. Solo fueron dos elegidas: Mayer y Dragendorff, porque son pruebas generales para alcaloides, en el Anexo 4 hacemos la descripción.

2.1.3 Análisis Cuantitativo de alcaloides

Se revisaron dos métodos que involucran la cuantificación de alcaloides en muestras vegetales: el método descrito en la 20th edición de la Farmacopea de los Estados Unidos (1980) y el método propuesto por Pelt et al. (1967). Seguidamente, describimos ambos métodos divididos en subsecciones para una mejor comprensión (muestra utilizada, extracción sólido-líquido, separación líquido-líquido, eliminación de bases volátiles residuales y cuantificación de alcaloides).

a) Procedimiento de la 20th ed. U.S. Pharmacopoeia-USP (1980) “Determinación cuantitativa de alcaloides”

- **Muestra utilizada**

- i. La muestra vegetal fue secada (a baja temperatura) y luego fue molida.

- **Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**

- ii. Maceración: Con un solvente o con una mezcla de solvente y una alcalinización con amoníaco, vamos a dejar que la muestra se macere durante un tiempo de 12 a 24 horas.

- iii. Decantación: Dejamos decantar el sólido, luego lo separamos del extracto.

- iv. Percolación: Suturamos una cantidad exacta de muestra con el solvente o mezcla indicada dentro de un recipiente. Dejar reposar por 5 minutos y alcalinizar con una solución de amoníaco NH_3 (ac), mezclar bien. Seguidamente, se debe trasvasar a un percolador cilíndrico relleno de algodón y se deja en remojo de 1 a 12 hora. Luego se deja percolar

lentamente con el solvente hasta que la muestra quede libre de alcaloides (test de Valser).

- v. Extracción continua. - Colocar la muestra pesada en un dedal de extracción y llevar a un extractor soxhlet. Humedecer la muestra con el solvente definido y se alcaliniza con solución de amoníaco. Dejar macerar de 6 a 12 horas. Luego extraer por un tiempo determinado o hasta extracción total.
- **Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**
 - vi. Del solvente orgánico vamos a extraer los alcaloides mediante una agitación con ácido, seguidamente, se alcaliniza la solución con un hidróxido alcalino, y se extrae con un solvente inmiscible.
 - vii. La solución de alcaloides purificados se evapora con un baño de vapor o con corriente de aire, para obtener el EBA.
- **Determinación de los alcaloides**
 - viii. Agregue 1 mL de alcohol neutro o éter y una cantidad medida con precisión de ácido estandarizado (una y media o dos veces el volumen que se estima será consumido por los alcaloides) y caliente ligeramente para asegurar la disolución completa de los alcaloides.
 - ix. El exceso de ácido se titula con una solución alcalina estandarizada utilizando rojo de metilo como indicador.
- b) Procedimiento de Pelt et al. (1967). "Comparación de diversos métodos oficiales para la cuantificación de alcaloides de Solanáceas"**
- **Muestra utilizada**
 - i. Muestra vegetal seco y pulverizado

- **Extracción sólido-líquido (Obtención del extracto Bruto Orgánico, EBO)**
 - ii. Se alcaliniza la muestra con una solución de amoníaco concentrado $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N.
 - iii. Se macera con una mezcla de solventes: etanol-cloroformo (1:2), etanol-éter etílico (1:2) ó éter etílico-cloroformo (3:1).
 - iv. Se extrae la muestra con éter etílico utilizando un soxhlet, verificar si la extracción es total mediante el test de Mayer.
 - v. Se evapora solventes orgánicos para así obtener el EBO.
 - vi. Se procede a la separación líquido-líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA).
 - vii. Se disuelve el EBO con una mezcla de éter etílico-cloroformo, para extraer lo alcaloides como sales, se procede añadiendo una solución acuosa de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,5 N.
 - viii. La solución ácida se alcaliniza con una solución de amoníaco acuoso NH_3 (pH = 11 - 12), seguidamente se realiza la extracción de los alcaloides como bases libres con cloroformo (4 x 30 mL).
 - ix. Con sulfato de sodio anhidro se realiza el secado de los extractos orgánicos durante un periodo de tiempo de 30 min. Luego lavar el sulfato de sodio hidratado con cloroformo (4 x 10 mL).
 - x. Se evapora el solvente orgánico para así obtener el EBA.
- **Determinación de los alcaloides**
 - i. Disolver el EBA con cloroformo CHCl_3 .
 - ii. Se añadió 50 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 0,02N.
 - iii. Se evapora el solvente orgánico en baño maría.
 - iv. Se filtra y se lava el filtrado.

- v. Se añade el indicador rojo de metilo.
- vi. El exceso de ácido se titula con una solución estandarizada de hidróxido de sodio NaOH(ac) 0,02 N.

En esta tesis hemos seguido el método de Pelt et al. (1967), ha habido algunas modificaciones, siendo la más importante la observación del punto final de la cuantificación de alcaloides mediante titulación potenciométrica. Seguidamente presentamos la Tabla 6 donde realizamos un resumen comparativo entre ambos procedimientos.

Tabla 6. Comparación del método de determinación cuantitativa de alcaloides descrito por Pelt et al.-1967 y tesis k. loayza-2021

	NATURALEZA DE LAS OPERACIONES	PELT ET AL. (1967)	TESIS K. LOAYZA (2009)
EXTRACCIÓN	Peso de la muestra	10 g	20 g
	Desengrase	No se realiza.	No se realizó
	Alcalinización	Amoniaco concentrado (8 mL).	Amoniaco concentrado (10mL)
	Solvente	Alcohol 95°-cloroformo, 1:2 (30 mL) ó Etanol-éter, 1:2 (30 mL) ó Éter-cloroformo, 3:1 (150 mL).	Éter etílico (70mL)
	Forma de extracción	Maceración: 12 hrs, agitación, o una combinación de ambas.	Maceración 1 hora
	Separación de la solución extractora	Extracción con Éter etílico en Soxhlet.	Extracción con Éter etílico en Soxhlet.
SEPARACIÓN	Verificación de la extracción	Reactivo de Mayer.	Reactivo de Mayer.
	Purificación y eliminación de pigmentos y otras fracciones solubles	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente. • Reemplazo del solvente con la mezcla de éter-cloroformo. • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5 N. • Basificación de la solución ácida con amoniaco acuoso y retorno de los alcaloides libres a una mezcla de éter- cloroformo. • Evaporación del solvente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente. • Disolución del sólido con éter etílico: cloroformo (2:1) • Paso de los alcaloides a una solución de ácido sulfúrico 0,5 N. • Lavado de la solución ácida con cloroformo. • Basificación de la solución ácida con amoniaco acuoso y extracción de los alcaloides libres con cloroformo.

NATURALEZA DE LAS OPERACIONES		PELT ET AL. (1967)	TESIS K. LOAYZA (2009)
		<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación del solvente. 	
SEPARACIÓN	ELIMINACIÓN DE LAS BASES VOLÁTILES	<ul style="list-style-type: none"> • 15 minutos en baño maría hirviente. • Redisolución del residuo en cloroformo. • Evaporación a sequedad. • 15 minutos en baño maría hirviente 	<ul style="list-style-type: none"> • Disolución del sólido en cloroformo. • Evaporación en el rotavapor (35°C, 450-250 mbar). • Repetición de la operación 4 veces.
	TITULACIÓN ÁCIDO-BASE	<ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo. • Adición de 20 mL de H₂SO₄ 0,02 N. • Evaporación del cloroformo en baño maría. • Filtración y lavado del filtrado. • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,02 N. 	<ul style="list-style-type: none"> • Redisolución del residuo en cloroformo. • Adición de 20 mL de H₂SO₄(ac) 0,5046 N. • Evaporación del cloroformo en el rotavapor. • Titulación del exceso de ácido con NaOH 0,5097N
OBSERVACIÓN DEL PUNTO FINAL		Rojo de metilo	Titulación Potenciométrica

2.1.4 Aislamiento de alcaloides

En esta sección se presenta tres procedimientos para el aislamiento de alcaloides.

a) Procedimiento de Reyna & Torpoco (1993)

- **Muestra utilizada**

- Hojas de Chacrana (*Psychotria viridis*), seca y molida.

- **Extracción sólida-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**

- Desengrase del material vegetal con éter de petróleo (50-90 °C).
- Alcalinización con una solución acuosa de amoníaco NH₃ (ac) 5%.
- Extracción a reflujo con etanol.
- Eliminación del solvente por destilación simple: se obtiene el EBO.

- **Separación líquida–líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**

- vi. Se disuelve el EBO con una solución de ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ 2,0 N.
- vii. Se lava con solvente orgánico (cloruro de metileno, CH_2Cl_2), la fase orgánica se elimina.
- viii. El extracto acuoso se alcaliniza con carbonato de sodio $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{ac})$ y se extrae los alcaloides libres con cloruro de metileno.
- ix. Por destilación simple concentramos para obtener el EBA.

- **Purificación e Identificación**

- x. El EBA se purifica por CPP³ y CC⁴: Obtención del alcaloide N, N Dimetiltriptamina puro.
- xi. Identificación: Espectro de Masas y de RMN¹H del alcaloide.

Resultados: Aislamiento e identificación de la N, N-Dimetiltriptamina de las hojas de chacruna (*Psychotria viridis*).

b) Procedimiento de Hoet & Ríos (1980)

- **Muestra utilizada**

- i. Muestra de *Datura stramonium*, seca y molida

- **Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**

- ii. Se alcaliniza la muestra vegetal con una solución acuosa de amoníaco $\text{NH}_3(\text{ac})$.
- iii. Se extrae en frío con una mezcla de solventes orgánicos de etanol-éter (20:40).
- iv. En un extractor soxhlet extraer con éter, hasta que el resto sólido quede de alcaloides (test de Mayer negativo).

³ CPP: Cromatografía en Placa Prepara

⁴ CC: Cromatografía en Columna

v. Se concentra el extracto orgánico, para la eliminación del solvente, y así obtener el EBO. Se disuelve el EBO con una mezcla orgánica de éter-cloroformo.

- **Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**

vi. Se disuelve el EBO con una mezcla orgánica de éter-cloroformo.

vii. Se extrae con ácido sulfúrico $H_2SO_4(ac)$ 0,5 N (4x50 mL).

viii. Se alcaliniza la parte acuosa ácida (hasta pH 11) con una solución acuosa de amoníaco $NH_3(ac)$.

ix. Los alcaloides libres son extraídos con solvente orgánico. Se elimina la fase acuosa.

x. Se juntan todas las fases orgánicas, seguidamente se seca con sulfato de sodio anhidro $Na_2SO_4(s)$ y luego se realiza la concentración para así obtener el EBA.

c) **Procedimiento de Vitale et al. (1995)⁵**

- **Muestra utilizada**

i. Semillas de *Datura ferox*, fresca y molida (5 g).

- **Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**

ii. Se extrae a temperatura ambiente con una mezcla de etanol- $NH_3(ac)$ 28% (95:5; 20 mL), durante 12 h.

iii. Se filtra y concentra a presión reducida el extracto orgánico para así obtener un residuo gomoso, el EBO.

- **Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**

iv. Se extrae con ácido clorhídrico $HCl(ac)$ 1,0 N (2x10 mL), y filtración.

⁵Título del artículo: "Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina" (Pág. 40: Extracción).

- v. Se alcaliniza la fase acuosa acida (hasta pH 9,8) con una solución acuosa de carbonato de sodio $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{ac})$ 0,7 M.
- vi. La extracción de los alcaloides libres se realiza con cloruro de metileno CH_2Cl_2 (3x5 mL). Se elimina la fase acuosa.
- vii. Se juntan todas las partes orgánicas, seguidamente se proceden a secar con sulfato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$ y luego se realiza la concentración para así obtener el EBA (28 mg; 0,56%).

Observación. - Hoet y Ríos (1980), así como Vitale et al. (1995), hicieron la determinación cuantitativa de alcaloides totales, y no realizaron el aislamiento de cada alcaloide individual. A pesar de ello, el método que emplean hasta la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA), es uno de los métodos clásicos que siguen vigentes, es por ello que lo hemos presentado en esta parte.

d) Comparación de Procedimientos

Los dos métodos de aislamiento de alcaloides que se presenta en la sección I.A.2 (págs. 9-11), siguen dos pasos principales para obtener el Extracto Bruto de Alcaloides, que es el procedimiento experimental realizado en nuestra tesis. A continuación, resumimos el esquema de trabajo:

- **Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**
 - i. Desengrase con solventes orgánicos: Esta etapa tiene como objetivo remover los lípidos y pigmentos coloreados que contiene la planta, para obtener extractos exentos de sustancias que dificulten la purificación ulterior del alcaloide.
 - ii. Alcalinización con NH_3 (ac): Esta etapa tiene como objeto liberar los alcaloides, que se encuentren formando sales con ácidos orgánicos.

- iii. Extracción con solventes (maceración, reflujo o soxhlet): Esta etapa tiene como objeto la extracción exhaustiva de las bases alcaloidales, verificado por un test de alcaloides (Mayer o Dragendorff).
- iv. Eliminación del solvente por destilación a presión reducida y obtención del EBO.
- **Separación líquido-líquido (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides, EBA)**
 - v. Disolución del EBO con ácidos, $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$ o $\text{HCl}(\text{ac})$: Esta etapa tiene como objetivo extraer los alcaloides como sales.
 - vi. Lavado con solventes orgánicos (éter de petróleo, diclorometano, y/o cloroformo) y eliminación del solvente orgánico. Esta etapa tiene como objetivo eliminar la mayor parte de compuestos coloreados solubles en solventes orgánicos.
 - vii. Alcalinización (con $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{ac})$, $\text{NaOH}(\text{ac})$ ó $\text{NH}_3(\text{ac})$) de la fase acuosa. Mediante la alcalinización de los extractos acuosos ácidos las sales de alcaloides retoman a su forma de bases libres.
 - viii. Extracción con solventes orgánicos: En esta etapa se procede a la extracción de los alcaloides libres de la fase acuosa alcalina, mediante extracción líquido- líquido.
 - ix. Eliminación del solvente por destilación a presión reducida y obtención del EBA.

2.1.5 Purificación de los alcaloides

A continuación, presentaremos un procedimiento para la purificación del alcaloide, partiendo del extracto bruto de alcaloides, este método se utilizó en esta tesis (Sec. II.G.3, Pág. 68).

- a) **Procedimiento de K. Hostettmann, M. Hostettmann y O. Sticher (1980)**
“Rapid preparative separation of natural products by centrifugal thin-layer chromatography”

El principio de la operación por el cromatotron es simple, ver la siguiente figura 20:

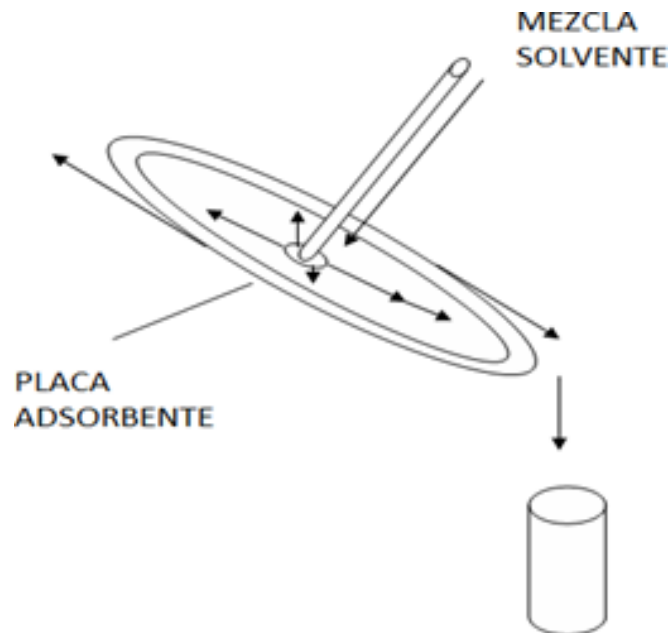


Figura 20. Esquema del Principio de Cromatografía en Capada Delgada Centrífuga
(Stahl, 1982)

- i El plato rotor se cubre con Silica gel GF 254, con un espesor de 2mm (Preparación: con 60 g de silica gel, 2,4 g de Sulfato de Calcio semihidratado y 120 mL de agua).
- ii El plato rotor es instalado en el Cromatotron, luego se humedece con cloroformo: metanol (9:1) (para separar triterpenos).
- iii La mezcla para separar es aplicada cerca del centro del plato rotor junto con el eluente.
- iv El flujo rotacional es de 4-6 mL/min.
- v La detección se lleva a cabo con UV de 254 – 360 nm.vi Se recolecta fracciones de 2-4 mL.

2.1.6 *Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (Reyna – 2011)*

La forma actual de identificar los compuestos orgánicos es a partir de información complementaria proporcionada por cuatro espectros técnicas espectroscópicas: la espectrometría de masas, EM, espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrogeno (RMN¹H) y de carbono (RMN¹³C), espectroscopia de Infrarrojo, IR y espectroscopia ultravioleta, UV.

La amplitud de cualquier metodología se puede definir como la cantidad de información útil que proporciona, que depende no solo de la cantidad total de información sino también de su interpretabilidad y varía de molécula a otra. En general, se puede decir que la utilidad disminuye en el siguiente orden:

RMN (¹H y ¹³C) > EM >> IR > UV

a) Espectrometría de Masas, EM

Un espectrómetro de masas bombardea una sustancia con un haz de electrones de alta energía y registra cuantitativamente el resultado a modo de un espectro de fragmentos de ión positivo. Este registro corresponde al espectro de masas. La separación de los fragmentos de ión positivo tiene como base la masa (estrictamente la relación masa/ carga, aun cuando la mayoría de los iones tienen carga simple).

Los espectros de masa se obtuvieron a una energía del haz de electrones equivalente a 70 electrón-volts. El fenómeno más simple que ocurre cuando se elimina un solo electrón de una molécula en la fase gaseosa de un electrón de un haz de electrones, formado el ion (padre) (M) de la molécula. Este representa el radical catión. Muchos de estos iones padres se desintegran en 10^{-10} a 10^{-3} segundos para dar lugar, en el caso más sencillo, a un fragmento cargado positivamente y un radical.

De este modo, se forman varios iones fragmento y cada uno de estos puede descomponerse para dar lugar a fragmentos menores. Es importante reconocer el pico padre debido a que el mismo proporciona el peso de molecular del compuesto. El pico más intenso del espectro, denominado pico base, tiene asignado un valor de 100%.

El espectrómetro muestra estos resultados en un gráfico donde la intensidad de los fragmentos de iones positivos es relativa a m/z (es decir, relativa a su masa, ya que los iones tienen una sola carga); obteniendo así un espectro de masas.

En la espectrometría de masas existen dos aplicaciones fundamentales en el estudio de las sustancias orgánicas:

- i Determinación de la masa molecular de un compuesto ensayado, donde la precisión es superior en comparación con cualquier otro método; y
- ii Deducción de la estructura del compuesto partiendo de un análisis cuidadoso de los diversos fragmentos que componen el espectro de masas.

La espectroscopia de masas ayuda a determinar la estructura de nuevas sustancias de varias maneras diferentes: puede proporcionar una masa molecular precisa; puede proporcionar la fórmula molecular, o al menos reducir la probabilidad a muy pocos; puede indicar la presencia de ciertos bloques de construcción en la molécula.

Actualmente, la espectrometría de masas-EM se usa para analizar mezclas de compuestos orgánicos cuando los compuestos han sido previamente aislados de la mezcla. El acoplamiento en línea de equipos CG/EM y de cromatografía líquida- HPLC/EM es una de las principales técnicas para el análisis de mezclas.

b) Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN¹H

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) representa básicamente otra forma de absorción. Bajo condiciones adecuadas, una muestra puede absorber radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia a frecuencias gobernadas por las características de la muestra. Una gráfica de las frecuencias de picos es lo que constituye el espectro de RMN (expresado en unidades de δ , en partes por millón–ppm) en función de las intensidades de tales señales.

En este proceso de absorción de energía que sufre el núcleo de un elemento, para este caso el hidrógeno, se le coloca en un campo magnético fuerte y simultáneamente se lo irradia con energía electromagnética.

Esta absorción de energía, como todos los demás procesos que ocurren en la escala atómica y molecular, está cuantizada: la absorción de energía ocurre solo cuando la fuerza del campo magnética y la frecuencia de la radiación electromagnética (sobre un núcleo de hidrógeno especial) tienen valores específicos.

La interpretación de un espectro de RMN involucra el análisis de las tres principales características que presentan estos espectros:

- i Los “desplazamientos químicos”, esto es la posición y número de señales diferentes que aparecen en el espectro: proporciona información sobre los diferentes tipos de hidrógeno en la molécula y el entorno químico de cada tipo de protón;
- ii La intensidad de cada señal, registrada experimentalmente por el equipo de RMN como una “integración”: nos indica el número de hidrógenos que corresponde a cada señal;

iii El “acoplamiento spin-spin”, esto es la interacción entre hidrógenos vecinos, que se presenta en el espectro como divisiones de cada señal: nos indica el número de hidrógenos vecinos que tiene el protón que origina la señal.

Un espectro de RMN se considera plenamente identificado cuando a cada una de las señales que aparecen en el espectro se le puede asignar uno o un grupo de hidrógenos de la molécula en estudio. Esto es, a cada hidrógeno, o grupo de hidrógenos equivalentes, de la molécula debe corresponder una señal en el espectro que satisfaga los requerimientos de desplazamiento químico, integración e interacción spin-spin correspondientes.

c) **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13, RMN¹³C**

La RMN¹³C se ha convertido en método más importante para dilucidar la estructura de los compuestos orgánicos. Mientras la RMN¹H nos permite identificar los protones enlazados a la estructura de la molécula, la RMN¹³C nos permite identificar a los átomos de carbono; por ello, la RMN¹³C es un complemento perfecto de la RMN¹H para elucidar la estructura completa de un compuesto.

Igual que en el isótopo de hidrógeno, ¹H, el núcleo del isótopo de carbono-13, ¹³C, tiene un número de espín $I = \frac{1}{2}$, que permite utilizarlo ya que dará una señal en espectroscopía de RMN, es por eso que, los principios físicos de la RMN¹³C son los mismos que los de la RMN¹H. A pesar de ello, se presenta una diferencia. En la RMN¹H se estudia al isótopo natural más común del hidrógeno, ¹H, cuya abundancia es del 99,98% del total de hidrógenos. En cambio, en la RMN¹³C se estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ¹³C, que constituye el 1,1 % del elemento carbono, por lo que se tiene una disminución de la sensibilidad. Esta desventaja se convierte en una ventaja porque que no se observan los desdoblamientos del tipo ¹³C – ¹³C en los espectros RMN¹³C, y aunque dichos núcleos vecinos pueden desdoblar sus señales entre sí, la posibilidad que se encuentren dos núcleos de ¹³C resulta ser muy raro.

La desventaja de tener una baja abundancia isotópica del ^{13}C es que se debe hacer uso de técnicas especiales que hacen que en el espectro las áreas de los picos no sean proporcionales al número real de carbonos en la molécula. Por lo cual, la integración de la señal no se practica en la RMN ^{13}C .

Otra desventaja es la necesidad de utilizar mayor cantidad de muestra (aproximadamente 10 - 20 mg) que la requerida para obtener un espectro de RMN ^1H (aproximadamente 1 - 3 mg).

Al igual que la RMN ^1H , la RMN ^{13}C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos de la RMN ^{13}C son más o menos paralelos a los de la RMN ^1H . El compuesto de referencia, tetrametilsilano, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, TMS, absorbe a un campo alto, mientras que los átomos de carbono aldehídico y carboxílico lo hacen a campos más bajos.

Los desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C son mucho mayores que los observados en la RMN ^1H , extendiéndose la zona de absorción en el rango de 0 a 250ppm (δ) hacia campo bajo de la señal del TMS. Esto hace que los espectros de RMN ^{13}C sean más sencillos que los de hidrógeno, ya que en un espectro de ^{13}C es poco probable que se observen señales sobrepuestas.

Existen tres clases de espectros de RMN ^{13}C : en uno se observa los acoplamientos espín-espín $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (espectro acoplado a ^1H), y en los otros no (espectro desacoplado a ^1H y DEPT):

- i. En el **espectro de RMN ^{13}C desacoplado a ^1H de banda ancha**, el núcleo de ^{13}C no está acoplado con los del ^1H y, de manera que, no muestra acoplamiento espín-espín. El desacoplamiento se hace electrónicamente irradiando la muestra con una segunda radiofrecuencia. Ya que no hay desdoblamiento de señales, la señal de cada grupo de átomos de carbono magnéticamente equivalentes se presenta como un "singulete". Este tipo de

espectro permite determinar fácilmente el número de átomos de carbono diferentes en una molécula, correspondiente al número de señales que aparecen en el espectro.

- ii. En los espectros **de RMN¹³C acoplado a ¹H** no se suprime el acoplamiento ¹³C –¹H y, en tal, la señal de cada carbono se desdobla por acción de los protones directamente enlazados a él, aplicándose también la regla “n + 1”, donde n es el número de átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono que se analiza.

De este modo, un carbono cuaternario (enlazado a cuatro grupos alquílicos y sin H enlazado a él) presenta una señal singulete; un carbono terciario (que solo tiene 1H enlazado) presenta un doblete; un carbono secundario (que tiene 2H) presenta un triplete y un carbono primario (un grupo metilo, CH₃) presentará un cuadruplete.

- iii. Los espectros de RMN¹³C – DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, Transferencia por polarización aumentada y no distorsionada) permiten distinguir el tipo de carbono CH₃, CH₂, CH o Cuaternario, al que pertenece una determinada señal. En particular, es especialmente útil para superar la confusión de un espectro de RMN¹³C acoplado a ¹H en el que se superponen las señales multipletes próximas. El experimento DEPT consta de tres espectros: un primer espectro registrado con pulsos de 45° (DEPT - 45) en el que aparecen señales de CH, CH₂ y CH₃; un segundo espectro registrado con pulsos de 90° (DEPT – 90) que solo muestra las señales de los carbonos unidos a un solo hidrógeno (CH); y por último un tercer espectro registrado con pulsos de 135° (DEPT – 135) en el que aparecen señales positivas para CH y CH₃, absorciones negativas para CH₂, y en el que los carbonos cuaternarios carecen de señal.

d) Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional

Existen diversos experimentos de resonancia magnética nuclear de dos dimensiones, entre los más utilizados se encuentran los experimentos RMN bidimensional homonuclear COSY⁶, y de RMN bidimensional heteronuclear HETCOR⁷ y HMBC⁸.

Los experimentos bidimensionales, **COSY**, **HETCOR**, muestran dos ejes de coordenadas, los cuales están representados por desplazamientos químicos (δ , en ppm).

Espectros ¹H-¹H COSY: En los espectros ¹H-¹H COSY se pueden observar la correlación de pares de núcleos de hidrógeno por medio del acoplamiento spin-spin, a través de un diagrama de entorno. En este diagrama, el espectro de hidrógeno aparece a lo largo de la diagonal, como manchas contorneadas, las cuales representan la intensidad de los picos. Fuera de la diagonal se observan otras manchas contorneadas, las cuales son el resultado de la correlación de pares de núcleos por medio del acoplamiento spin-spin.

En resumen, este tipo de espectros abarcan a los acoplamientos intensos (geminales y vecinales).

⁶ COSY: Correlated Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación).

⁷ HETCOR: Heteronuclear Correlation Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación Heteronuclear).

⁸ HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple).

Debemos notar que en los espectros ^1H - ^1H COSY, se muestran manchas contorneadas de menor intensidad con respecto a las examinadas. Estas manchas se deben a que también se pueden detectar a veces interacciones entre núcleos enlazados a larga distancia (tres y hasta cuatro enlaces).

e) Espectroscopia de Ultravioleta, UV

El espectro de UV de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda, λ de absorción, en el rango de la radiación ultravioleta cercano (200 – 400 nm), en relación a la intensidad de absorción (expresada como absorbancia $A \times 100$; o absortividad molar, $\text{Log } \epsilon$). El espectro UV se basa en una banda ancha de absorción extendida sobre un amplio rango de longitudes de onda, cuyas características principales son su posición y su intensidad.

La posición de la absorción UV se especifica como λ máx (nm), es decir la longitud de onda del punto máximo de la curva de absorción, la cual corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para que se produzca una transición electrónica.

Los espectros UV proporcionan menos información sobre de la estructura de los compuestos que los espectros de masa y de RMN, y se utilizan principalmente y prácticamente de manera exclusiva en el estudio de sistemas conjugados, así como:

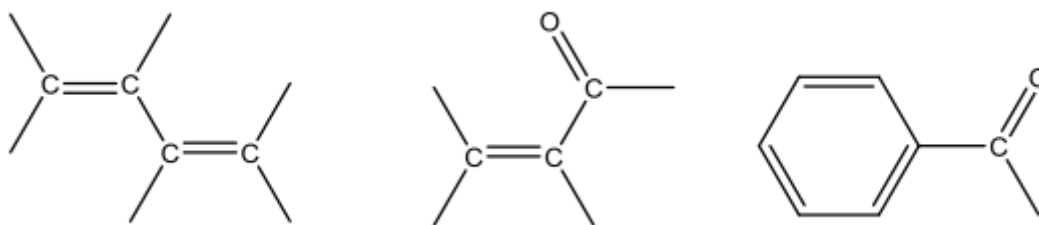


Figura 21. Ejemplos de Sistemas Conjugados

La espectrometría UV toma ventaja de esta selectividad en caracterizar solo sistemas conjugados: la mayor parte de una molécula compleja resulta

transparente (no absorbe) en el UV, y por tanto estos grupos conjugados característicos pueden ser puestos en evidencia dentro de la molécula.

Origen de las absorciones UV: El estado fundamental de una molécula orgánica contiene los electrones de valencia en tres tipos de orbitales moleculares: orbitales sigmas (σ), orbitales pi (π) y orbitales ocupados, pero no enlazados (η). Así para el grupo carbonilo se tiene:

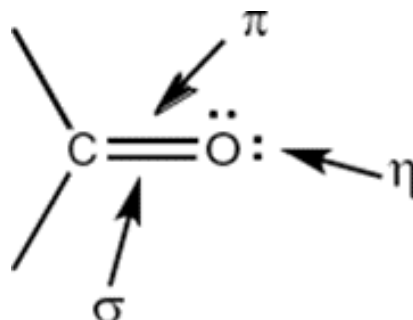


Figura 22. Orbitales moleculares presentes en el grupo carbonilo, C=O.

La energía absorbida por la molécula en la región UV (200 – 400 nm) produce transiciones electrónicas de los electrones de valencia de la molécula presentes en los orbitales σ , π o η , a un orbital excitado de mayor energía.

Capítulo III. Desarrollo del Trabajo de Investigación

3.1 Presentación

El estudio de los tallos de la “Cascarilla” (*Cinchona pubescens*), se inició durante el Per. Acad. 2006-1 (May-Jun'06) con el análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los tallos de esta planta.

Posteriormente, el tema de estudio de esta planta fue inscrito como tema de Tesis de Licenciatura en Ciencias - Mención Química, con número de Registro 962 de fecha 09 de mayo del 2022 con el título “Estudio químico de los Tallos de *Cinchona Pubescens*”.

Los tallos de “Cascarilla”, *Cinchona pubescens*, fueron recolectadas en la localidad de Yuracmallo (a 1 380 msnm, distrito de San Juan de Oro, Provincia de Sandia, Dpto. Puno), por la Dra. Joaquina Albán Castillo.

La primera parte del trabajo experimental, desde la molienda de la planta hasta la obtención del Extracto Bruto de alcaloides, se realizaron en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175) del Laboratorio de Química Inorgánica N°12 (pabellón C) de la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería, en el periodo comprendido entre junio del 2006 y noviembre del 2007, demandando un trabajo aproximado de 8 meses de trabajo efectivo. Durante este periodo, no tuvimos éxito en lograr la purificación, mediante la precipitación del Sulfato de quinina, del Extracto Bruto de Alcaloides.

La segunda parte del trabajo experimental, que consistió en la purificación del Extracto Bruto de alcaloides mediante cromatografía en columna seguida de cromatografía en capa delgada centrifugada, con el aislamiento del alcaloide quinina y la identificación de este alcaloide mediante métodos espectroscópicos, fue realizada por la autora de esta tesis en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Paraná, dirigido por el Dr. Brás H. de Oliveira, ubicado en Curitiba (Brasil), entre el 01 de octubre y el 30 de octubre del 2007.

La ejecución de esta tesis involucró la realización de cada una de las etapas que comprende la investigación fitoquímica, con excepción de la recolecta de la planta, tal como se describe a continuación.

3.2 Metodología de Investigación para el Estudio Químico (Alcaloides) de Plantas Medicinales

La estructura de la metodología de investigación para el estudio químico (alcaloides) de plantas medicinales está dividida en dos etapas (Reyna, V. - 2001):

Etapas I: Trabajos Preliminares:

- A. Selección y recolección de la planta
- B. Estudio Etnobotánico y Etnomedicinal de la planta
- C. Determinación sistemática (identificación botánica)
- D. Estudio bibliográfico

Etapas II: Trabajo experimental en el laboratorio (alcaloides)

Secado y molienda de la planta

- E. Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)
- F. Análisis cuantitativo de alcaloides
- G. Aislamiento de compuestos puros
 - a) Extracción sólido-líquido de la planta: Mezcla Bruta Orgánica
 - b) Separación líquido-líquido: Extracto Bruto de Alcaloides
 - c) Purificación: Aislamiento de cada alcaloide puro

Cromatografía/recristalización/preparación de derivados

- H. Identificación Clásica del Sulfato de quinina
 - a) Procedimientos clásicos: punto de fusión, composición centesimal, CCF
- I. Identificación Espectroscópica de la quinina
 - a) Procedimientos espectroscópicos: Masas, RMN¹H, RMN¹³C.
 - b) Desarrollo de la investigación para el estudio químico (alcaloides) de plantas medicinales.

3.3 Trabajo Preliminar

3.3.1 Selección y recolección de la planta. Tallos de *Cinchona pubescens*.

Se seleccionó el estudio los tallos de *Cinchona pubescens* por disponer de suficiente cantidad de material vegetal para realizar el estudio químico que nos fuera proporcionado por la Dra. Joaquina Albán Castillo, y por ser una de las plantas de mayor interés en el Perú y el mundo.

Los tallos de la “Cascarilla” (*Cinchona pubescens*) se recolectaron en la localidad de Yuracmallo (1 380 msnm) ubicado en el distrito de San Juan de Oro (provincia de Sandía, Dpto. de Puno) el 12 de octubre de 2005, por la Dra. Joaquina Albán Castillo, y nos fueron entregadas en estado seco (estufa a 35°C, 20 horas y 2 días) en mayo del 2006.

3.3.2 Estudio etnobotánico y Etnomedicinal

La importancia de las Cinchonas desde el siglo XVII se debió al uso de la corteza en el tratamiento de la malaria. La corteza de estas plantas fue introducida en el siglo XVII en Europa por sus propiedades febrífugas y antipalúdicas, después que la condesa de Cinchón fue tratada y curada de la malaria en el año 1638 (Verpoorte, R., et al. -1989).

En el Perú se bebe la decocción en casos de arritmias cardiacas, fiebre, calambres musculares, resfríos e indigestión. En la etnia Campa-Ashánica perteneciente las amazonas peruano, se 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 (Alonso, J., -2004).

La identificación botánica de la Quina (*C. pubescens*) fue proporcionada por la Dra. Joaquina Alban Castillo.

En el anexo 5 se proporciona una evaluación etnobotánica medicinal por Perez, 2017.

3.3.3 Determinación sistemática (identificación botánica)

La “cascarilla” fue identificada como *Cinchona Pubescens*, por la Dra. Joaquina Albán Castillo y está depositada en el Herbario de San Marcos (Código 15821).

3.3.4 Estudio bibliográfico

La autora de esta Tesis de Licenciatura realizó la búsqueda de las referencias bibliográficas relacionadas a la quinina, correspondientes al período de 2000 – 2021, y en particular a aquellas referidas a la cuantificación de alcaloides en los tallos.

3.4 Trabajo Experimental en el Laboratorio (Alcaloides)

3.4.1 Secado y molienda de la planta.

Los tallos de la “Cascarilla” nos fueron entregados secos (estufa a 35°C, 20 horas – 2 días) en mayo del 2006, por la Dra. Joaquina Albán Castillo⁹.

Esta muestra seca se cortó en trozos gruesos con una tijera de podar; luego se pulverizó a grano fino en un molino de cocina “Moulinex” (750 W), hasta malla de 500 µm.

3.4.2 Análisis cualitativo (Marcha Fitoquímica)

- 1) Muestra: tallos secos y pulverizados de “Cascarillas” (*Cinchona pubescens*).
- 2) Procedimiento: la muestra vegetal se analizó mediante tres procedimientos diferentes:
 - a) Procedimiento 1: Reyna – 1999, de acuerdo a Rondina & Coussio (1969), del 15 de mayo al 20 de junio del 2006 (Anexo 1).
 - b) Procedimiento 2: Torpoco – 2005, de acuerdo a Migdalia Miranda (2002), del 6 de junio al 29 de setiembre del 2006 (Anexo 2).

⁹ Jefa del Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica del Museo de Historia Natural y Profesora Principal de la Facultad de Ciencias Biológica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima- Perú).

- c) Procedimiento 3: Villacrés – 1995, del 29 de mayo al 5 de setiembre del 2006 (Anexo 3).
- 3) Resultados: Los tres procedimientos realizados proporcionaron resultados similares, los cuales se detallan en los Anexos 6, 7, y 8 a continuación se resume:
- a) Contiene: Alcaloides (+++), aminogrupos primarios y/o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), catequinas (+), taninos (++) , triterpenos y esteroides (+), quinonas, antraquinonas o antranoles (+), flavonoides (+) y saponinas (+).
- b) No contiene: Lactonas y coumarinas.

3.4.3 Análisis cuantitativo de alcaloides

En nuestra tesis se analizó 20,003 g de tallos de la “Cascarilla” (*C. pubescens*). Se realizó el análisis de la muestra (colectada en San Juan de Oro - Puno, 12 octubre.2005). Del 21 agosto - 20 diciembre.2007.

1. Procedimiento - United States Pharmacopoeia – USP, 20th Ed., - 1980 (descripción del primer análisis)

Observación. - Las etapas (a) y (b), extracción sólido-líquido y separación líquido-líquido, respectivamente, son similares a aquellas correspondientes a la Sec. II.G. (Aislamiento de la quinina, ver págs. 64-75), por lo que en esta sección se resumirán ambas etapas.

a) Extracción sólido-líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico

Desengrase del material vegetal, seco y molido, con n-hexano.

Veinte gramos (20,003 g) de muestra, se colocó en un frasco erlenmeyer de 1 L y se adicionó 300 mL de n-hexano. Se agitó¹⁰ durante 2 horas y luego se decantó la solución orgánica. Al sólido recuperado se le adicionó una nueva porción de 300 mL de n-hexano y se repitió la

¹⁰ Para la agitación se utilizó un agitador magnético eléctrico con eje flexible y paleta de vidrio, modelo MLW (Ex-República Democrática Alemana).

extracción. Este proceso se realizó diez veces más. Finalmente, la muestra sólida se dejó secar a temperatura ambiente.

Alcalinización con amoníaco concentrado NH₃(ac) 15 N.

- i. La muestra desengrasada y seca, se colocó en un cartucho de tocuyo y se humedeció con 10 mL de amoníaco concentrado NH₃(ac) 15 N, durante una hora.

Extracción por solventes (Obtención del Extracto Bruto Orgánico)

- ii. A la muestra alcalinizada (que se encontraba dentro del cartucho y colocada en el equipo soxhlet) se adicionó 70 mL de éter etílico y se dejó macerar, a temperatura ambiente, durante una hora. Luego se adicionó, a la mezcla anterior, 200 mL de éter etílico y se extrajo en soxhlet durante 6 horas/día, por 20 días (del 21 agosto – 26 setiembre.2007).
- iii. La mezcla orgánica se concentró en el rotavapor (30°C, 400-200 mbar), sin llegar a sequedad, obteniéndose así el Extracto Bruto Orgánico (que no se pesó debido a la continuación del proceso).

b) Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides
Extracción del Extracto Bruto Orgánico con solución ácida.

- i. El extracto bruto orgánico se disolvió con 225 mL de éter etílico: cloroformo (2:1) y se colocó en un embudo de separación de 1 L.
- ii. El extracto orgánico se extrajo con 100 mL de disolución de ácido sulfúrico H₂SO₄ (ac) 0,5 N.
- iii. Esta operación se repitió seis veces más, hasta que el solvente orgánico dio prueba negativa de alcaloides mediante el test de Mayer.

Alcalinización del extracto acuoso con disolución de amoníaco.

- iv. El extracto acuoso ácido se alcalinizó con 30 mL de amoníaco concentrado NH_3 (ac) 15 N. La disolución final presenta un pH 9.

Extracción de alcaloides con solventes orgánicos (Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides).

- v. El extracto acuoso se extrae con 100 mL de cloroformo en un embudo de separación de 1 L.
- vi. Esta operación se realiza un total de seis veces más (hasta que la solución acuosa presentó test de Mayer negativo). Se elimina la fase acuosa libre de alcaloides.
- vii. Los extractos orgánicos se secan con sulfato de sodio anhidro y, previa filtración, se coloca en un balón de 500 mL y se concentra en el rotavapor (30°C, 400-200 mbar) hasta sequedad.

c) Eliminación de las bases volátiles

- i. El sólido obtenido se disuelve con 100 mL de cloroformo y se lleva a concentrar al rotavapor, para eliminar el solvente. Se repite esta operación un total de tres veces más. Este proceso tuvo por objeto la eliminación total de la base amoníaco NH_3 (g).
- ii. Finalmente, se lleva a sequedad en el rotavapor, obteniéndose así el Extracto Bruto de Alcaloides (EBA) que no se pesó.
Para el segundo análisis ver el Anexo 10.

d) Titulación. Determinación potenciométrica (20 diciembre.2007)

- i. El extracto bruto de alcaloides (EBA), contenido en un balón de 250 mL, se disolvió con 50 mL de cloroformo. Luego, se agregó 20 mL de solución estandarizada de ácido sulfúrico H_2SO_4 (ac) 0,5046 N, con una pipeta graduada. El solvente orgánico se eliminó en el rotavapor quedando una solución acuosa ácida que contiene alcaloides en forma de sales. Finalmente, esta solución se trasvasó a un vaso de 200 mL.

- ii. Se tituló la solución ácida con una solución estandarizada de hidróxido de sodio NaOH(ac) 0,5097 N, utilizando un potenciómetro¹¹ con electrodo de vidrio para determinar el punto de equivalencia. El análisis de la curva de titulación (Anexo 9) muestra que el punto de equivalencia corresponde a la adición de 19,5 mL de base, NaOH(ac).

e) **Cálculo de la cantidad y del porcentaje de alcaloides en la muestra**

- i. Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico H₂SO₄(ac) (20 mL; 0,5046 N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:

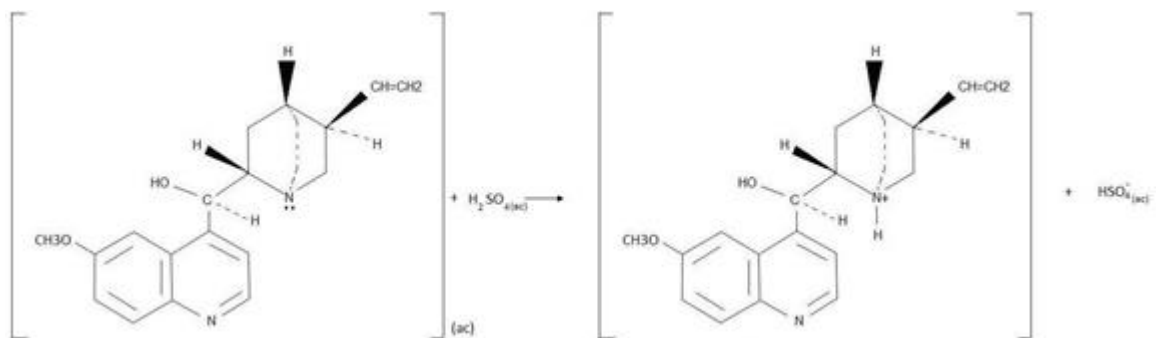


Figura 23. Exceso de solución de ácido sulfúrico H₂SO₄(ac)

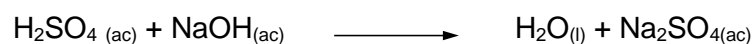
y se tiene que:

$$N^{\circ} \text{ meq ácido (sobrante)} = N^{\circ} \text{ meq ácido total} - N^{\circ} \text{ meq alcaloide ... } (\alpha)$$

Dónde:

$$N^{\circ} \text{ meq ácido total} = N \times V = 0,5046 \times 20 = 10,092 \text{ meq ...}(\beta)$$

- ii. El ácido sulfúrico H₂SO₄(ac) sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 19,1 mL de solución de hidróxido de sodio NaOH(ac) 0,5097 N, según la ecuación:



y en el punto de equivalencia se cumple que:

$$N^{\circ} \text{ meq. ácido (sobrante)} = N^{\circ} \text{ meq. Base ...}(\gamma)$$

¹¹ Potenciómetro Hanna pH 211 (Laboratorio N°12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería).

iii. La cantidad (meq) de hidróxido de sodio ($N=0,5097$ y $V= 19,5$ mL) se determina por la relación: $N^\circ \text{ meq} = N \times V \text{ (mL)}$

$$N^\circ \text{ meq base} = N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

$$N^\circ \text{ meq(NaOH)} = 0,5097 \text{ N} \times 19,5 \text{ mL}$$

$$N^\circ \text{ meq(NaOH)} = 9,9391 \text{ meq}$$

La cantidad de meq de ácido sobrante se determina por la relación (γ):

$$N^\circ \text{ de meq (H}_2\text{SO}_4\text{) sobrante} = 9,9391 \text{ meq} \dots(\Theta)$$

La cantidad de (meq) de ácido sobrante se determina por la ecuación (γ)

La cantidad (en meq) de alcaloides presentes se determina reemplazandolas cantidades (β) y (Θ) en la relación (α):

$$N^\circ \text{ meq de alcaloide} = N^\circ \text{ meq de ácido total} - N^\circ \text{ meq de ácido (sobrante)}$$

$$= 10,092 \text{ meq} - 9,9391 \text{ meq} = \mathbf{0,1529 \text{ meq}}$$

iv. La cantidad (en mg) de alcaloides (quinina) se determina teniendo en cuenta que:

$$N^\circ \text{ eq} = \frac{W}{1 \text{ Eq} - \text{g}} \quad \vee \quad 1 \text{ Eq} - \text{g} = \frac{\bar{M}}{\Theta}$$

Donde Θ es el número de hidrógenos intercambiados en la reacción ácido-base (para la quinina $\Theta = 1$) y \bar{M} es el peso molecular de la sustancia (para la quinina $\bar{M} = 324,41$ g/mol).

Luego:

$$W = N^\circ \text{ meq} \times \bar{M}$$

$$W = 0,1529 \times 324,41 \text{ g/mol}$$

$$\mathbf{W = 49,6022 \text{ mg de quinina (en 20,003 g de muestra seca)}}$$

El porcentaje de alcaloides en la muestra se determina por la relación:

20,003 g → 100%
0,0496 g → % de alcaloides (como quinina)

$$\% \text{ de alcaloides (como quinina)} = \frac{0,0496 \times 100}{20,0003} = 0.24\%$$

Para el caso del segundo análisis se obtuvo 132,26 mg dando así 0,66 % de alcaloides (como quinina, Anexo 12).

Estos resultados son inferiores al 1,49 % reportado por Meza, A., et al. -2013, quienes analizan los tallos de la *Cinchona pubescens*.

3.4.4 Aislamiento de la quinina

Como se describió en la metodología de investigación (pág. 55) el aislamiento de compuestos puros comprende tres etapas:

- 1) Extracción sólido-líquido de la planta: para la obtención de la Extracto Bruto Orgánico, EBO.
- 2) Separación líquido-líquido: para la obtención del Extracto Bruto de Alcaloides-EBA.
- 3) Purificación: para el aislamiento del compuesto puro.

Las dos primeras etapas hasta la obtención del EBA, se realizaron en dos oportunidades (del 29 Setiembre.2006 – 18 enero.2007).

La tercera etapa, la purificación del EBA mediante técnicas cromatográficas, se realizó durante la estadía que realizó la autora de esta tesis, del 1 al 30 de octubre.2007, en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Paraná Curitiba - Brasil, bajo la dirección de Dr. Brás H. de Oliveira, habiendo logrado la purificación del alcaloide quinina.

Un ensayo de purificación mediante precipitación de sulfato de quinina, realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales que se encuentra en el pabellón C de la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería, no proporcionó resultados favorables.

A continuación, se procederá a describir el procedimiento realizado en cada una de estas etapas hasta lograr la obtención del alcaloide puro (quinina), la descripción se hará del segundo ensayo.

1. Extracción sólido - líquido: Obtención del Extracto bruto orgánico (EBO)

a) Desengrase con n-hexano.

- i. En un frasco Erlenmeyer de 1 L se coloca 150 g de la muestra y se adiciona 300 mL de n-hexano. La mezcla se pone en agitación¹², a temperatura ambiente, durante una hora, y luego se deja en reposo hasta el día siguiente (24h).
- ii. Se separa el líquido sobrenadante de color amarillo oscuro, con una pipeta volumétrica de 50 mL. Al sólido restante se adiciona una nueva porción de 300 mL de n-hexano y se agita. Este procedimiento se realiza 12 veces.
- iii. El sólido húmedo se transfiere a una bandeja de 17cm x 26 cm, y se deja secar al aire a la temperatura ambiente.
- iv. La muestra seca y desengrasada (146 g) se introduce en un cartucho de tocuyo, y se coloca dentro del equipo soxhlet. Luego se añade sobre el cartucho, con la ayuda de una pipeta, 200 mL de solución de amoníaco concentrado NH₃ (ac) 15 N, humedeciéndose así completamente toda la muestra, y se deja en reposo durante dos horas.

b) Extracción con solventes

- v. Sobre la muestra alcalinizada, que se encuentra dentro del cuerpo central del equipo soxhlet, se adiciona 200 mL de una mezcla de metanol-cloroformo (1:1) y se deja macerar durante 24 horas. La solución final adquirió un color marrón oscuro.
- vi. Sobre la muestra, que se encuentra dentro del cuerpo central del equipo soxhlet, se adiciona 900 mL de una mezcla de metanol- cloroformo-acetato de etilo (1:1:4),

¹² Para la agitación se utilizó un agitador eléctrico de eje flexible con paleta de vidrio MLW ER10

y se coloca a reflujo 6 horas/día, durante 35 días (80 horas), hasta que el solvente en el cuerpo central del soxhlet dió test de Mayer negativo.

- vii. Los extractos orgánicos se juntaron y luego se concentró en el rotavapor (40 °C, 300-400 mbar), hasta casi sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico (EBO), de color marrón oscuro, que no se pesó.

2. Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA)

a) Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida

- i. El extracto bruto orgánico se disolvió con 20 mL de cloroformo y se colocó en un embudo de separación de 250 mL. Esta solución se extrajo con 200mL en solución de ácido sulfúrico H_2SO_4 (ac) 0,5 N.
- ii. Este procedimiento se realizó cuatro veces. La solución remanente dio prueba negativa de alcaloides (test de Mayer) y se descartó.
- iii. Los extractos acuosos ácidos, de color marrón claro, se reunieron (volumen total = 800 mL) y se colocaron en un embudo de separación de 1 L.
- iv. La disolución ácida, que contiene los alcaloides como sales, fue lavada con 350 mL de cloroformo. Se separó la fase orgánica (que no contiene alcaloides, test de Mayer negativo), de color amarillo, y se descartó. Esta operación se realizó dos veces.

b) Alcalinización del extracto con solución de amoníaco NH_3 (ac) 7,5 N

- v. La disolución acuosa ácida se alcalinizó con 36 mL de NH_3 (ac) 7,5 hasta pH = 9. Se observó un precipitado marrón, y un oscurecimiento de la disolución.

c) Extracción de alcaloides con solventes orgánicos

- vi. La fase acuosa básica (en el embudo de separación) se extrajo con 100mL de cloroformo. Esta extracción se realizó 35 veces, hasta que la fase acuosa estuvo exenta de alcaloides (test de Mayer negativo).
- vii. Los extractos orgánicos se colocaron en un balón de 500 mL y se concentraron en el rotavapor (30° C, 300-400 mbar) hasta casi sequedad.

- viii. 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, NH₃ (g)) que estuvieran disueltas en el extracto.
- ix. Finalmente, se obtuvo 2, 060 mg del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA-2), como una pasta, de color marrón oscuro. El análisis por CCF¹³ indica que el extracto contiene quinina.

Siguiendo este mismo procedimiento se obtuvo 1 627 mg de Extracto Bruto de Alcaloides (EBA-1) a partir de 150 g de muestra vegetal. Este extracto se utilizó para los ensayos de purificación por precipitación de sulfato de quinina.

3. Purificación por cromatografía

Los procedimientos cromatográficos que se realizaron para la purificación del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA) fueron los siguientes:

- a) Análisis preliminar por cromatografía de capa fina-CCF
- b) Cromatografía en columna a vacío - CCV
- c) Cromatografía en placa centrifugada - CCDC

Los procedimientos de CCF se realizaron tanto en nuestro laboratorio en la UNI (Lima, Perú), como en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de Paraná Curitiba-Brasil.

La purificación del EBA y la obtención del alcaloide quinina, se logró durante la estadía en Curitiba-Brasil, mediante dos técnicas cromatográficas, la CCV y la CCDC, y se resumen en el esquema (ver Anexo 15).

¹³ CCF: placas de sílica gel 60 F 254, eluente: Cloroformo-acetona-amoniaco (10:17:1)
Revelador: UV; Rf (quinina=0,62).

a) **Análisis preliminar por cromatografía en capa fina - CCF**

El objetivo de este procedimiento preliminar es seleccionar el eluyente más eficiente para realizar posteriormente la purificación del extracto bruto de alcaloides por cromatografía en columna a vacío (CCV) y/o cromatografía en placa centrifugada (CCDC).

Condiciones de Trabajo:

- i. Muestra: Extracto Bruto de Alcaloide (EBA-2), obtenida en la Sec. II. G.2, precedentes (pág. 67).
- ii. Referencias (alcaloides patrones): Quinina, quinidina, cinchonidina, cinchonidina.
- iii. Placa: Placa de aluminio Kieselgel 60F-254; 0, 2mm.
- iv. Eluyente: acetona: cloroformo: NH₃ 15N (17:10:1); Acetato de etilo: NH₃ 15N (10:0,3); acetato de etilo: metanol: NH₃ 15N (5:5:0,3); acetato de etilo.
Revelador: UV ($\lambda = 254$ y 360 nm)¹⁴

Procedimiento:

La aplicación de las muestras, el desarrollo del cromatograma y el revelado de las placas son procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.

Observaciones: los resultados de este trabajo preliminar nos indica que la quinina ($R_f = 0,62$) es el alcaloide mayoritario (Anexo 11).

b) **Cromatografía en columna a vacío – CCV**

El objetivo de este procedimiento cromatográfico, es obtener fracciones enriquecidas, y si fuera posible puras, del alcaloide que se quiere purificar.

14 Spectroline Modelo Enf-260C

Condiciones de Trabajo:

- i. Muestra: EBA (1,6 g), obtenida en la Sec.II.G.2, (pág. 67)
- ii. Características de la columna: $\phi = 5$ cm, h = 38 cm;
- iii. Adsorbente: Sílica gel 60 para cromatografía en columna (Porosidad = 0,04-0,063), 90g (altura en la columna = 15,5 cm)

Procedimiento:

(El esquema del dispositivo experimental se ilustra en el Anexo 14)

- i. Se colocó una capa de algodón en la parte inferior de la columna y sobre ella se agregó la sílica en polvo, encima otra capa de algodón.
- ii. Luego se adicionó lentamente 200 mL de acetato de etilo, para humedecer la sílica. Este procedimiento se realizó 3 veces más.
- iii. Seguidamente se adicionó la muestra, la cual se disolvió en 5 mL de cloruro de metileno.
- iv. La elución cromatográfica se inició con acetato de etilo (200 mL, fracción N° 1), recibiendo aproximadamente 200 mL de eluyente en un balón de 500 mL.
- v. Se continuó con mezclas (200 mL) de acetato de etilo con cantidades crecientes de metanol (10%, fracción N° 2; 20%, fracción N° 3; etc.), hasta agregar metanol puro (fracción N° 11 y 12), recibiendo todas las fracciones en balones de 500 mL.
- vi. Todas las fracciones presentaban color amarillo de diferentes intensidades y fueron llevadas a sequedad en el rotavapor (50°; 300-400mbar).

Resultados

- i. Se obtuvieron 12 fracciones, las cuales contenían sustancias de color marrón oscuro de aspecto resinoso y cuyos pesos se muestran en la tabla 7.
- ii. Las fracciones N° 3-7 presentaron presencia de alcaloides por cromatografía en capa fina (CCF) (Ver Anexo 13).

- iii. De las 12 fracciones obtenidas, la quinina se presentó parcialmente pura en las fracciones N° 3 y 4 (741 mg), por lo que se decidió continuar su purificación mediante Cromatografía en Capa Delgada Centrifugada – CCDC.

Tabla 7. Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna a vacío.

Fracción	Eluente	Masa del extracto (mg)	CCF (Anexo 13)
f1	Ac.Et	37,2	
f2	10%MeOH-Ac.Et	134	
f3f4	20%MeOH-Ac.Et		alcaloides
	30%MeOH-Ac.Et	741	(quinina)
f5	40%MeOH-Ac.Et	124,7	alcaloides
f6f7	50%MeOH-Ac.Et		
	60%MeOH-Ac.Et	185	alcaloides
f8 f9 f10f11f12	70%MeOH-Ac.Et		
	80%MeOH-Ac.Et		
	90%MeOH-Ac.Et	392	
	MeOH		
	MeOH		

Nota. - Ac.Et = Acetato de etilo, MeOH = metanol.

c) **Cromatografía en Capa Delgada Centrifugada – CCDC¹⁵**

Se realizó la purificación de las fracciones N° 3 y 4 (741 mg) obtenidas por CCV, mediante cromatografía en capa delgada centrifugada CCDC - N° 1, obteniéndose quinina impura (fracción N° 16-19, 231mg), 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.

¹⁵ Equipo utilizado: Cromatotron Modelo 7924 T, Harrison Research.

Las condiciones de trabajo y procedimiento de separación fueron similares para las cuatro eluciones cromatografías y a continuación resumiremos las tres primeras (CCDC- N° 1, 2 y 3), y describiremos lo realizado para la purificación final de la quinina (CCDC-N° 4).

Cromatografía en capa delgada centrifugada 1 - CCDC N° 1

- i. Muestra a purificar: fracciones N° 3-4 (741mg) obtenida de CCV (Sec. II.G.3, pág. 71)
- ii. Resultados: se obtuvieron 23 fracciones de 15 mL c/u.
Las fracciones N° 16-19 (231 mg) contenían quinina impura.

Cromatografía en capa delgada centrifugada 2 - CCDC N° 2

- i. Muestra a purificar: fracciones N°16-19 (231 mg) obtenido de CCDC N° 1
- ii. Resultados: se obtuvieron 20 fracciones de 10 mL c/u.
Las fracciones N° 3-7 (180 mg) contenían quinina impura.

Cromatografía en capa delgada centrifugada 3 - CCDC N° 3

- i. Muestra a purificar: fracciones N° 3-7 (180 mg) obtenido de CCDC N° 2
- ii. Resultados: se obtuvieron 32 fracciones de 10 mL c/u.
Las fracciones N° 3-5 (133 mg) contenían quinina impura.

Cromatografía en capa delgada centrifugada 4 - CCDC N° 4

Condiciones de trabajo

- i. Muestra: fracciones N° 3-5 (133 mg) obtenido de 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. - solo la primera placa, CCDC N° 1, el espesor fue de 2mm).
- iii. Eluente¹⁶: Acetato de etilo: CH₂Cl₂:NH_{3(ac)} 15N (10:1:0,2) y metanol.

¹⁶ Los efluentes para las otras eluciones cromatografías fueron:
CCDC 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.

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

Procedimiento (La foto del equipo se muestra en el Anexo 14)

- i. Se humedeció la placa haciendo pasar el eluyente, luego se adicionó la muestra disuelta en 0,5 mL de etanol.
- ii. Se adicionó 320 mL de acetato de etilo: diclorometano: $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N (10:1:0,2).
- iii. Finalmente, se adicionó 50 mL de metanol, con la finalidad de lavar la placa.

Resultados

- i. Se colectaron 32 fracciones de 10 mL cada una (tubos de ensayo de 100x15mm), la mayoría de las cuales eran incoloras. Las fracciones N° 17-26 (14 mg) proporcionaron un sólido blanco, cuyo análisis por RMN¹H (espectro N° 2, Pág.76) y CCF (ver Anexo 13) nos indica que se trata de quinina pura.
- ii. Conclusión: A partir del Extracto Bruto de Alcaloides obtenido de los tallos de la "Cascaquilla" (*Cinchona pubescens*) se logró aislar el alcaloide mayoritario, quinina.

3.4.5 Identificación Espectroscópica de la quinina.

La determinación estructural de la quinina obtenida de los tallos de *C. pubescens* Se realizó mediante el análisis de sus espectros¹⁷ de Masas, de RMN¹H, de RMN¹³C, 1H-1H COSY.

La muestra analizada fue la fracción N° 17-26 (14 mg) obtenido en la Sec. 6.4 precedente.

CCDC N° 2: Metanol: Ac.Et: $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N (2:8:0,1) y metanol.

CCDC N° 3: AcEt: $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15N(5:0,2) y metanol.

¹⁷ Los espectros de RMN¹H y masas fueron obtenidos durante la estadía que realizó la autora de dicha tesis en el laboratorio de Productos naturales de la Universidad Federal de Paraná (Curitiba-Brasil).

1. ***Espectro de masas (Espectro 1)***

Condiciones de trabajo

- i Equipo: Espectrómetro de masas Triple Cuadrupolo acoplado a Cromatografía Líquida Applied Biosystems, modelo API 3000 (Columna: HP5 30m x 0,25mm Ø; Gas: Helio 1 mL/min).
- ii Laboratorio: Central de Salud Pública de Paraná – LACEN/PR (Brasil)iii Operador: M.Sc. Daniel Altanino de Jesús
- iv Fecha: 29 de octubre del 2007
- v Concentración de muestra: 10 µg/mL (metanol: agua 1:1)
- vi Muestra: Alcaloide obtenido de las fracciones N° 17-26, Se. 6.4 presedente.

Características del espectro:

m/z: 325,5 (ión molecular, $M^+ + 1$); 307,4 ($M^+ - H_2O$): 255,1; 188,1; 172,1 (pico base), 160,1; 81,1.

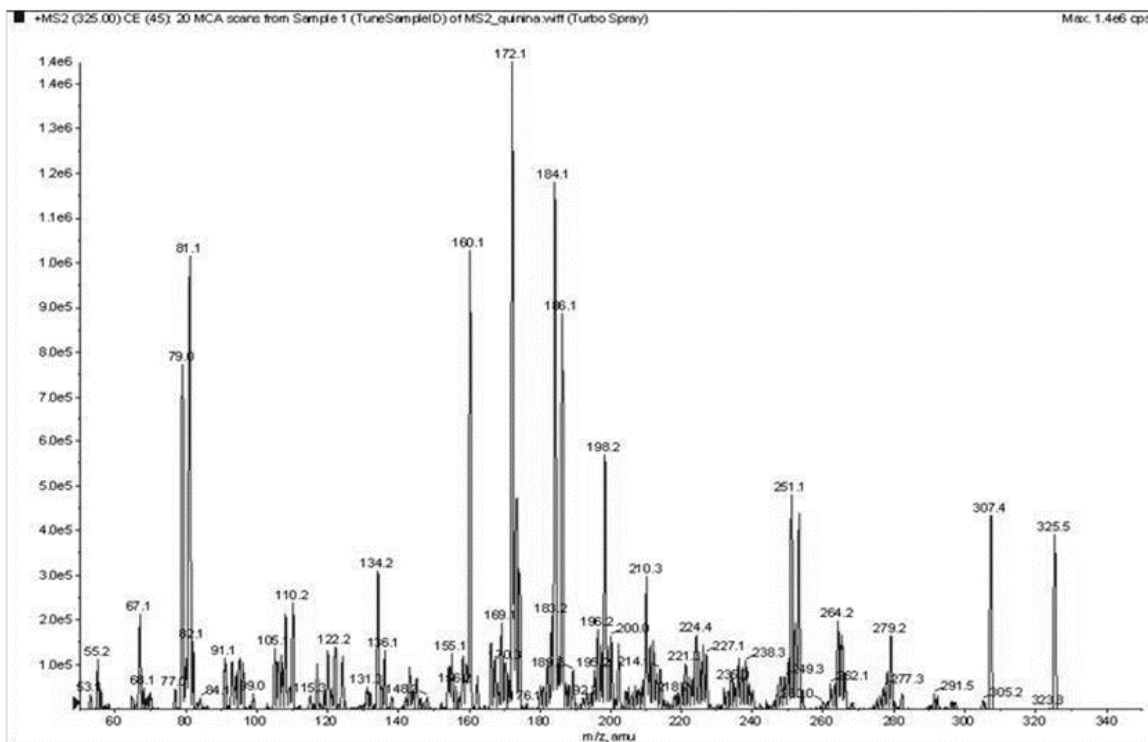
Análisis del espectro

La identificación de los tres fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 307,4; 188,1 y 172,1 y las ecuaciones de fragmentación respectivas se describen seguidamente.

El espectro de masas de la quinina obtenido a partir de los tallos de la *Cinchona Pubescens* similar a los espectros registrados en la bibliografía (Sec. A. 4. a, pág. 12).

Conclusión

Existe correspondencia entre el espectro de masas obtenido para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía para la quinina.



Espectro 1. Espectro de Masas de la Quina obtenida a partir de los tallos de la Quina (*C. pubescens*)

2. *Espectro de RMN¹H (Espectro 2)*

Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker DRX 400 MHz
- ii Laboratorio: de Productos Naturales (Universidad Paraná Curitiba-Brasil).
- iii Operador: M.Sc. Alexandre Augusto de Oliveira
- iv Fecha: 16 de octubre del 2007
- v Solvente: CDCl₃
- vi Muestra: Alcaloide obtenido de las fracciones N° 17-26, (ver pág. 73).

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-6ax); 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').

Análisis del espectro (Desplazamientos químicos)

La correspondencia entre los valores de desplazamientos químicos y cada uno de los protones pertenecientes a la estructura de la quinina se indican en:

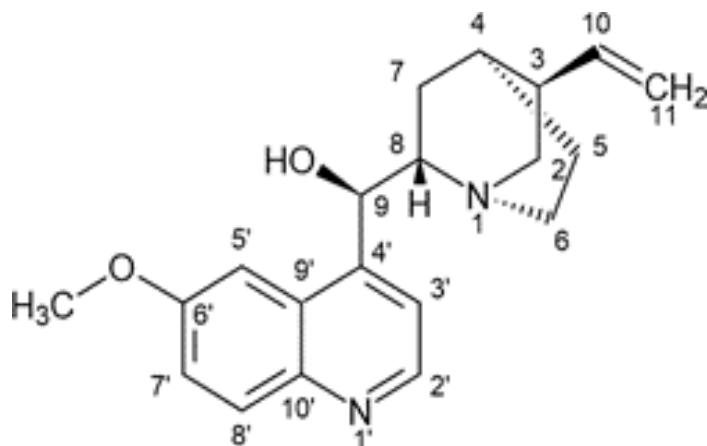


Figura 24. Asignaciones de los átomos de hidrogeno en la quinina.

Tabla 8. Datos del espectro RMN¹H de la quinina (400 MHz) en CDCl₃

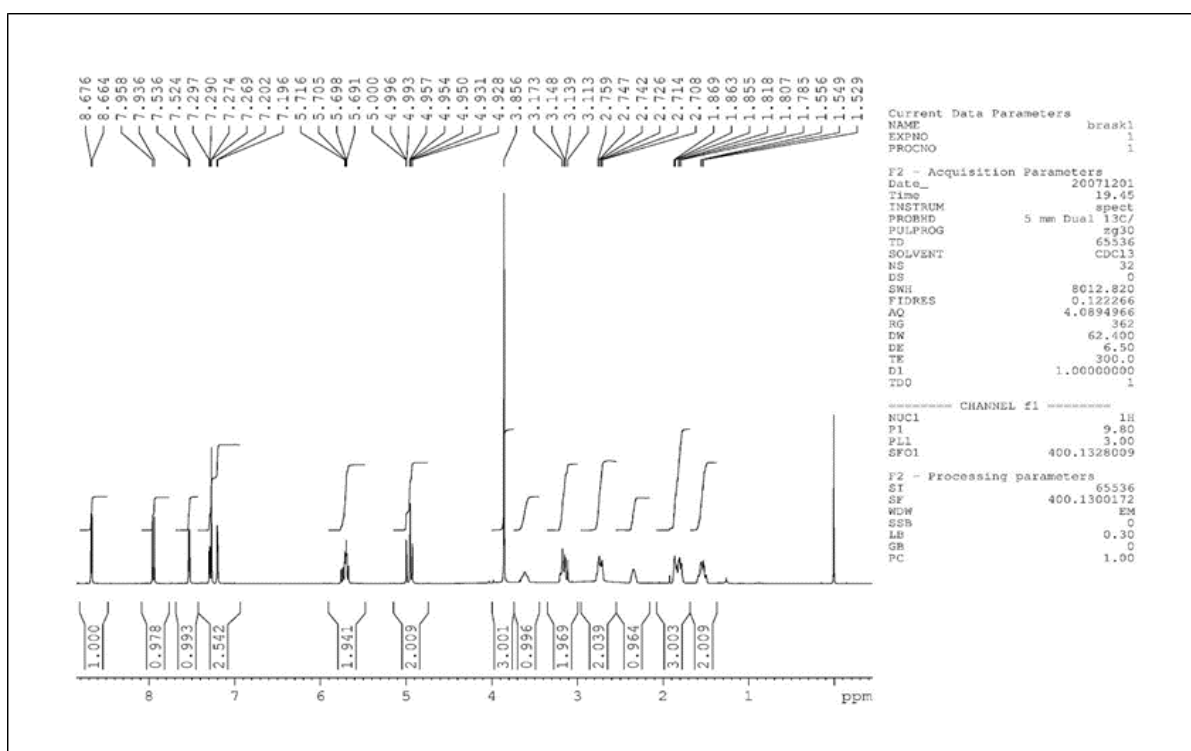
δ (ppm)	Nº de átomo de hidrogeno	Tipo de Señal	Integración
1,52	H-7eq	m	1 H
1,54	H-6eq	m	1 H
1,71	H-6ax	m	1 H
1,84	H-4	m	1 H
1,86	H-7ax	m	1 H
2,7	H-3	s	1 H
2,73	H-2eq	m	1 H
2,75	H-5eq	m	1 H
3,12	H-2ax	m	1 H
3,15	H-8	m	1 H
3,17	H-5ax	t	1 H
3,85	O-CH ₃	s	1 H
4,95	H-11gem	d	1 H
4,97	H-11gem	d	1 H
5,69	H-9	d	1 H

5,7	H-10	m	1 H
7,19	H-5'	s	1 H
7,28	H-7'	d	1 H
7,52	H-3'	d	1 H
7,94	H-8'	d	1 H
8,66	H-2'	d	1 H

* m: multiplete, s: singlete, d: doblete, t: triplete.

Conclusión

Los espectros RMN¹H obtenidos corresponden a lo esperado para la estructura de la quinina. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía (ver Tabla 1, Pág. 21).



Espectro 2. RMN¹H de la Quinina obtenida a partir de los tallos de Quina (*C. pubescens*)

3. **Espectro de RMN¹³C (Espectro 3a y 3b)**

Condiciones de trabajo

- i Equipo: Varian DPX-300 (300 MHz)
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de UFMGP (Brasil).
- iii Operador y fecha: Sr. José Días de Sousa Filho
- iv Fecha: 01 de diciembre del 2007

- v Solvente: CDCl_3
- vi Muestra: Alcaloide obtenido de las fracciones N° 17-26, pág.73

Características del espectro DEPT-135 (Espectro 3a)

Este espectro nos muestra los carbonos primarios y terciarios en la parte superior, y los carbonos secundarios en la parte inferior.

- i Señales de la parte superior:

δ (ppm): 55,8; 27,7; 39,5; 59,9; 71,1; 101,1; 119,4; 121,6; 131,6; 141,1; 147,5.

- ii Señales de la parte inferior:

δ (ppm): 2,13; 27,1; 43,3; 56,6; 114,8.

Características del espectro de Desacoplamiento de protón de banda ancha (Espectro 3b)

En este tipo de espectro aparecen todos los átomos de carbono de la molécula:

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

La asignación de los valores de desplazamiento químico son análogos a lo publicado precedentemente (Verpoorte, 1989).

Análisis del espectro DEPT-135 y Desacoplamiento de protón de banda ancha

- i Carbonos primarios (CH_3)

En el espectro 3a (DEPT-135) las 11 señales de la parte superior corresponden a los carbonos primarios (CH_3) y terciarios (CH); la señal del único carbón primario presente en quinina:

δ (ppm): 55,8 (OCH_3).

ii Carbonos secundarios (CH₂)

Las cinco señales de la parte inferior del espectro DETP-135 corresponden a los carbonos secundarios presentes:

δ (ppm): 2,13 (C7); 27,1 (C6); 43,3 (C5'); 56,6 (C2); 114,8 (C11).

iii Carbonos terciarios (CH)

Las diez señales presentes en el espectro DEPT-135 corresponden a carbonos terciarios presentes en la quinina:

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').

La correspondencia entre los valores de desplazamiento químicos y cada uno de los átomos de carbono pertenecientes a la estructura de la quinina ase indican en la estructura de la molécula (Figura 25) y la Tabla 9.

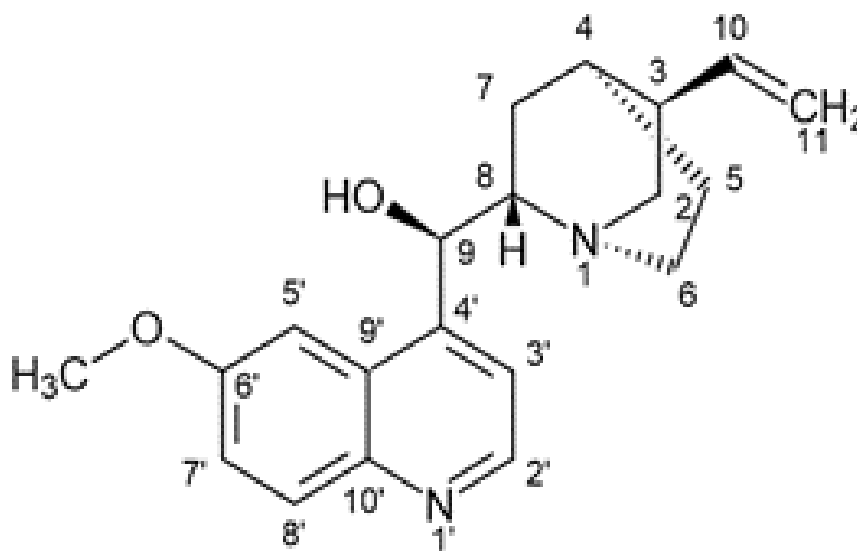


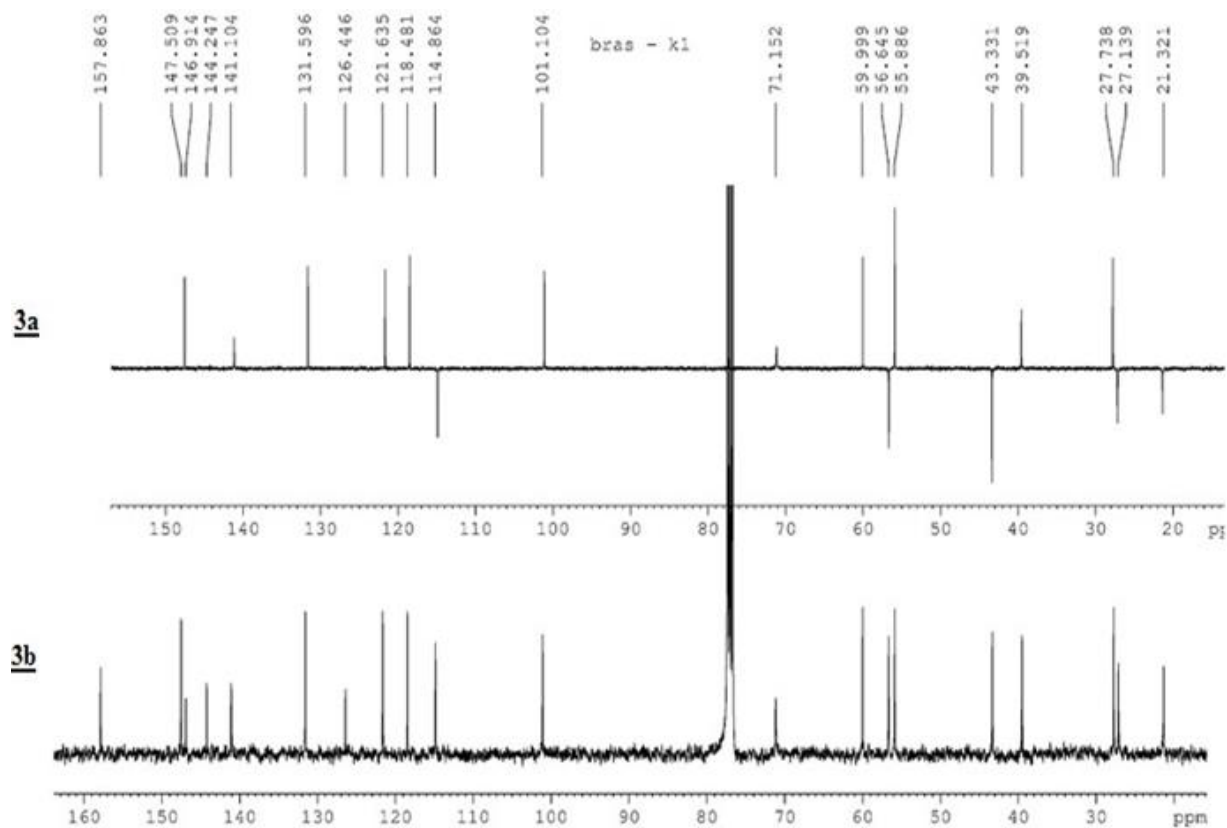
Figura 25. Asignación de los átomos carbono en quinina.

Tabla 9. Desplazamientos químicos δ (ppm), de átomos de carbono de la Quinina en CDCl_3 .

δ (ppm)	Nº átomo del carbono	Tipo de carbono
27,7	C-4	CH (terciario)
39,5	C-3	CH (terciario)
43,3	C-6	N-CH ₂ (primario)
55,8		-OCH ₃
56,6	C-2	N-CH ₂ (primario)
59,9	C-8	N-CH (secundario)
71,1	C-9	OH-CH (secundario)
101,1	C-5'	CH-aromático
114,8	C-11	= CH (primario)
118,4	C-7'	CH-aromático
121,6	C-3'	CH-aromático
126,4	C-9'	C-aromático
131,5	C-8'	CH-aromático
141,1	C-10	= CH (secundario)
144,2	C-10'	C-aromático
146,9	C-2'	N=CH(primario)
147,5	C-4'	C-aromático
157,8	C-6'	C-aromático

Conclusión

Los espectros DEPT-135 y de Desacoplamiento de protón de banda ancha presentados corresponden a lo esperado para la estructura de la quinina. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía (ver tabla 3, pág. 25).



Espectro 3. RMN¹³C - DEPT 135 de la Quina obtenida a partir de los tallos de la Quina

4. **Espectro 2D 1H- 1H COSY (Espectro 4)**

Condiciones de trabajo

- i Equipo: Bruker DRX-400 (400 MHz)
- ii Laboratorio: Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de UFMGP (Brasil).
- iii Operador Sr. Jose Dias Se Sousa Filho
- iv Fecha: 01 de diciembre del 2007
- v Solvente: CDCl₃
- vi Muestra: Alcaloide obtenido de las fracciones N° 17-26, (ver pág. 73)

Características del espectro

La cantidad de marcas simétricas, a lo largo de un lado de la diagonal del espectro, indica el número de acoplamientos. Luego, existen en total doce acoplamientos entre los diferentes protones de la molécula (ver Espectro N° 4).

Análisis del espectro

La primera ampliación de un segmento del espectro (0 – 3,5 ppm) muestra, con la ayuda de las líneas, los acoplamientos existentes entre los protones ecuatorial y axial (Figura 26):

- i H-7eq (1,52) se acopla con H-6ax (1,71); H-4(1,84) y H-7ax (1,86), líneas rojas.
- ii H-6eq (1,54) se acopla con H-5eq (2,75); H-8 (3,15) y H-5ax (3,17), líneas verdes.
- iii H-6ax (1,71) se acopla con H-5eq (2,75) y H-5ax (3,17), líneas celestes.
- iv H-4 (1,84) se acopla con H-3 (2,70), líneas moradas.
- v H-7ax (1,8) se acopla con H-8 (3,15), líneas azules.

La ampliación de un segundo segmento (2,5 – 9,0 ppm) muestra los acoplamientos entre todos los protones correspondientes a la quinolina, los cuales se indican a continuación (Figura 27):

- i H-2eq (2,73) se acopla con H-11gem (4,95-4,97), líneas negras.
- ii H-8 (3,15) se acopla con H-9 (5,69), líneas azules.
- iii H-11gem (4,95 - 4,97) se acopla con H-10 (5,70), líneas verdes.
- iv OCH₃ (3, 5) se acopla con H-5' (7,19), líneas rojas.
- v H-9 (5,69) se acopla con H-3' (7,52), líneas celestes.
- vi H-7' (7,28) se acopla con H-8' (7,94), líneas moradas.
- vii H-3' (7,52) se acopla con H-2' (8,66), líneas amarillas.

Podemos resumir todos los resultados en la Tabla 10.

Tabla 10. Correlación COSY y constantes de acoplamientos ¹H-¹H y constantes de acoplamiento ¹H-¹H de la Quinina.

Nºde átomo de hidrogeno	δ (ppm)	Correlaciones ¹ H- ¹ H y constantes de acoplamiento (Hz)
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) y H-5ax (3,17),
H-6ax	1,71	H-5eq (2,75) y H-5ax (3,17)
H-4	1,84	H-3 (2,70),

Nºde átomo de hidrogeno	δ (ppm)	Correlaciones ^1H - ^1H y constantes de acoplamiento (Hz)
H-7 ax	1,86	H-8(3,15),
H-2 eq	2,73	H-11gem (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),
H-3'	7,52	H- 2' (8,66)

Conclusión

Existe correspondencia entre el espectro ^1H - ^1H COSY obtenido para nuestro compuesto y aquel publicado en la bibliografía.

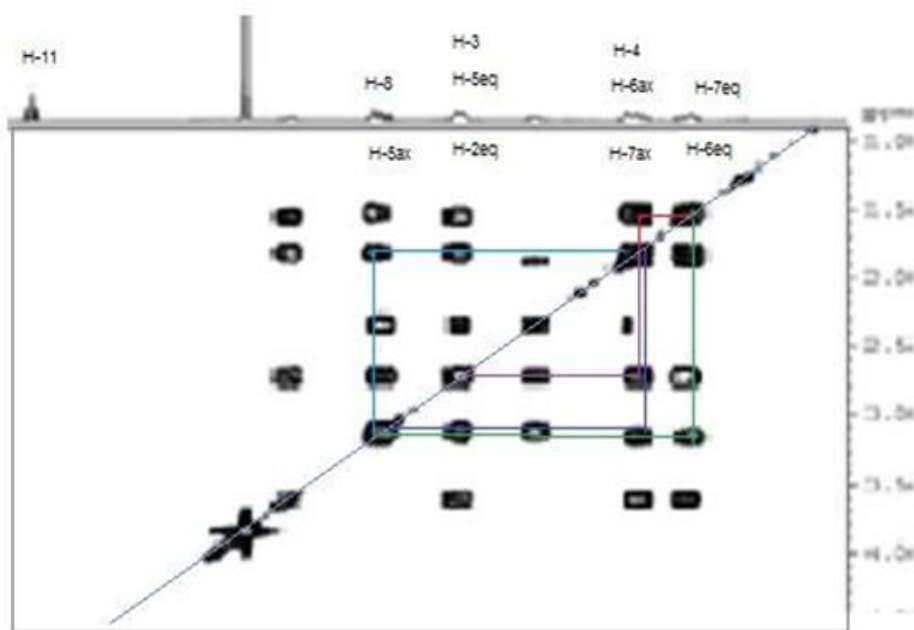


Figura 26. Ubicación de protones de la quinina en espectro rango de 0 a 9,0 ppm.

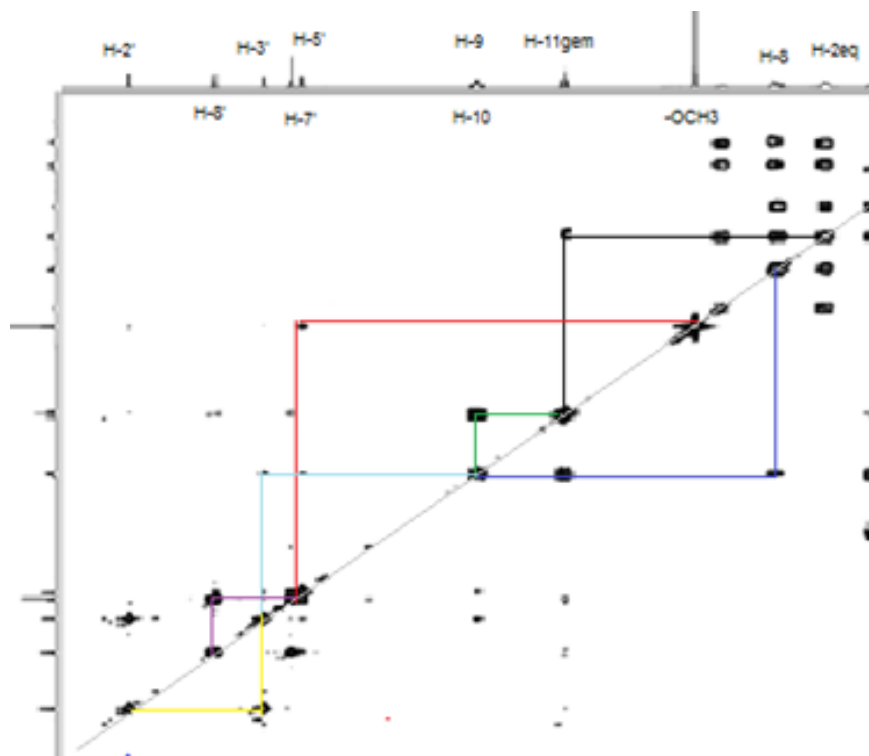


Figura 27. Ubicación de protones de la quinina en espectro rango de 0 a 9,0 ppm.

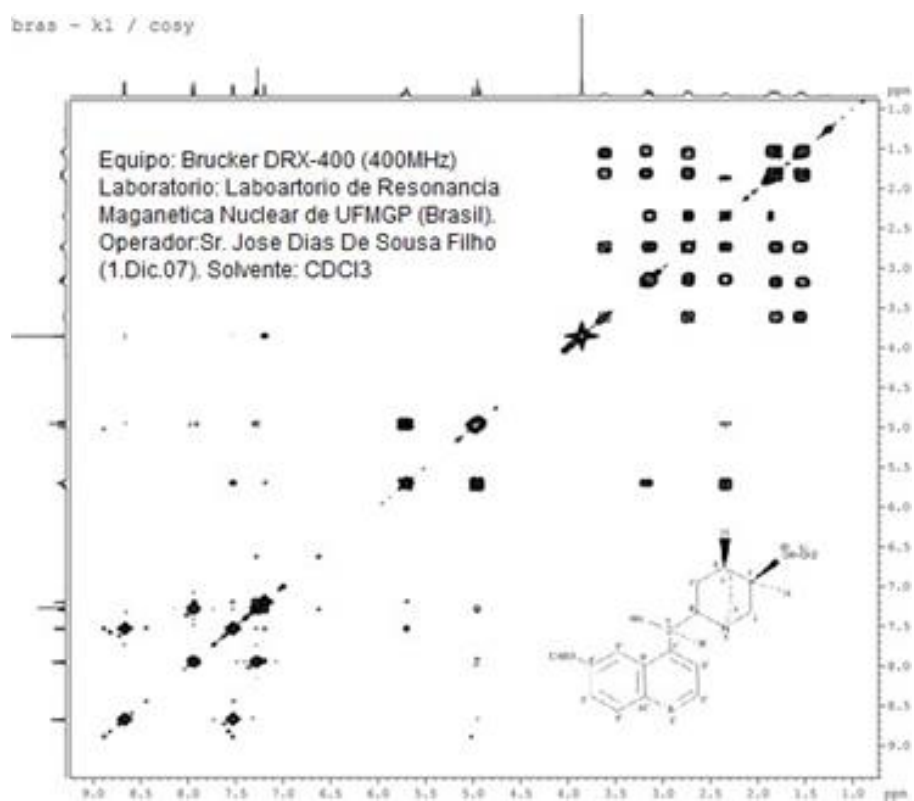


Figura 28. Espectro 4. Espectro 2D ^1H - ^1H COSY (400MHz) de la quinina

Capítulo IV. Analisis y Discusion de Resultados

1. A partir de 150 g de los tallos, seca y molida (malla 500 μm), de la "Quina" (*Cinchona pubescens*) se obtuvo mediante extracción por solventes y partición líquido- líquido el Extracto Bruto de Alcaloides, el cual se purificó mediante cromatografía en columna, seguido de cromatografía en placa delgada centrifugada, obteniéndose así 14mg de quinina, como cristales incoloros.

La caracterización de dicha sustancia se realizó mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C y ¹H-¹H COSY correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía para la quinina.
2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) encontramos la presencia de alcaloides, aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, taninos, triterpenos y esteroides, quinonas, antraquinonas, antronas o antranoles, catequinas, flavonoides y saponinas.
3. El análisis cuantitativo del total de alcaloides contenidos en los tallos de la quina (*C. pubescens*), mediante el procedimiento de titulación potenciométrica proporciona 0,66%.
4. Se realizó el análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos de los tallos de la quina (*C. pubescens*) y de la quinina.

Conclusiones

1. A partir de los tallos de la quina (*C. pubescens*) se aisló la quinina, el cual ha sido identificado mediante sus espectros de masas, RMN¹H, RMN¹³C, IR y ¹H- ¹H COSY, y la comparación de éstos con lo publicado en la bibliografía.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios o “Marcha Fitoquímica” presentes en los tallos de la Quina (*C. pubescens*), de acuerdo a Rondina & Coussio – 1969⁴⁷ y de Miranda (2002³¹) 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)⁶⁵.
3. Se realizó el análisis cuantitativo del total de alcaloides contenidos en los tallos de la Quina (*C. pubescens*), según el procedimiento de la United States Pharmacopoeia – USP, 20th Ed., - 1980⁶⁰, habiendo obtenido 0,66 %.

Recomendaciones

1. El proceso de molienda de los tallos de la Quina se realizó en un molino de cocina “Moulinex” (750 W), este proceso es lento debido a la poca capacidad del equipo, por lo que se requiere disponer de molinos de mayor capacidad.
2. El proceso de la determinación cuantitativa de la quinina en los tallos de *C. pubescens*, se pueden optimizar con métodos de alta sensibilidad, como la Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC).

Referencias bibliográficas

- Alonso, J., Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos, Ed. Corpus, 1° Ed, 2004, Argentina, pág. 897-901.
- Arana, G. V., Ruiz-Mesía, L., Ruiz-Mesía, W., & Atilés, M. R. (2011). Estudio químico de la corteza de Remijia peruviana "Cascarilla". Ciencia Amazónica:(Iquitos), 1(1), 41-50.
- Baldera, P., Estudio Químico del Cactus San Pedro macho (Echinopsis peruviana), Tesis de Licenciatura en Ciencias Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2014, 139 páginas.
- Bolaji, O. O., Babalola, C. P., & Dixon, P. A. F. (1991). Characterization of the principal metabolite of quinine in human urine by ¹H-nmr spectroscopy. Xenobiotica, 21(4), 447-450.
- Cabanillas, B., Estudio Químico de las hojas de la "Misha Rastrera" (*Datura candida*) Tesis de Licenciatura en Ciencias en Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2008, 152 págs.
- Casabianca, L. B., & De Dios, A. C. (2004). ¹³C NMR study of the self- association of chloroquine, amodiaquine, and quinine. The Journal of Physical Chemistry A, 108(40), 8505-8513.
- Chasar, D. W., & Toth, G. B. (1974). Tlc separation of drug alkaloids. Journal of chemical education, 51(1), 22.
- Cóndor, E., Estudio Químico de las semillas del "Toe" (*Brugmansia sanguinea* (R.& P.) D. Don) Tesis de Licenciatura en Ciencias-mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2000, 115 págs.
- Da Fonseca, A. M., dos Santos, J. C. S., de Souza, M. C. M., de Oliveira, M. M., Colares, R. P., de Lemos, T. L. G., & Braz-Filho, R. (2020). The use of new hydrogel microcapsules in coconut juice as biocatalyst system for the reaction of quinine. Industrial Crops and Products, 145, 111890.

- Damien, R., Daval, S., Souweine, B., Deteix, P., Eschalier, A., & Coudoré, F. (2006). Rapid gas chromatography/mass spectrometry quinine determination in plasma after automated solid-phase extraction. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 20(17), 2528-2532.
- De Ugaz, O. L. (1994). *Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales*. Segunda Edición. Univ Católica Peru. Pp. 3-7.
- Flores, J., *Estudio Químico del Cactus San Pedro (Echinopsis pachanoi Britton y Rose)*, Tesis de Licenciatura en Ciencias Mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2000, 103 páginas.
- Frosch, T., Schmitt, M., & Popp, J. (2007). In situ UV resonance Raman micro-spectroscopic localization of the antimalarial quinine in cinchona bark. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(16), 4171-4177.
- Fujiwara, H., Kato, A., & Okabayashi, I. (1987). Effects of stereoisomerisms on the electron ionization mass spectra and the IKE spectra of cinchona alkaloids. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 35(4), 202-209.
- Furner, R. L., Brown, G. B., & Scott, J. W. (1981). A method for differentiation and analysis of quinine and quinidine by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 5(6), 275-278.
- Grethe, G., Lee, H. L., & Uskoković, M. R. (1976). Cinchona Alkaloids. Total Synthesis of Cinchonamine. Preliminary Communication. *Helvetica chimica acta*, 59(6), 2268-2272.
- Gros, E., Burton, G., Pomilio, A. B., & Seldes, A., *Introducción al Estudio de los Productos Naturales*, secretaria general de la Organización de los Estados Americanos Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Vol. 30, Argentina, Buenos Aires, 1985, págs. 3, 25-36, 113.
- Hoet, P. Gomez, a. Kanamori, C. et al., *Estudio Cuantitativo de los alcaloides en Cinchona (Rubiaceae) del Perú*. *Boletín Soc. Quim. (Perú)*; 46, 298-309 (1980).

- Hoet, P. y Ríos Chu, M., Bol. Soc. Quím. del Perú, 46, 113 - 121 (1980). "Estudio cuantitativo de los alcaloides totales en *Datura stramonium* del Perú. Metodología.
- Hostettmann, K., Hostettmann-Kaldas, M., & Sticher, O. (1980). Rapid preparative separation of natural products by centrifugal thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 202(1), 154-156.
- Igarashi, J., Katsukawa, M., Wang, Y. G., Acharya, H. P., & Kobayashi, Y. (2004). Stereocontrolled synthesis of quinine and quinidine. *Tetrahedron letters*, 45(19), 3783-3786.
- Kacprzak, K. M. (2013). Chemistry and biology of Cinchona alkaloids. *Natural Products*, 605-641.
- Keene, A. T., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (1983). Investigation of Cinchona leaf alkaloids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 260, 123-128.
- Kudláček, K., Nesměrác, K., Štícha, M., Kozlík, P., & Babica, J. (2017). Historical injection solutions of quinine analyzed by HPLC/MS. *Monatshefte Für Chemie-Chemical Monthly*, 148(9), 1613-1618.
- Kurt Hostettmann, Maryse Hostettmann-Kaldas and Otto Sticher, *J. of Chromatography*, 202, 154-156 (1980). "Rapid Preparative Separation of Natural Products by Centrifugal Thin-Layer Chromatography".
- Lin, L., Wei, Z., Lin, Y., & Chen, Z. (2016). Measuring JHH values with a selective constant-time 2D NMR protocol. *Journal of Magnetic Resonance*, 272, 20-24.
- McCalley, D. V. (2002). Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 967(1), 1-19.
- Meléndez-Gómez, C., & Kouznetsov, V. (2005). alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. *Universitas Scientiarum*, 10(2), 5-18.
- Mesa-Vanegas, A. M., Quinto-Quinto, A., & BLAIR-TRUJILLO, S. (2013). Cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona pubescens* y evaluación de la actividad

- antiplasmodial y citotóxica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12(6), 592-602.
- Mills III, T., Conrad, J., Matchett, C., Simon, M., Burns, M., Ollis, R., Instrumental Data for Drug Analysis, 3rd Ed., Taylor & Francis, US, Vol. 4, 2006, Pp. 2744-2745.
- Miranda, M., Farmacognosia y Productos Naturales, Universidad de La Habana, Cuba, 2002, Pp. 41 – 49.
- Moreland, C. G., Philip, A., & Carroll, F. I. (1974). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of cinchona alkaloids. The Journal of Organic Chemistry, 39(16),2413-2416.
- Morrison R., Química Organica, Fondo Educativo Interamericano, S.A., U.S.A., 1976, pág. 418-441.
- Mulder-Krieger, T., Verpoorte, R., De Water, A., Van Gessel, M., Van Oeveren, B. C. J. A., & Svendsen, A. B. (1982). Identification of the alkaloids and anthraquinones in *Cinchona ledgeriana* callus cultures. Planta médica, 46(09), 19-24.
- Noriega, P., Sola, M., Barukcic, A., Garcia, K., & Osorio, E. (2015). Cosmetic antioxidant potential of extracts from species of the *Cinchona pubescens* (Vahl). International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients, 2(1), 14-14.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., & Kriz, G. S. (1996). Introduction to Spectroscopy, Saunders Golden Sunburst Series. New York. Pp. 404-443.
- Pelt, J., Cl. Vigneron, Ch. Younos, Bull. Soc. Pharm. Nancy, 72, 12-23 (1967). Pérez García, W. (2017). Evaluación etnobotánica medicinal de la comunidad de Buenos Aires, Jaén, Cajamarca-Perú, págs. 72-73.
- Raffauf, R. F., Le Quesne, P. W., & Ghosh, P. C. (1978). Antitumor Plants. V. Constituents of *Cinchona pubescens*. Lloydia, 41(5), 432-434.
- Reyna V., Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata), Curso de Química de Productos Naturales-CQ046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1999-b, 5 págs.

- Reyna V., Libro de Resúmenes del Primer Curso Nacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia – Fito 2001, Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, 06 – 12 Agosto del 2001, Pág. 26.
- Reyna, V., Apuntes del curso de Química Orgánica IV - CQ 442 (Espectrometría de Masas, de RMN, IR, UV en separatas), Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Lima, 2011.
- Reyna, V., Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata), Curso de Química de Productos Naturales – CQ046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Lima, 2012, 5 págs.
- Reyna, V., Capítulo 2 ALCALOIDES, Práctica de Laboratorio (Separata), Curso de Química de Productos Naturales – CQ046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Lima, 2013, Pp. 1-5.
- Rojahn, C. A. (1946). Productos químicos y farmacéuticos: a base de la obra Preparación de productos químicos y químico-farmacéuticos. Atlante. Tomo III, págs. 2048-2050.
- Rondina R. y Coussio, J., Revista de Investigación Agropecuaria, INTA (Buenos Aires, Argentina), Serie 2, Vol. VI, N°22, 351-366 (1969). “Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales Argentinas”.
- Ruiz-Mesia, L., Ruiz-Mesía, W., Reina, M., Martínez-Díaz, R., de Inés, C., Guadaño, A., & González-Coloma, A. (2005). Bioactive cinchona alkaloids from *Remijiperuviana*. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1921-1926.
- Seeman, J. I. (2007). The Woodward–Doering/Rabe–Kindler total synthesis of quinine: Setting the record straight. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(9), 1378-1413.
- Segundo Gibaja Oviedo, Guía para el análisis de los compuestos del Carbono, Universidad Nacional de San Marcos, Perú-Lima, 1977, pág. 49,51,123,126.

- Silva, I. D. D., & Aragão, C. F. S. (2009). Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona Vahl* por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 776-780.
- Silverstein, R., G. Bassler and T. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Willey and Sons, New York, 6^o Ed., 1998, pág. 250-274.
- Staba, E. J., & Chung, A. C. (1981). Quinine and quinidine production by cinchona leaf, root and unorganized cultures. *Phytochemistry*, 20(11), 2495-2498.
- Stahl, E., & Müller, J. (1982). Parameters of preparative centrifugal thin-layer chromatography. *Chromatographia*, 15(8), 493-497.
- Stein, S. E., *Mass Spectra in NIST Chemistry WebBook*, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C54046&Units=SI&Mask=200#Mass> - Spec,(retrieved February 28, 2014).
- Stork, G., Niu, D., Fujimoto, A., Koft, E. R., Balkovec, J. M., Tata, J. R., & Dake, G. R. (2001). The first stereoselective total synthesis of quinine. *Journal of the American Chemical Society*, 123(14), 3239-3242.
- Suszko-Purzycka, A., & Trzebny, W. (1964). Thin-layer chromatography of cinchona alkaloids I. Separation and identification of vinyl-bases and their dihydro-derivatives. *Journal of Chromatography A*, 16, 239-242.
- Torpoco V, *Constituyentes Químicos (Alcaloides) de la "chacrana" (Psychotria viridis (Ruiz & Pavón))*. Tesis de Licenciatura en Ciencias-mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1993, 115 págs.
- Uccello- Barretta, G., Bari, L. D., & Salvadori, P. (1992). Autoaggregation phenomena in quinine solutions. *Magnetic resonance in chemistry*, 30(11), 1054-1063.
- United States Pharmacopoeia-USP, 20th Ed., (1980), pág. 913. Verpoorte, R, et al. *J. of Medicinal*, vol. 46, pág.19-24 (1982). "Identification of Alkaloids and Anthraquinones in *Cinchona Ledgeriana Callus Cultures*".

- Verpoorte, R. et al. J. of Medicinal, vol. 46, pág.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*"
- Verpoorte, R., Schripsema, J., & van der Leer, T. (1989). Cinchona alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Vol. 34, pp. 331-398). Academic Press.
- Villacrés O. V., *Bioactividad de Plantas Amazónicas*, Ed. Abya-Yala, Ecuador, 1995, Pp. 154 – 171.
- Vitale, A. A., Acher, A., & Pomilio, A. B. (1995). Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 49(2), 81-89.
- Zidan, M. D., Arfan, A., & Allahham, A. (2017). Nonlinear optical investigations of Quinine and Quinotoxine salts by Z-scan technique. *Optics & Laser Technology*, 89, 137-

Anexos

Anexo 1. Marcha Fitoquímica Preliminar (Reyna, 1999-B).....	1
Anexo 2. Tamizaje Fitoquímico.....	7
Anexo 3. Marcha Fitoquímica Preliminar.....	16
Anexo 4. Análisis Cualitativo para la Detección de Alcaloides Presentes en Plantas (Reyna-1992)	18
Anexo 5. La “Quina” (<i>Cinchona Pubescens</i>)	21
Anexo 6. Resultados de la Marcha Fitoquímica Preliminar	23
Anexo 7. Resultados de Tamizaje Fitoquímico	25
Anexo 8. Resultados de la Marcha Fitoquímica Preliminar	27
Anexo 9. Determinación del Punto de Equivalencia de la Valoración Potenciométrica. ..	29
Anexo 10. Determinación Cuantitativa de Alcaloides Totales en los Tallos de La Quina (<i>C. Pubescens</i>).....	30
Anexo 11. Ensayos de Aislamiento y Purificación de Alcaloides.....	32
Anexo 12. Obtención de los Extractos Brutos de Alcaloides	35
Anexo 13. Análisis Preliminar por Cromatografía en Capa Fina (CCF) del Extracto Bruto de Alcaloides (Ver Sec. II. G.4.).....	39
Anexo 14. Panel Fotográfico.....	44
Anexo 15. Esquema de Purificación por CCV y CCDC del EBA-2	45

Anexo 1. Marcha fitoquímica preliminar (Reyna, 1999-B)

(De acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio–1969)

La Marcha Fitoquímica Preliminar propuesta por Rondina & Coussio (1969) se basa en el fraccionamiento de un extracto metanólico de la muestra vegetal estudiada en diferentes solventes y la identificación de los tipos de principios activos presentes en cada uno de ellos mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

1. Obtención de las fracciones

a. Fracción (a)

- i. Se toman 6,0 g de muestra seca y pulverizada y se mezclan en un balón de 100 mL con 50 mL de metanol. Se deja macerar durante 70 horas a temperatura ambiente.
- ii. La mezcla se calienta a reflujo durante 4 horas. Se filtra en caliente lavando el residuo con metanol hasta completar 50 mL. Esto constituye la fracción (a).

b. Fracción (b)

- i. Se separa 5 mL de la fracción (a) y el resto se lleva a sequedad en un rotavapor.
- ii. El residuo se extrae con 10 mL de ácido clorhídrico al 1% y se filtra utilizando papel de filtro lento. La operación se repite con 5 mL de ácido clorhídrico al 1%. Las soluciones ácidas se reúnen en un erlenmeyer de 50 mL y se guardan.
- iii. Los residuos insolubles en la solución ácida se disuelven en 5 mL de cloroformo con ayuda de calor y fuerte agitación. Esta solución se filtra a través de celita completando a través del filtro a 5 mL. Esto constituye la fracción (b).

c. Fracción (c)

- i. La solución ácida que se guardó en la etapa anterior se lleva a pH 9 y utilizando $\text{NH}_3(\text{ac})$ 15 N, y luego se extrae dos veces con 25 mL de cloroformo CHCl_3 en un embudo de separación de 125 mL.
- ii. La fase clorofórmica se lava con 10 mL de agua. El agua de lavado se reúne con la fase acuosa obtenida.

- iii. La fase clorofórmica se seca con sulfato de sodio y se filtra completando a 50 mL. Esto constituye la fracción (c).

d. Fracción (d)

- i. La fase acuosa obtenida anteriormente se semisatura con sulfato de sodio agregando 0,1 g de sal por mL de solución. Luego se extrae dos veces con 25 mL de una mezcla de cloroformo-etanol (3:2) en un embudo de separación de 125 mL.
- ii. Se lava la fase orgánica con 10 mL de solución semisaturada de sulfato de sodio reuniendo toda la fase acuosa.
- iii. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se filtra obteniéndose la fracción (d).

e. Fracción (e)

- i. La fase acuosa obtenida en la etapa anterior constituye la fracción (e).

f. Fracción (f)

- i. En un tubo de ensayo de 18 x 160 mm se calienta a 100°C y con agitación 1 g de muestra pulverizada en 10 mL de agua durante 15 minutos.
- ii. Se filtra en caliente utilizando papel de filtro rápido, se completa el filtrado a 10 mL, y se deja enfriar. Esta solución constituye la fracción (f).

2. Pruebas de identificación de principios activos.

a. Prueba de la ninhidrina sobre las fracciones (a) y (f) (Aminogrupos primarios y/o secundarios).

- i. Sobre papel de filtro lento de 5 cm de diámetro se agregan dos gotas de la fracción (a) y sobre otro papel, dos gotas de la fracción (f) con una pipeta Pasteur. Los papeles se dejan secar por 5 minutos.
- ii. Sobre cada uno de los papeles se agregan dos gotas de solución de ninhidrina al 0,2% en etanol.
- iii. Se preparan blancos de metanol–ninhidrina y agua–ninhidrina del mismo modo.

iv. Los papeles se colocan en una estufa a 110°C durante 30 minutos.

Observación. - La aparición de una mancha de color violeta indica la presencia de aminogrupos primarios y/o secundarios.

b. Reacción con cloruro férrico sobre la solución acuosa de la fracción (a) (Grupos fenólicos libres).

- i. El resto de la fracción (a) se lleva a sequedad en el rotavapor.
- ii. El residuo se disuelve en 0,5 mL de agua y se filtra dicha solución (“solución a”), a través de un embudo de 3,5 cm de diámetro utilizando papel de filtro lento, a un tubo de ensayo de 13x100 mm.
- iii. Se colocan dos gotas de “solución a” sobre una placa de toque blanca y se agrega una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1%.

Observación. - La observación da un color azul, verde, negro o marrón indica la presencia de grupos fenólicos libres.

c. Reacción con solución de gelatina sobre la solución acuosa de la fracción (a) (Taninos).

- i. Se colocan cuatro gotas de “solución a” (ver 2.b.ii) sobre una luna de reloj de 7,5 cm de diámetro apoyada en fondo negro, y se adicionan dos gotas de solución de gelatina al 0,5%.

Observación. - La formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos.

d. Reacción de Liebermann–Burchard sobre las fracciones (b), (c) y la “solución b” de la fracción (d) (Triterpenoides y esteroides).

Nota: El color y la intensidad varían de acuerdo a la estructura del compuesto, y hay algunos compuestos que no desarrollan color.

- i. Se separan 10 mL de la fracción (c) en un tubo de 18x160 mm. Se concentra hasta un volumen de 0,5 mL en el rotavapor y se traslada la solución a un tubo de 0,9 cm de diámetro.

- ii. En dos tubos de ensayo de 0,9 cm de diámetro se adicionan 8 gotas de la fracción (b).
- iii. Se agrega a cada tubo 8 gotas de anhídrido acético y se agita fuertemente durante 20 segundos.
- iv. Se deja resbalar por la pared de cada tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar y se observa.
- v. La fracción (d) se lleva a sequedad con un rotavapor y se redisuelve en 2,5 mL de etanol.

Se filtra la solución a través de un embudo de 3,5 cm de diámetro y papel filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. Esto constituye la "solución b".

- vi. Se coloca 0,8 mL de la "solución b" en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y se lleva a sequedad con la ayuda de un baño maría. El residuo se disuelve en 0,5 mL de cloroformo y se siguen los pasos iii y iv.

Observación. - La formación de una fase superior verde, azul o negra a partir de una interfase de color rojo o naranja indica reacción positiva para triterpenos y esteroides.

e. Reacción de Bornträger sobre la fracción (b) (Naftoquinonas y antraquinonas, antronas y antranoles).

- i. El resto de la fracción (b) se dispone en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm, se añade 5 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua y se agita.

Observación. - Una coloración roja en la fase acuosa indica la presencia de quinonas, antronas o antranoles.

f. Reacciones para alcaloides sobre la fracción (c) y la "solución b" (Ver sección 2.d.v)

- i. Se lleva a sequedad la fracción (c) y el residuo se disuelve en 2 mL de solución de ácido clorhídrico HCl al 1%. Se colocan 3 gotas de la solución ácida en cada

una de tres lunas de reloj de 7,5 mm de diámetro apoyadas sobre fondo negro.

A la primera se le agregan 2 gotas del reactivo de Dragendorff, a la segunda, 2 gotas del reactivo de Mayer, y a la tercera, 2 gotas del reactivo de Wagner.

- ii. En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se lleva a sequedad 0,8 mL de la “solución b” con la ayuda de rotavapor. El residuo se disuelve en 0,3 mL de solución de ácido clorhídrico HCl al 1%. Se filtra a través de papel de filtro lento y se reparte el filtrado en tres lunas de reloj de 7,5 cm de diámetro. Luego se adicionan los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner respectivamente.

Observación. - La observación de turbidez o precipitados anaranjado, crema y marrón en

las reacciones de Dragendorff, Mayer y Wagner respectivamente indican la presencia de alcaloides. La ausencia de precipitado o turbidez para alguno de los reactivos indica que la muestra no tiene alcaloides.

g. Reacción de Rosenheim sobre la “solución b” (Ver sección 2.d.v) y sobre la fracción (e) (Leucoantocianidinas y catequinas).

- i. En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se colocan tres gotas de la “solución b” y se agrega 2 mL de agua. En otro tubo igual se colocan 2 mL de la fracción (e).
- ii. A cada tubo se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, se agita y se calienta durante 10 minutos en baño maría.
- iii. Se deja enfriar las mezclas, se agrega en cada tubo 8 gotas de alcohol amílico y se agita.
- iv. Las mezclas se dejan en reposo y luego se observan las fases amílicas.

Observación. - Una coloración roja en la fase amílica indica la presencia de leucoantocianidinas, un color marrón indica la presencia de catequinas.

h. Reacción de Shinoda sobre la “solución b” (Ver 2.d.v) y sobre la fracción (e). (Flavonoides, excepto chalconas, dihidrochalconas, catequinas e isoflavonas).

- i. En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se colocan tres gotas de la “solución b” y se agrega 2 mL de agua. En otro tubo igual se colocan 2 mL de la fracción (e).
- ii. A cada tubo se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agita bien.
- iii. A cada tubo se agregan limaduras de magnesio y se agita. Luego se deja reposar los tubos por 5 minutos.
- iv. Se adicionan 8 gotas de alcohol amílico a cada tubo, se agita y se deja reposar nuevamente. Se observa el color de la fase amílica.

Observación. - Una coloración roja o rosada en la fase amílica indica la presencia de flavonoides (excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas).

i. Prueba de la espuma sobre la fracción (f) (saponinas)

- i. Se coloca 1 mL de la fracción (f) en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y se agita durante 15 segundos. Luego se deja en reposo durante 15 minutos. Se mide la altura de la espuma.

Observación. - La formación de espuma de una altura mayor a 5 mm y que permanezca por lo menos 15 minutos indica la presencia de saponinas.

Anexo 2. Tamizaje fitoquímico

(Migdalia Miranda, 2002)

En este caso se emplea un esquema que utiliza la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente.

Procedimiento:

La planta fresca, seca o residuo de una extracción; es sometida a tres extracciones sucesivas según el esquema de la Figura (a), a cada extracto I, II y III, se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto. Para ello se toma una alícuota de 5 mL y se trasvasa a una cápsula previamente tarada, se evapora sequedad en baño de agua y se pesa nuevamente. Se procede de igual forma que la técnica descrita para la determinación de sustancias solubles.

Posteriormente en cada extracto por separado se procede de acuerdo a los esquemas representados en las Figuras (b) y (c), en cada caso para realizar los ensayos se procede de la siguiente forma:

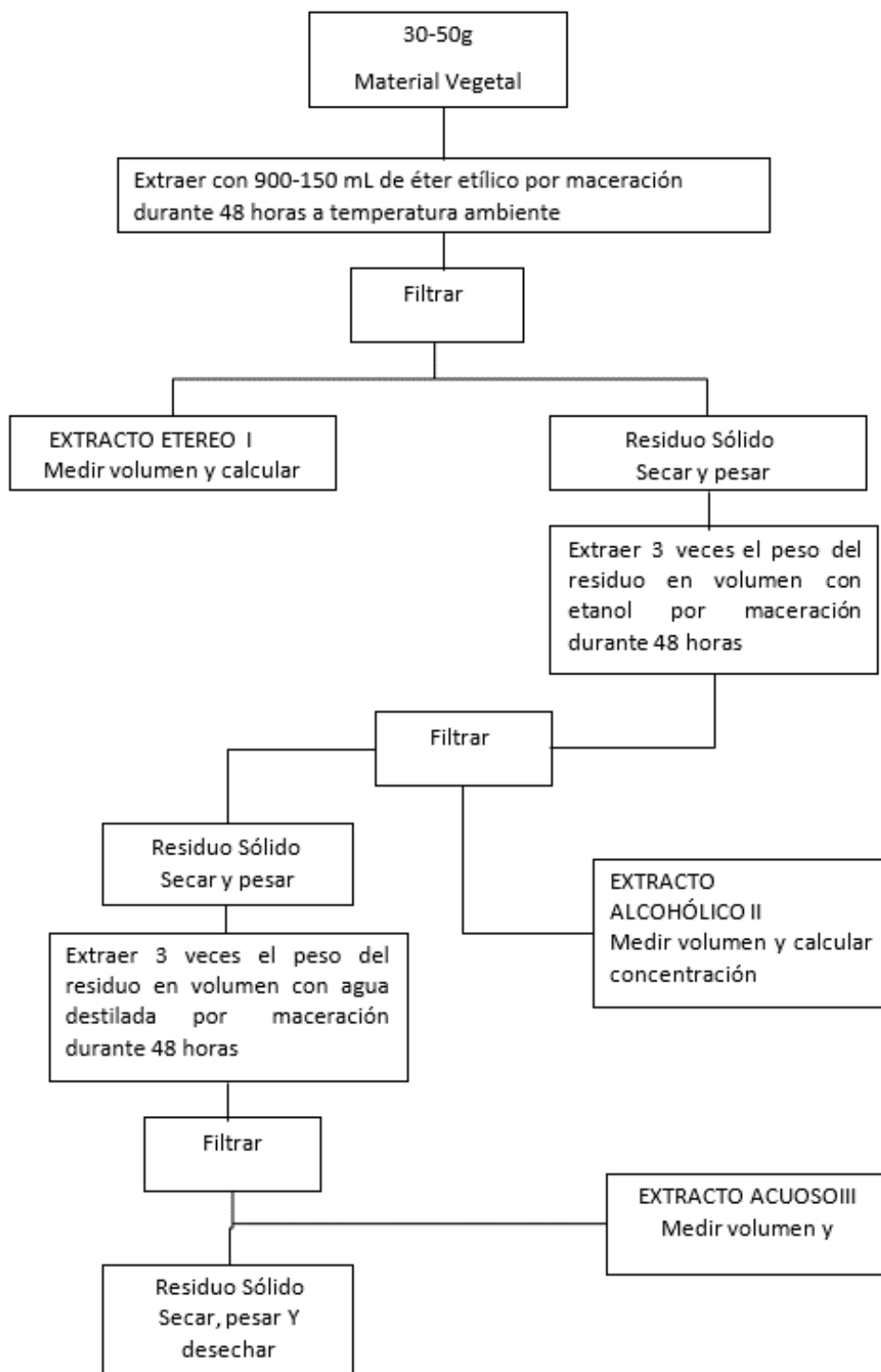


Figura (a). Extracción sucesiva del material vegetal para la aplicación de técnicas de Tamizaje Fitoquímico.

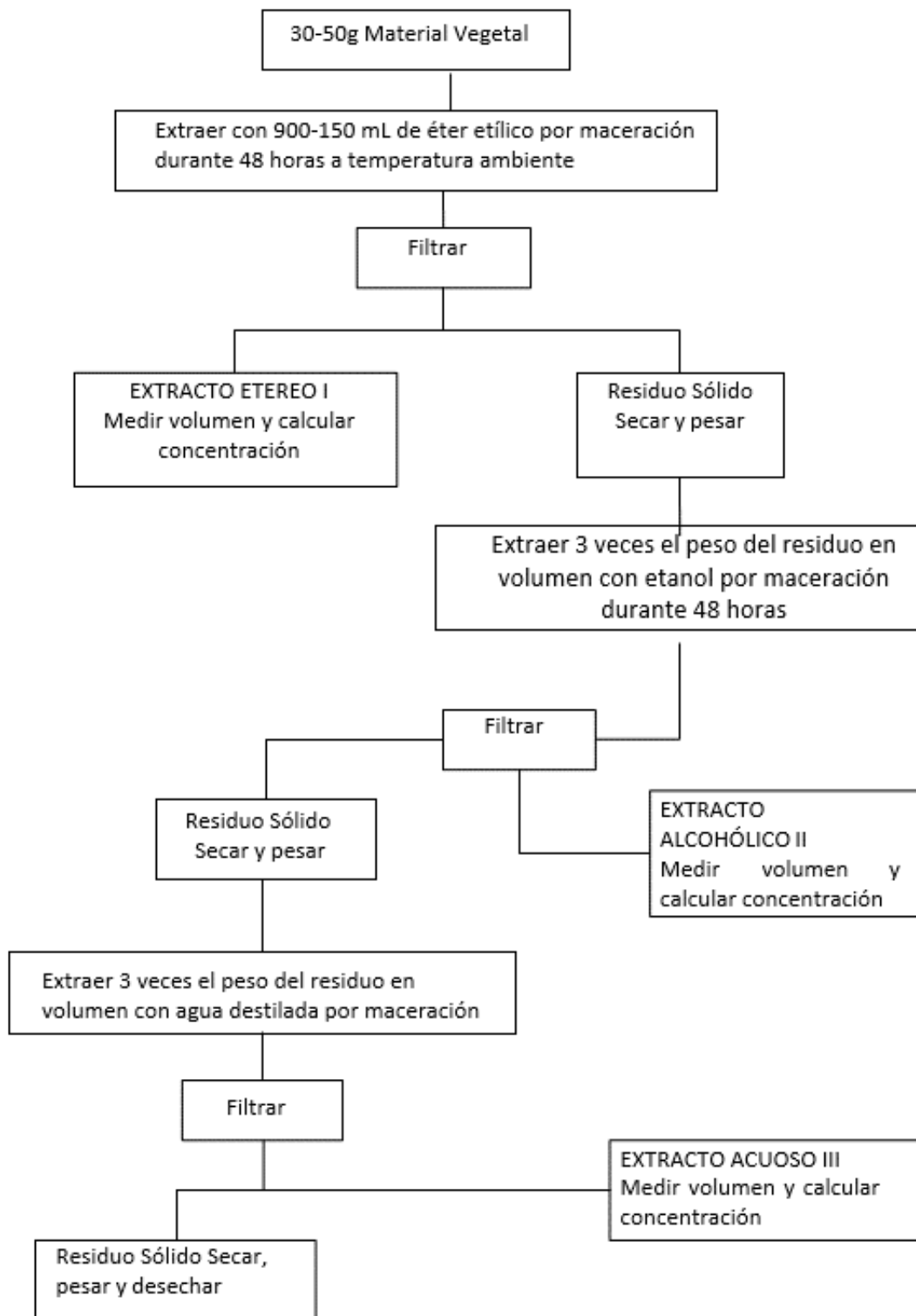


Figura (b). Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de Éter Etílico

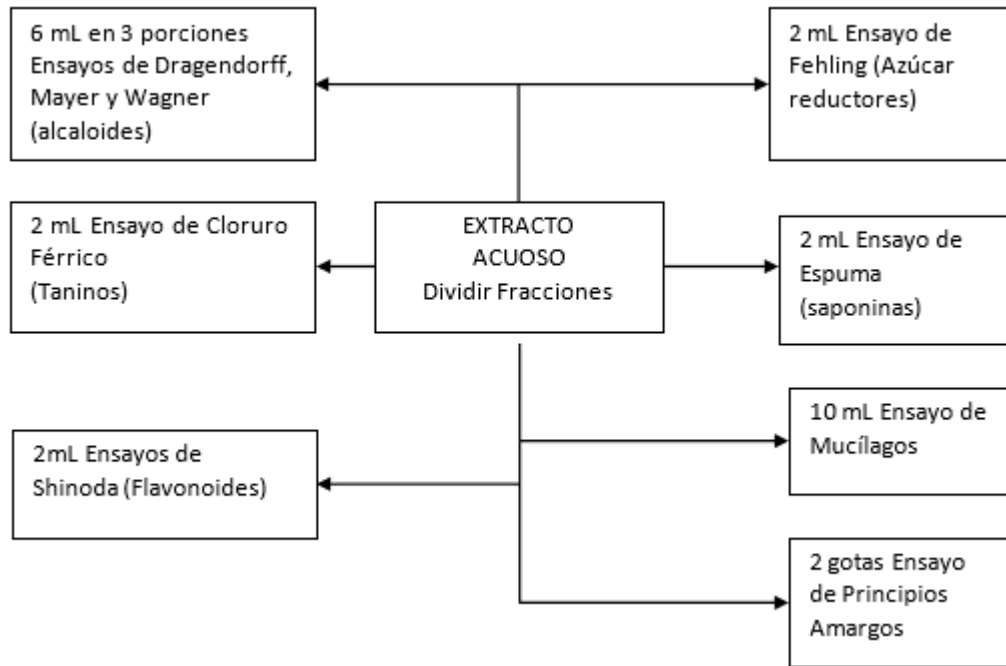


Figura (c). Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de Acuoso

Ensayo de Sudan: permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

Ensayo de Dragendorff: permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo se disuelve en un 1 mL de HCl al 1% en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de HCl concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

Ensayo de Mayer: de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añade 2 ó

3 gotas de reactivo de Mayer, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

Ensayo Wagner: se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

Ensayo fe Baljet: permite reconocer en un extracto la presencia Coumarinas aunque también da positivo en presencia de grupos lactónicos.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona el reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración(+) o precipitado rojo (+++).

Ensayo de Hidroxamato ferríco para coumarinas: una gota del extracto se coloca en una palca de porcelana y se añade una gota de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en etanol al 10 %, se añade unas gotas de hidróxido de potasio al 10% en etanol y se calienta a la llama hasta burbujeo, se añade unas gotas de ácido clorhídrico 0.5 mol/L, y una gota de cloruro férrico al 1% en agua. El desarrollo de una coloración violeta (+), claro (++) , intenso (+++).

El reactivo de Baljet se prepara de la siguiente forma:

Solución 1: hidróxido de sodio al 10 % en agua.

Solución 2: ácido pícrico al 1% en etanol.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de Borntrager: permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para la alícuota que no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua el residuo re disolverse en un 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta la separación. Si la fase acuosa

alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo es positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

Ensayo de Libermann-Burchard: permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenoides y/o esteroide.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse en baño de agua y re disolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- rosado-azul muy rápido.
- 2- verde intenso-visible, aunque rápido
- 3- verde oscuro-negro-final de la reacción.

Ensayos de Catequinas: para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita indica un ensayo positivo.

Ensayo de Resinas: para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.

Ensayo Fehling: permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo re disolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL de reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente manera:

Solución A: se pesan 35g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de la Espuma: permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que, si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma de la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

Ensayo de Cloruro Férrico: permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si la planta con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- 1- desarrollo de coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- 2- desarrollo de coloración verde intenso, taninos del tipo pirocatecólicos.
- 3- desarrollo de coloración azul, taninos del tipo pirogalo-tánicos.

Ensayo de la Ninhidrina: permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2% de

ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5- 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolló un color azul violáceo.

Ensayo de Shinoda: permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

Ensayo de Kedde: permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas. El reactivo de kedde se prepara de la siguiente manera:

1-solucion 1: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol.

2-solucion 2: hidroxido de potasio al 5,7% en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de Antocianidinas: permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calienta 2 mL del extracto etanólico 10 min. Con 1 mL de HCl conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.

Ensayo de Mucílagos: permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

Ensayo de principios amargos y astringentes: el ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.

Anexo 3. Marcha fitoquímica preliminar

(De acuerdo al procedimiento de Villacrez O., Victor-1995)

Alcaloides: para realizar las pruebas de alcaloides, es necesario realizar un blanco con un alcaloide puro o una planta en la que su presencia haya sido comprobada, para efectos de comparación.

Sobre una placa de toque colocar 10 gotas de extracto acuoso, preparado con ácido clorhídrico 1% añadir 2 gotas de reactivo de Drangerdorff, Mayer o Wagner. Observar la presencia de precipitados en caso positivo.

Saponinas: preparar extracto acuoso utilizando agua destilada, colocar 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, calentar en baño de agua hirviendo, dejar enfriar y luego agitar por 30 segundos. Observar la presencia de espuma persistente en caso positivo debe permanecer por lo menos 2 minutos.

Taninos: preparar un extracto etanólico, utilizando etanol de 95 %. Tratar dos alícuotas del filtrado con: solución de gelatina-sal al 1% y solución de hierro III cloruro al 1%. Observar el primer caso la formación de un precipitado blanco y en el segundo si hay coloración azul, verde, pardo o negro, en caso positivo.

Antroquinonas: reacción de Bornstrager. Hervir 0,3 g de planta pulverizada con 10 mL de hidróxido de potasio al 5% y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 6%. Se enfría la solución, se filtra o centrifuga; el filtrado acidular con ácido acético y se añade benceno para extraer, 5 mL de la solución bencénica se agita con hidróxido de sodio o hidróxido de amonio al 10 %, se observa la coloración roja de la capa acuosa.

Triterpenoides: Una porción de extracto etanólico evaporar a sequedad, tratarle luego con el reactivo de anhidro ascético-ácido sulfúrico-cloroformo (10:1:25) por 1-2 minutos, observar el apareamiento de colores rojo, rosa, púrpura o azul.

Flavonoides: reacción de Shinoda. Preparar un extracto metanólico con la muestra seca y pulverizada, al extracto añadir limaduras de magnesio, más ácido

clorhídrico concentrado. Observar el desarrollo de coloración luego de varios minutos, comparar con el extracto.

Tonos rojos: flavonas

Rojos a crimson: flavonoles

Crimson a magenta: flavononas

Algunos azules y verdes son positivos.

Glicósidos cardiotónicos: Reacciona de Tollens. Extracto etanólico más 5-8 gotas de piridina más 4-6 gotas de Tollens fresco, espejo de plata.

Cumarinas: 0,5 g de muestra seca pulverizada, añadir 5 mL de agua destilada, se cubre con un papel filtro humedecido en solución de hidróxido de sodio al 10 %. Se coloca en baño de agua hirviente varios minutos, el papel se expone a luz ultravioleta. La aparición de fluorescencia azul o amarillo verdosa nos indica reacción positiva.

Anexo 4. Análisis cualitativo para la detección de alcaloides presentes en plantas (Reyna-1992)

Para la detección de alcaloides presentes en plantas se utilizan muchos reactivos de precipitación y de coloración, algunos de los cuales se consideran de aplicación general mientras que otros son de uso más selectivo. Entre los reactivos generales de precipitación podemos citar el “reactivo de Mayer” (mercurio-yoduro de potasio) y el “reactivo de Dragendorff” (yoduro de bismuto y potasio).

Todos estos reactivos actúan sobre los alcaloides en soluciones de ácido clorhídrico o sulfúrico diluidos. Debe usarse unas gotas del reactivo, pues un exceso puede disolver el precipitado.

A continuación, se describen los procedimientos y la preparación de los reactivos para los Test de Mayer y Dragendorff.

A. Test de Mayer

Este reactivo da con casi todas las soluciones de alcaloides, precipitados de color blanco, blanco amarillento, o amarillo limón claro. Los precipitados son cristalizables. Es un reactivo muy sensible.

1. Procedimiento

- i. Se colocan 0,5 g de hojas desmenuzadas o pulverizadas en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. (para pruebas comparativas deberá hacerse con muestras debidamente pesadas y las mismas cantidades).
- ii. Se adiciona 10 mL de etanol y se coloca en un “baño maría” (baño de aceite a 90°C), y se hace hervir por 5 minutos. Se filtra la solución etanólica, a través de papel filtro “rápido” y un embudo de vidrio pequeño, recibiendo los filtrados en un tubo de ensayo seco de 18 x 150mm.
- iii. Se concentra la solución etanólica a sequedad. Para esto hay tres alternativas:
 - Utilizando el “baño maría
 - Utilizando el rotavapor

- Utilizando un “mechero de bolsillo”
- iv. Una vez seco, se deja enfriar y sobre el residuo se agrega de 2 a 5 gotas de una solución de ácido clorhídrico al 2%. Se agita el tubo de manera de disolver todas las partículas sólidas.
- v. Se filtra el líquido (debe tenerse un filtrado completamente limpio) a dos tubos de ensayo de 13 x 100 mm secos de modo que en cada uno haya volúmenes aproximadamente iguales.
- vi. Se coloca ambos tubos delante de un papel blanco.
- vii. Separadamente, a cada uno de los tubos se le agrega, gota a gota, 2 gotas de “reactivo de Mayer” y se observan los cambios que se producen.
- viii. La precipitación da un sólido blancuzco o amarillento lechoso indica la presencia de alcaloides.
- ix. Si no hay cambio en la apariencia de la solución esto indicará la ausencia de alcaloides.

2. Reactivo de Mayer

Se disuelven 1,36 g de cloruro de mercurio (II) HgCl_2 en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y se afora a 100 mL.

B. Test de Dragendorff

Este reactivo da con los alcaloides, en soluciones débilmente aciduladas con ácido sulfúrico, precipitados de color rojo o anaranjado, amorfos, poco estables y cristalizables.

1. Procedimiento

El procedimiento es el mismo que aquel del test de Mayer, excepto que el reactivo utilizado es el de Dragendorff.

2. Reactivo de Dragendorff

Se disuelven 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de ácido nítrico HNO_3 concentrado ($d = 1,18 \text{ g/mL}$), y 27,2 g de yoduro de potasio KI en 50 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones, y se deja en reposo durante 24 horas. Se decanta y se afora a 100 mL.

Anexo 5. La “Quina” (Cinchona Pubescens)

Referencia. - Pérez García, W. (2017). Evaluación etnobotánica medicinal de la comunidad de Buenos Aires, Jaén, Cajamarca-Perú.

Familia: Rubiaceae

Nombres comunes: Cascarilla amarilla, cascarilla colorada, cascarilla roja, cascarilla boba, quina, quina blanca, quina amarilla, cascarilla de Carabaya, cascarilla de Santa Ana, cascarilla fina, cascarilla morada cascarilla mula, cascarilla pata de gallareta, cascarilla pata de gallinazo, cascarilla verde, cascarilla zamba morada, cargua-cargua, palo blanco, corteza roja.

Descripción botánica: Árbol, 10 m de altura, ramificación simpodial, copa globosa, corteza externa color marrón gris, apariencia fisurada, corteza interna, color rojizo amarillento, hojas simples opuestas y decusadas de forma elíptica a ovada, ápice agudo, base obtusa, forma elíptica todas tienen una vena media bien desarrollada con venas laterales más o menos prominentes. Las flores se encuentran en panículas terminales. Los frutos son capsulas de color marrón oscuro de forma elipsoide.

Parte usada de la planta: Hojas y corteza.

Formas de preparación: Cocimiento, macerado en aguardiente, extracto de las hojas.

Usos y dosificación: Es una planta milenaria muy utilizada debido a sus propiedades curativas como antiséptico, febrífugo, astringente, antioxidante, digestivo, antibiótico y anestésico, utilizada para el paludismo y dengue; se hierve la corteza por diez minutos y se toma $\frac{1}{2}$ vaso dos veces diarias, para dolores menstruales de estómago y de cabeza se macera la corteza con aguardiente y se suministra cuando se presenta el dolor, en dosis moderadas no genera contraindicaciones, pero si se abusa puede provocar dolor de cabeza y náuseas, el jugo de las hojas molidas es usado para lavar heridas y para la caída del cabello realizando enjuagues diarios.

Principios activos: Catequinas combinadas con 20 alcaloides tales como, la quinina, quinidina, cinchonina, cinchonidina.



Figura (d). *Cinchona pubescens* Vahl (Ramita terminal, inflorescencia y corteza interna). Foto por Perez -2017.

Anexo 6. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar

(De acuerdo al procedimiento de Rondina y Coussio-1969)

Muestra (Nombre común y científico): *Cinchona pubescens* (Tallos) (Cód. 15821)

Procedencia: Muestra entregada por la Prof. Joaquina Alban

Prueba N°	Principio Activo	Pruebas coloración	Fracción	Resultados (*)	Observaciones (color de solución y/o precipitados)
01	Aminogrupos primarios y/o secundarios	Ninhidrina	a	+	Violeta tenue
			f	+	Violeta tenue
02	Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	a	+	Verde parduzco
03	Taninos	Gelatina	a	++	Precipitado blanco
04	Triptenos y esteroides	Reacción Liebermann Burchard	b	+	Anillo verde tenue
			c	-	Anillo pardo
			d	-	Anillo incoloro
05	Quinonas, antranas o antranoles	Reacción Borntrager	b	+	Rosado tenue
06	Alcaloides	Reacción Draggendorff	c	++	Precipitado crema
			d	-	No hay formación de precipitado
		Reactivo de Mayer	c	++++	Precipitado crema
			d	++	Precipitado crema
		Reactivo Wagner	c	++++	Precipitado anaranjado
			d	++	Precipitado anaranjado
07	Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción Rosembeim	d	-	Fase amílica rosado muy tenue
			e	+	Fase amílica marron muy tenue
08	Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción Shinoda	d	-	Fase amílica amarillo tenue
			e	+	Fase amílica marron muy tenue
09	Saponinas	Prueba de espuma	f	+	h = 0,45 cm

Cantidad de la muestra: 5 g, 1g

Fecha de Análisis: 15. May - 20. jun.06

Analista: Karin Loayza Ochoa (Supervisión: E. Cóndor)

Proyecto: Proyecto de Investigación - 2006

(*) Convención: Abundante (+++), regular (++) , poco (+), negativo (-)

Para aminogrupos y triterpenos-esteroides, la observación macroscópica del color de la prueba no guarda relación con la cantidad de sustancia presente.

Resumen de resultados:

Contiene. - Aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, taninos, triterpenos y esteroides, quinonas, antronas o antranoles, alcaloides, catequinas, saponinas y flavonoides

Fecha del Informe: 15. set. 06

Nombre: Karin Loayza Ochoa

Anexo 7. Resultados de tamizaje fitoquímico

(De acuerdo al procedimiento de Migdalia Miranda – 2002)

Muestra (Nombre común y científico): *Cinchona pubescens* (Tallos) (Cód. 15821)

Procedencia: Muestra entregada por la Prof. Joaquina Alban

Cantidad de la muestra : 30 g

Fecha de Análisis : 06. Jun - 29. Set.06

Analista : Karin Loayza Ochoa (Supervisión: E. Cóndor)

Pru. Nº	Clase de Producto Natural	Pruebas de coloración o precipitación	Extracto	Resultados (*)	Observaciones
1	Aminoácidos libres o aminas en general	Ninhidrina	EtOH	+	Violeta tenue
2	Fenoles y Taninos	Cloruro férrico	EtOH	++	Color verde oscuro
	Taninos		Acuoso	++	Color azul oscuro
3	Flavonoides	Ensayo de Shinoda	EtOH	+	Coloración rosado tenue
			Acuoso	-	Fase amílca incolora
4	Triterpenoides y/o esteroides	Ensayo de Liebermann Burchard	Etéreo	+	Anillo color azul verdoso
			EtOH	-	Anillo marrón
5	Quinonas	Ensayo de Borntrager	EtOH	++	Fase acuosa roja
6	Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	Etéreo	-	No se observa precipitado
			EtOH	-	No se observa precipitado
			Acuoso	-	No se observa precipitado
		Reactivo de Mayer	Etéreo	-	
			EtOH	+++	Precipitado crema
			Acuoso	+	Turbidez blanca
		Reactivo de Wagner	Etéreo	-	No se observa precipitado
			EtOH	+	Turbidez anaranjada
			Acuoso	-	Se observa precipitado color negro
7	C6-C3-C6 del grupo de Flavonoides	Ensayo de Antocianidina	EtOH	++	Fase amílca color rojo
8	Catequinas	Ensayo de Catequizas	EtOH	+	Fluorescencia verde

Pru. Nº	Clase de Producto Natural	Pruebas de coloración o precipitación	Extracto	Resultados (*)	Observaciones
		(UV)			
9	Lactonas y Coumarinas	Ensayo de Baljet	Etéreo	-	Precipitado anaranjado
			EtOH	-	Precipitado anaranjado
10	Saponinas	Ensayo de Espuma	EtOH	+	h = 1,3 cm
			Acuoso	+	h = 1,4 cm
11	Glicósidos Cardiotónicos	Ensayo de Tollens	EtOH	+	Observación del espejo de plata
12	Azúcares Reductores	Ensayo de Fehling	EtOH	-	Precipitado anaranjado
			Acuoso	-	Precipitado anaranjado
13	Polisacáridos	Ensayo de mucílagos	Acuoso	-	No se observa fase gelatinosa
14	Coumarinas	Ensayo de Hidroxamato Férrico	EtOH	-	No se observa cambio

(*) Convención (+++) abundante; (++) regular; (+) poco

Para aminogrupos y triterpenos – esteroides, la observación macroscópica del color de la prueba no guarda relación con la cantidad de sustancia presente.

Resumen de resultados:

Contiene. - Aminoácidos libres o aminas en general, fenoles y taninos, flavonoides, triterpenoides y/o esteroides, quinonas, alcaloides, catequinas, saponinas y glicósidos cardiotón.

No contiene. - Lactonas y coumarinas, y coumarinas.

Fecha del Informe: 15. set. 06

Nombre: Karin Loayza Ochoa

Anexo 8. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar

(De Acuerdo al Procedimiento de Villacrez O., Victor-1995)

Muestra (Nombre común y científico): *Cinchona pubescens* (Tallos) (Cód. 15821)

Procedencia: Muestra entregada por la Prof. Joaquina Alban

Cantidad de la muestra: 10 g

Fecha de Análisis: 29 May.; 1, 6, 7. Jun; 8 y 15. set.06

Analista: Karin Loayza Ochoa (Supervisión: E. Cóndor)

Prueba Nº	Principio Activo	Pruebas de coloración	Resultados (*)	Observaciones (color de soluciones y/o precipitados)
1	Taninos	Gelatina	+	Turbidez blanca
		Cloruro Férrico	+	Coloración azul tenue
2	Triterpenos y esteroides	Reacción de Lieberman Burchard	++	Se observa un color azul
3	Antraquinonas	Reacción de Borntrager	+++	Fase acuosa rojo
4	Alcaloides	Reacción Draggendorf	+	Precipitado anaranjado
		Reactivo de Mayer	++	Precipitado crema
		Reactivo de Wagner	++	Precipitado(marrón) anaranjado
5	Flavonoides excepto chalconas, auronas	Reacción de Shinoda	+	Fase amílica rosada
6	Cumarinas		-	No se observa fosforescencia
7	Saponinas	Prueba de la espuma	+	h = 1,3 cm
8	Glicósidos cardiotónicos	Prueba de Tollens	+	Se observa un precipitado plomizo

(*) Convención: Abundante (+++), regular (++), poco (+), negativo (-)

Para aminogrupos y triterpenos-esteroides, la observación macroscópica del color de la prueba no guarda relación con la cantidad de sustancia presente.

Resumen de resultados:

Contiene. - Taninos, antraquinonas, alcaloides, flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, triterpenos y esteroides

No contiene. - Cumarinas.

Fecha del Informe: 15. set. 06

Nombre: Karin Loayza Ochoa

Anexo 9. Determinación del punto de equivalencia de la valoración potenciométrica.

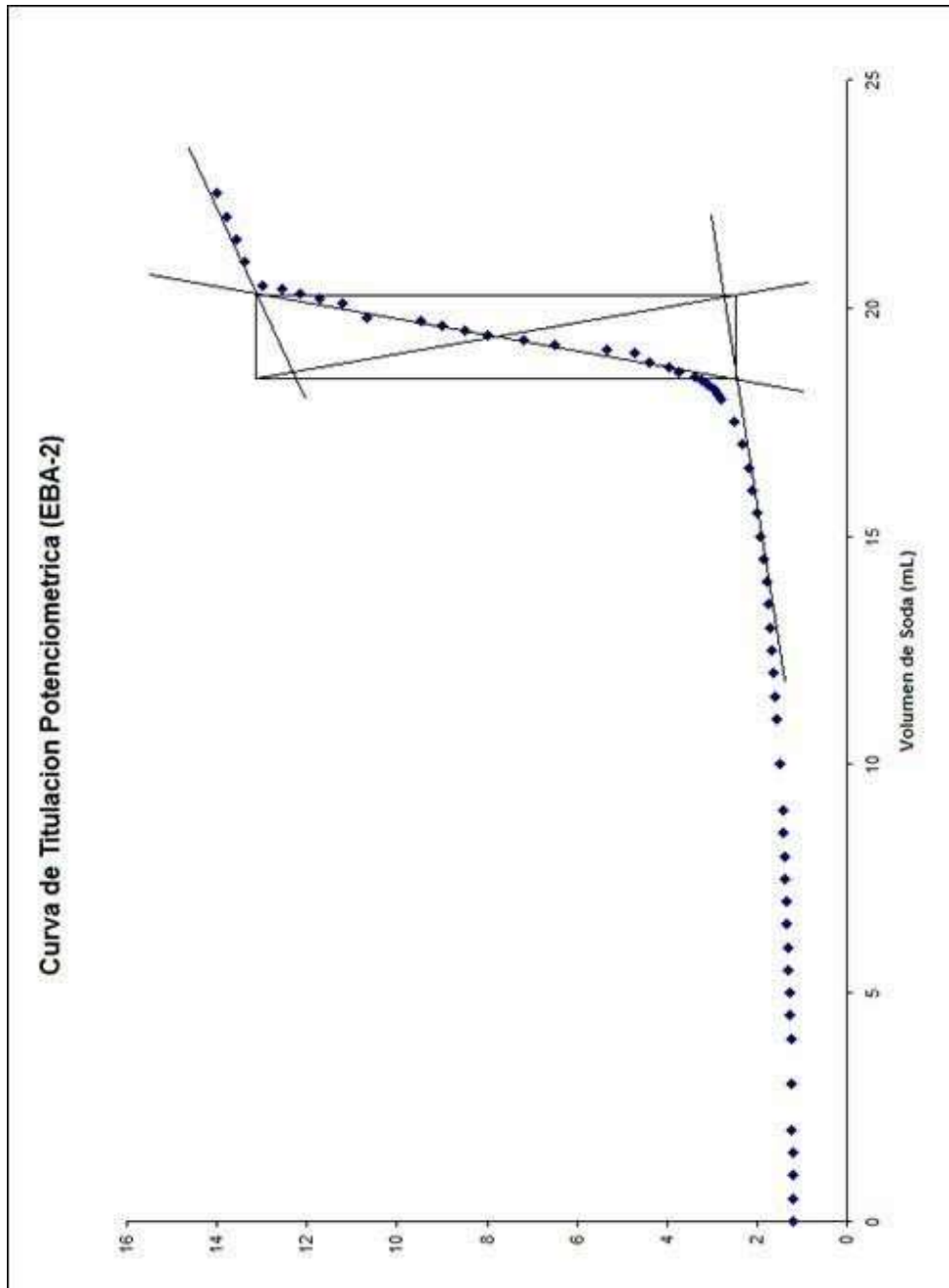
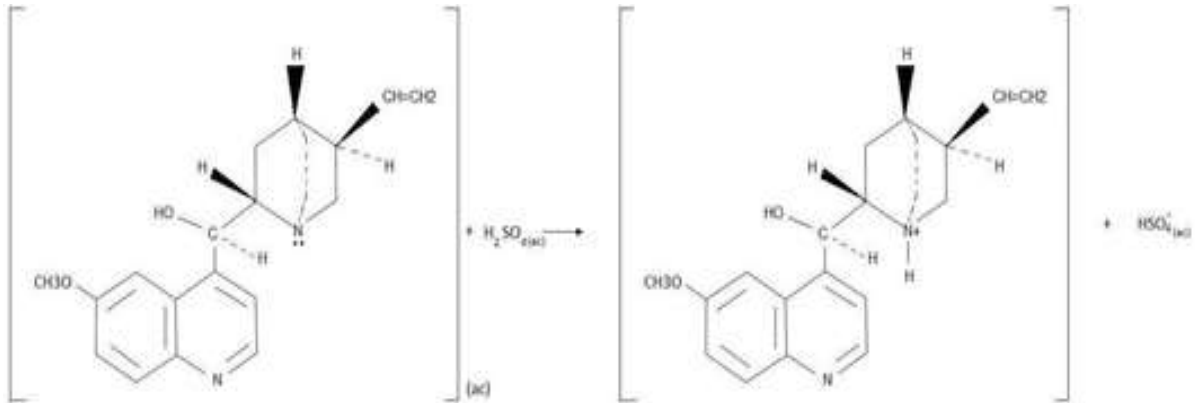


Figura (e). Curva de Titilación Potenciométrica del primer análisis según United States Pharmacopoeia – USP, 20th Ed., - 1980 (Ver Sec. F. Análisis cuantitativo de alcaloides, Pág. 59)

Anexo 10. Determinación cuantitativa de alcaloides totales en los tallos de la Quina (*C. Pubescens*)

(Segunda determinación)

- i. Al agregar un exceso de solución de ácido sulfúrico $H_2SO_4(ac)$ (20 mL, 0,5046 N) al Extracto Bruto de Alcaloides, ocurre la reacción:



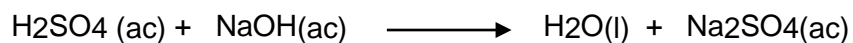
y se tiene que:

$$N^{\circ} \text{ meq ácido (sobrante)} = N^{\circ} \text{ meq ácido total} - N^{\circ} \text{ meq alcaloide... } (\alpha)$$

donde

$$N^{\circ} \text{ meq ácido total} = N \times V = 0,5046 \times 20 = \mathbf{10,092 \text{ meq}} \quad (\beta)$$

- ii. El ácido sulfúrico $H_2SO_4(ac)$ sobrante, que queda sin reaccionar con el alcaloide, se titula con 19,2 mL de solución de hidróxido de sodio $NaOH(ac)$ 0,5097 N, según la ecuación:



y en el punto de equivalencia se cumple que:

$$N^{\circ} \text{ meq. Ácido (sobrante)} = N^{\circ} \text{ meq. base} \dots\dots\dots (\gamma)$$

- iii. La cantidad (meq) de hidróxido de sodio ($N=0,5097$ y $V = 19,2$ mL) se determina por la relación: $N^{\circ} \text{ meq} = N \times V$ (mL)

$$N^{\circ} \text{ meq base} = N_{NaOH} \times V_{NaOH}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(NaOH)} = 0,5097 \text{ N} \times 19,2 \text{ mL}$$

$$N^{\circ} \text{ meq}_{(NaOH)} = 9,7862 \text{ meq}$$

iv. La cantidad de meq de ácido sobrante se determina por la relación

$$N^{\circ} \text{ de meq } (H_2SO_4) \text{ sobrante} = \mathbf{9,7862 \text{ meq}} \dots\dots\dots (\epsilon)$$

v. La cantidad (en meq) de alcaloides presentes se determina reemplazando las cantidades (γ) y (ϵ) en la relación (α):

$$\begin{aligned} N^{\circ} \text{ meq de alcaloide} &= N^{\circ} \text{ meq de ácido total} - N^{\circ} \text{ meq de ácido (sobrante)} \\ &= 10,092 \text{ meq} - 9,7862 \text{ meq} = 0,3057 \text{ meq} \end{aligned}$$

vi. La cantidad (en mg) de alcaloides (quinina) se determina teniendo en cuenta que:

$$N^{\circ} \text{ eq} = \frac{W}{1 \text{ Eq} - g} \quad \vee \quad 1 \text{ Eq} - g = \frac{\bar{M}}{\theta}$$

Donde θ es el número de hidrógenos intercambiados en la reacción ácido-base (para la quinina $\theta = 1$) y \bar{M} es el peso molecular de la sustancia (para la quinina $\bar{M} = 324,41 \text{ g/mol}$).

$$\text{Luego: } W = N^{\circ} \text{ meq} \times M$$

$$W = 0,3057 \times 324,41 \text{ g/mol}$$

$$W = 99,191 \text{ mg de quinina (en 20 g de muestra seca)}$$

vii. El porcentaje de alcaloides en la muestra se determina por la relación:

$$20\text{g} \quad \longrightarrow \quad 100\%$$

$$0,0991\text{g} \quad \longrightarrow \quad \% \text{ de alcaloides (como quinina)}$$

$$\% \text{ de alcaloides (como quinina)} = \frac{0,0991 \times 100}{20} = 0,49\%$$

Anexo 11. Ensayos de aislamiento y purificación de alcaloides

Obtención de Quinina, mediante la formación de Sulfato de Quinina (28.May.-jun.2007) (Ref. A. A. Rojahn, Productos Químicos y Farmacéuticos, Ed. Atlante S. A., México, 1946, Tomo III, Págs. 2050-2053).

1. Obtención del sulfato Quinina.

- i. El extracto bruto de alcaloides, EBA-1 (1 627mg) se disolvió en 45 mL de cloroformo, observándose una solución marrón oscuro.
- ii. El extracto orgánico se extrajo con H_2SO_4 0,5N (1 350 mL) hasta obtener una prueba negativa de Mayer (pH = 1,02(1)).
- iii. La solución ácida se lavó con cloroformo (2x300 mL).
- iv. La solución ácida se llevó a un pH = 7, con 90 mL de NH_3 (conc). Se observó un precipitado marrón oscuro.
- v. El precipitado se separó de la solución a través de una filtración a vacío, utilizando un embudo de vidrio fritado (se guardó para tratamiento posterior).
- vi. El filtrado se llevó a pH = 6(1), con 8 mL de H_2SO_4 0,5 N (Volumen total obtenido=1 430 mL, solución de color amarillo).
- vii. La solución a pH= 6 se trató con carbón activado, para aclarar la solución, y se dejó en reposo por una noche para la precipitación del sulfato de quinina ($V_{total} \sim 1,5$ L).
- viii. Al día siguiente no se observó ningún precipitado por lo que se optó por la concentración de la solución en baño maría (temperatura del baño = 80-90°C), hasta un volumen de 5000mL.
- ix. Durante la concentración se observó la formación de un sólido blanco, al cual se determinó el punto de fusión (2), correspondiente al sulfato de amonio (237°C).

2. Obtención de la quinina

- x. A la solución acuosa concentrada (500 mL) se adicionó aproximadamente 25 mL NH_3 (conc.) (pH básico) hasta la precipitación total de la quinina, la cual precipitó junto con el sulfato de amonio y otras impurezas. Se filtró el sólido por decantación (centrifugación), el cual no se pesó. El volumen básico restante (aproximadamente 500mL) el cual dio prueba de alcaloides positivo.
- xi. El líquido básico aproximadamente 500mL se coloca en un a capsula de porcelana ($\varphi= 70\text{mm}$) se concentra a sequedad en baño María (80-90°C), durante aproximadamente 2 horas, sin agitación, hasta la obtención de un sólido blanco amarillento, que no se pesó.
- xii. El sólido se disolvió en etanol aproximadamente 50mL, quedando sin disolver el sólido blanco (que resultó ser el sulfato de amonio, p.f. 145-150°C) (p.f. sulfato de amonio es 146,9 °C ref. lange).
- xiii. La solución etanólica (que se espera obtener quinina) se lleva a sequedad en baño maria (80-90°C), durante aproximadamente 15 minutos.
- xiv. Obtención de un sólido color marrón claro peso = 105mg (A2 EBA-1) p.f. = 222°C (p.f quinina= 177°C) (p.f.= cinconina = 255°C).
- xv. El sólido se disolvió con 80 mL de etanol, separando el sulfato de amonio (sólido blanco) de la quinina por filtración a presión normal.
- xvi. La solución etanólica con quinina disuelta se concentró a baño María (80-90°C) hasta obtener un sólido de color blanco ligeramente amarillento (masa = 85 mg). (al EBA-1)

3. Análisis por cromatografía en capa fina (15 jun. 2007)

- i. Condiciones de trabajo
Placa: Silicagel 60 F 254
Eluente: Cloroformo-Acetona-Amoniaco (10:17:1)

Revelador: UV, $\lambda = 336 \text{ nm}$

Muestra sembrada: quinina (Qu) y extracto etanólico (E.E.-1)

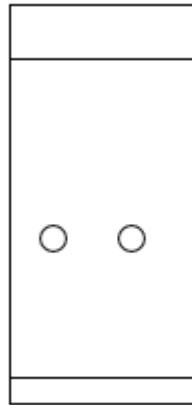
ii. Resultados

$R_f(\text{Qu}) = 0,64$

$R_f(\text{EBA-1}) \longrightarrow R_f(1) = 0,64$

Se observaba colas marrones

Observaciones: Frente a la luz UV de onda larga se observar fluorescencia lila



Anexo 12. Obtención de los extractos brutos de alcaloides

1. Extracción sólido - líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (Descripción del primer ensayo: 29. Set'2006 - 18. Ene'2007)

a. Desengrase en frío con n-hexano.

- i. En un frasco erlenmeyer de 1 L se colocó 150 g de la muestra y se adicionó 450 mL de n-hexano. La mezcla se puso en agitación¹⁸, a temperatura ambiente, durante una hora, y luego se dejó en reposo hasta el día siguiente (24h).
- ii. Se separó el líquido sobrenadante de color amarillo oscuro, con una pipeta volumétrica de 50 mL. Al sólido restante se adicionó una nueva porción de 450 mL de n-hexano y se agitó. Este procedimiento se realizó 3 veces con 450 mL, 5 veces con 250 mL y 4 veces con 300 mL¹⁹. (29/09/06 al 15/11/06).
- iii. Finalmente, el sólido húmedo se transfirió a una bandeja de 17cm x 26 cm, y se dejó secar al aire a la temperatura ambiente.

b. Alcalinización con solución de amoníaco concentrado.

La muestra seca y desengrasada (140 g) se introdujo en un cartucho de tocuyo, y se colocó dentro del equipo soxhlet. Luego se añadió sobre el cartucho, con la ayuda de una pipeta, 200 mL de solución de amoníaco concentrado NH_3 (ac) 15 N, humedeciéndose así completamente toda la muestra, y se dejó en reposo durante dos horas.

c. Extracción con solventes

- i. Maceración con metanol-cloroformo (1:1)

Sobre la muestra alcalinizada, que se encontraba dentro del cuerpo central del equipo soxhlet, se adicionó 200 mL de una mezcla de metanol-cloroformo (1:1)

¹⁸ Para la agitación se utilizó un agitador eléctrico de eje flexible con paleta de vidrio MLW ER10.

¹⁹ Para la agitación se utilizó un agitador eléctrico de eje flexible con paleta de vidrio MLW ER10

y se dejó macerar durante 24 horas. La solución final adquirió un color marrón oscuro.

Extracción con mezcla de solventes

Sobre la muestra, que se encontraba dentro del cuerpo central del equipo soxhlet, se le adicionó 900 mL de una mezcla de metanol- cloroformo-acetato de etilo (1:1:4) y se extrajo con soxhlet durante 4 horas/día, por 24 días (96 horas) hasta que el solvente en el cuerpo central del soxhlet dio test de Mayer negativo.

d. Eliminación del solvente

Todos los extractos orgánicos se juntaron y luego se concentró en el rotavapor (30 °C, 400-300 mbar), casi hasta sequedad, obteniéndose el Extracto Bruto Orgánico, de color marrón oscuro, que no se pesó.

2. Separación líquido-líquido: Obtención del Extracto Bruto de Alcaloides (Descripción del segundo ensayo: 14. Feb'2007-22. Mar'2007).

a. Disolución del extracto bruto orgánico con solución ácida

- i. El extracto bruto orgánico se disolvió en solución de ácido sulfúrico H₂SO₄ (ac) 0,5 N.
- ii. Este procedimiento se realizó tres veces más, con diferentes cantidades de ácido (2 x 350 mL). El sólido remanente dio prueba negativa de alcaloides (test de Mayer) y se descartó.
- iii. Los extractos acuosos ácidos, de color marrón claro, se reunieron (volumen total = 870 mL) y se colocaron en un embudo de separación de 1 L.

b. Lavado de la disolución ácida con solventes orgánicos

- i. La disolución ácida, que contiene los alcaloides como sales, se lavó 2 veces con porciones de 350 mL cloroformo.
- ii. Se separó la fase orgánica (que no contiene alcaloides, test de Mayer negativo), de color amarillo, y se descartó.

c. Alcalinización del extracto con solución de amoníaco NH₃ (ac) 7,5 N.

La disolución acuosa ácida se alcalinizó con 33 mL de NH₃ (ac) 7,5 N hasta pH 9. Se observó un precipitado marrón, y un oscurecimiento de la disolución.

d. Extracción de alcaloides con solventes orgánicos

- i. La fase acuosa básica (en el embudo de separación) se extrajo con 100 mL de cloroformo.
- ii. Esta extracción se repitió 30 veces más, hasta que la fase acuosa esté exenta de alcaloides (test de Mayer negativo).
- iii. Los extractos orgánicos se colocaron en un balón de 500 mL y se concentraron en el rotavapor (30° C, 400-300 mbar) hasta sequedad.
- iv. Sobre el residuo de alcaloides se agregó 100 mL de cloroformo y se volvió a concentrar a sequedad en el rotavapor (30° C, 400-300 mbar), repitiéndose esta operación un total de cuatro veces. Esto tiene por objeto eliminar las bases volátiles (amoníaco, NH₃ (g)) que estuvieran disueltas en el extracto.
- v. Finalmente se obtuvo 1 627 mg del Extracto Bruto de Alcaloides (EBA.1), como una pasta, de color marrón oscuro. El análisis por CCF20 nos indica que el extracto contiene quinina.

3. Análisis por cromatografía en capa fina (18. May.2007)

i. Condiciones de trabajo

Placa : Silicagel 60 F 254

Eluente : Cloroformo-Acetona-Amoniaco (10:17:1)

Revelador : UV, $\lambda = 336$ nm

Muestra sembrada: quinina (Qu) y extracto bruto de alcaloides(EBA-1)

ii. Resultados

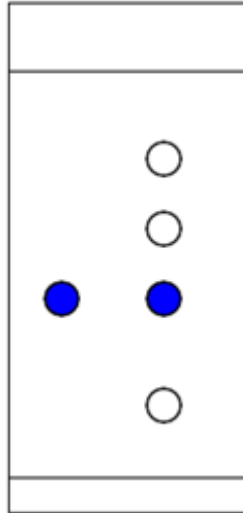
R_f (Qu) = 0,62

²⁰ CCF: palcas de sílica gel 60 F 254, eluente: Cloroformo-acetona-amoniaco (10:17:1); Revelador: UV; R_f (quinina)=0,62).

Rf (EBA-1) \longrightarrow Rf (1) = 0,1; Rf (2) = 0,48;

Rf (3) = 0,62; Rf (4) = 0,78

Observaciones: Frente a la luz UV de onda larga se observa fluorescencia lila.



Anexo 13. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina (CCF) del extracto bruto de alcaloides (ver sec. II. G.4.)

Análisis por cromatografía en capa fina (18. May.2007)

i. Condiciones de trabajo

Placa : Silicagel 60 F 254

Eluente : Cloroformo-Acetona-Amoniaco (10:17:1) Revelador: UV, $\lambda = 336$ nm

Muestra sembrada: quinina (Qu) y extracto bruto de alcaloides (EBA-2)

ii. Resultados

Rf (Qu) = 0,62

Rf(EBA-2) \longrightarrow Rf(1) = 0,1 ; Rf (2) = 0,48 ; Rf(3) = 0,62 ; Rf(4) = 0,78

Observaciones: Frente a la luz UV de onda larga se observan fluorescencia lila.

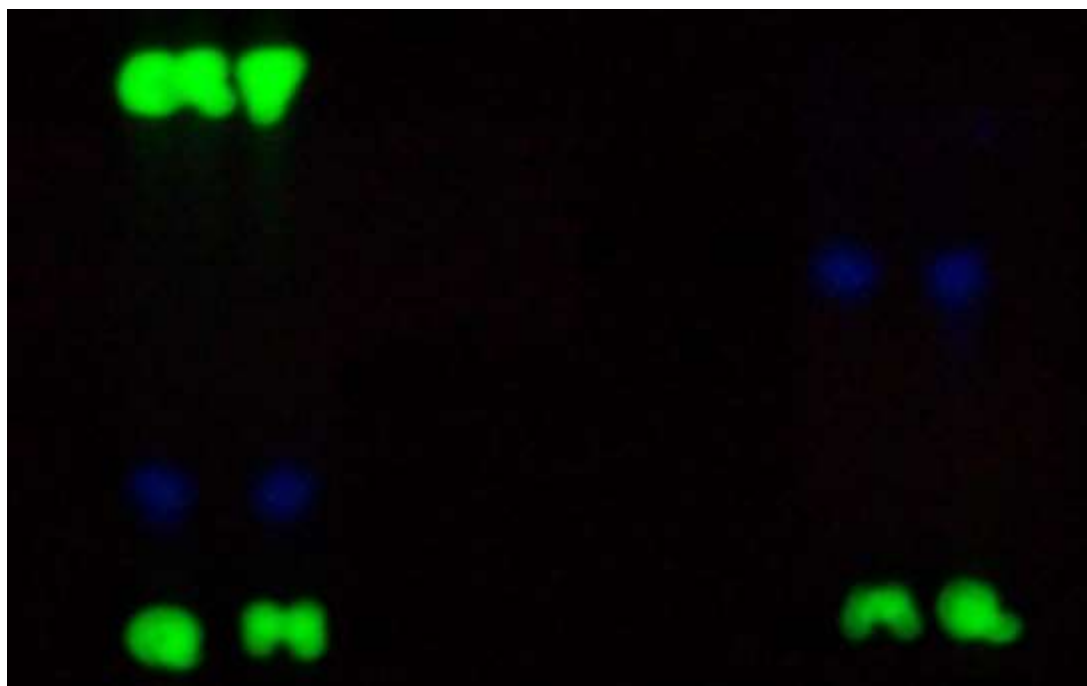


Foto Nº 1. Cromatografía en capa fina (Foto K. Loayza)

Análisis por cromatografía en capa fina (oct.2007)

iii. Condiciones de trabajo

Placa : Silicagel 60 F 254

Eluente : Metanol: Acetato: Amoniaco (2:8:0,1)

Revelador : UV, $\lambda = 336$ nm

Muestra sembrada: quinina (Q) y las 12 fracciones obtenidas en CCV (Sec. III.G.5).

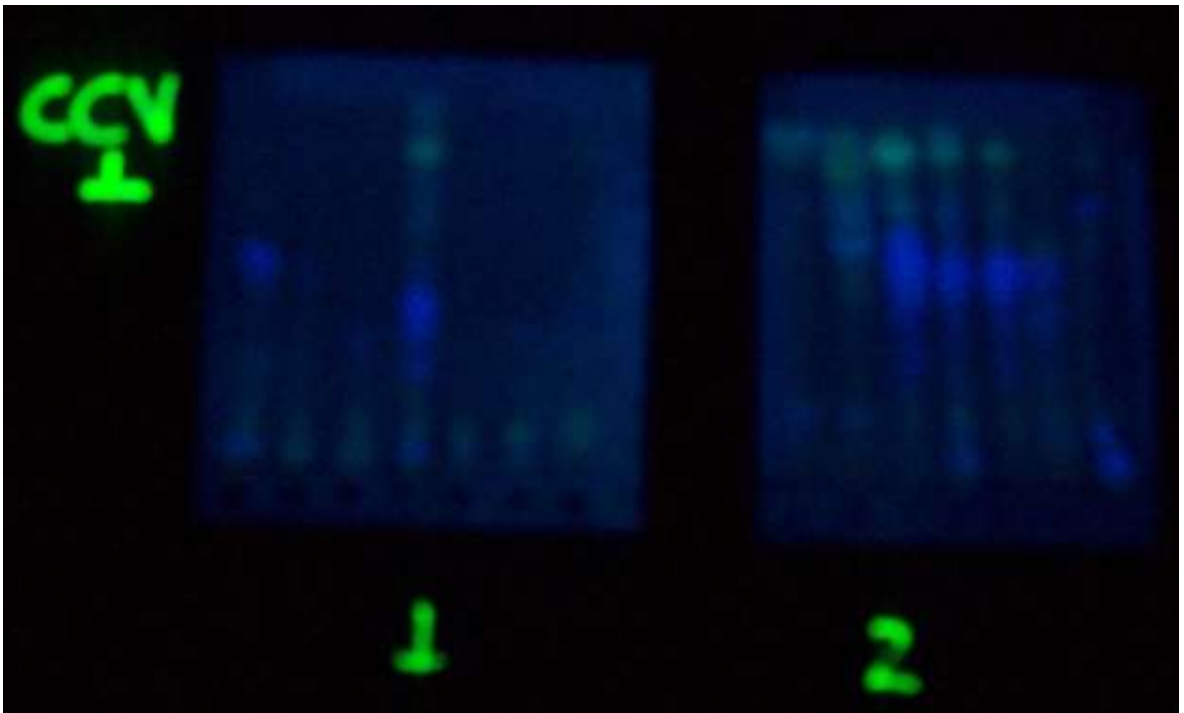


Foto Nº 2. Cromatografía en capa fina (Foto K. Loayza)

Análisis por cromatografía en capa fina (oct.2007)

iv. Condiciones de trabajo

Placa : Silicagel 60 F 254

Eluente : Acetato: Amoniaco (10:0,3)

Revelador : UV, $\lambda = 336 \text{ nm}$

Muestra sembrada: quinina (Q) y las 23 fracciones obtenidas en CCDC- 1(Sec. III.G.5).



Foto Nº 3. Cromatografía en capa fina (Foto K. Loayza)

Análisis por cromatografía en capa fina (oct.2007)

v. Condiciones de trabajo

Placa : Silicagel 60 F 254

Eluente : Metanol: Acetato: Amoniaco (2:8:0,1)

Revelador : UV, $\lambda = 336 \text{ nm}$

Muestra sembrada: quinina (Q) y las 20 fracciones obtenidas en CCDC- 2 (Sec. III.G.5).

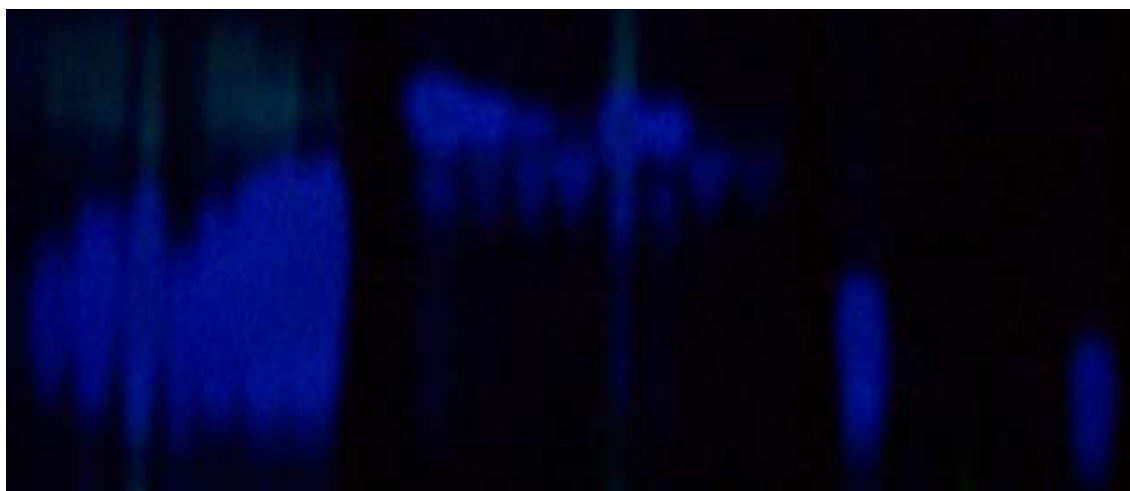


Foto Nº 4. Cromatografía en capa fina (Foto K. Loayza)

Análisis por cromatografía en capa fina (oct.2007)

vi. Condiciones de trabajo

Placa : Silicagel 60 F 254

Eluente : Metanol: Acetato: Amoniaco (0,5:8:0,2)

Revelador : UV, $\lambda = 336 \text{ nm}$

Muestra sembrada: quinina (Q) y las 20 fracciones obtenidas en CCDC- 2(Sec. III.G.5).

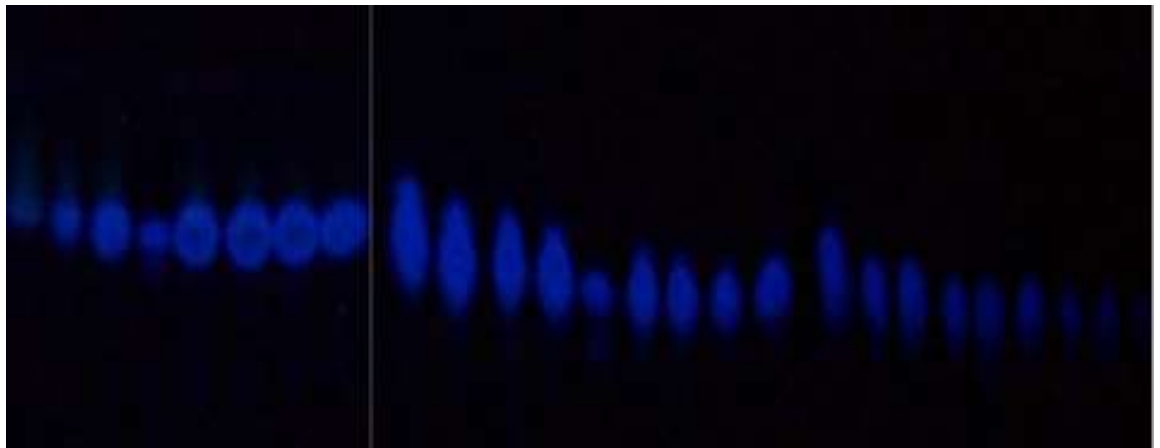


Foto N° 5. Cromatografía en capa fina (Foto K. Loayza)

Anexo 14. Panel Fotográfico



Columna cromatografía al vacío – CCV (Foto K. Loayza)



Cromatotron modelo 7924 T. Harrison Research (Foto K. Loayza)

Anexo 15. Esquema de Purificación por CCV y CCDC del EBA-2

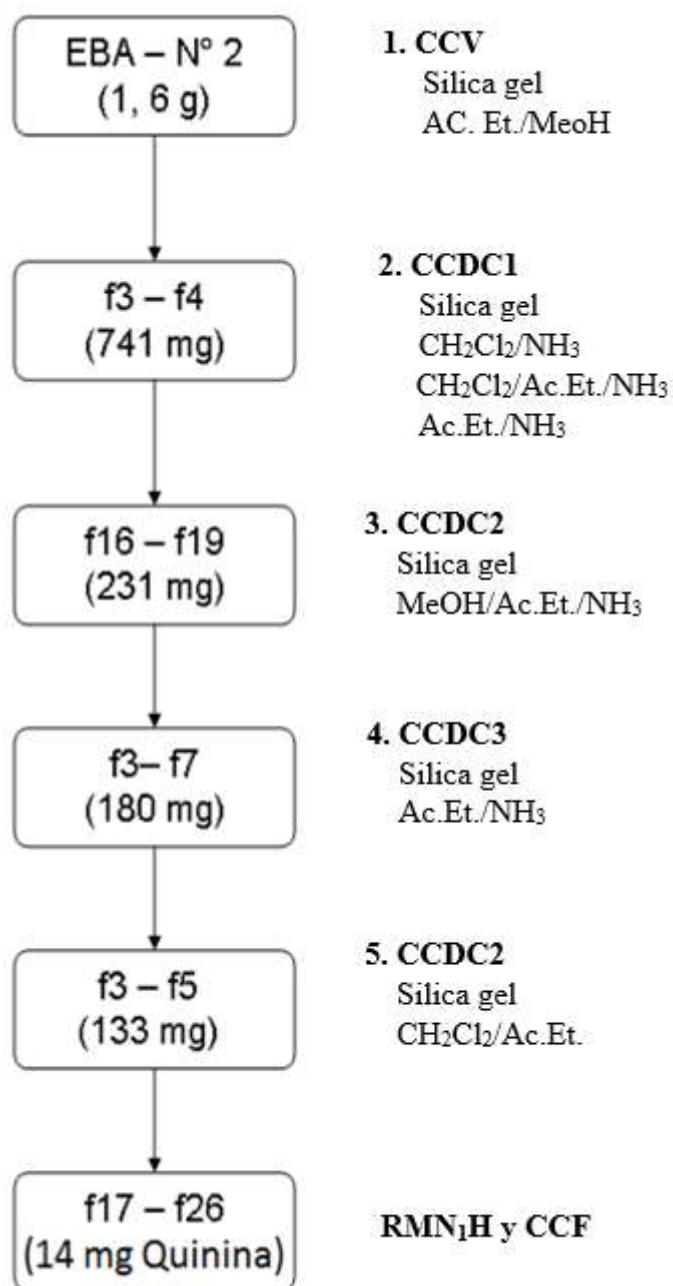


Figura (f): Esquema de purificación por CCV y CCDC del EBA-2