

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



REVISIÓN HISTÓRICA DE METODOLOGÍAS DE
EXTRACCIÓN PARA EL ALCALOIDE QUININA DEL
ÁRBOL *Cinchona*

Trabajo de graduación presentado por Inés del Pilar Cordón O'Meany
para optar al grado académico de Licenciada en Química

Guatemala,

2020

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



REVISIÓN HISTÓRICA DE METODOLOGÍAS DE
EXTRACCIÓN PARA EL ALCALOIDE QUININA DEL
ÁRBOL *Cinchona*

Trabajo de graduación presentado por Inés del Pilar Cerdón O'Meany
para optar al grado académico de Licenciada en Química

Guatemala,

2020


Vo. Bo. :

(f) 
Lic. Angelika Hasselmann

Tribunal Examinador:

(f) 
Lic. Angelika Hasselmann

(f) 
Lic. Ángel Ramírez

(f) 
Lic. María José Bran

Fecha de aprobación: Guatemala, 29 de junio del 2020

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE CUADROS	IX
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	5
3.1. OBJETIVO GENERAL	5
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	5
4. MARCO TEÓRICO	7
4.1. MALARIA	7
4.1.1. SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO	8
4.1.2. MALARIA EN GUATEMALA	9
4.2. TRATAMIENTOS FARMACÉUTICOS	9
4.2.1. RESISTENCIA DEL PARÁSITO	10
4.2.2. MEDICAMENTOS CON QUININA	11
4.3. ALCALOIDES COMO METABOLITOS SECUNDARIOS	11
4.4. QUININA	12
4.4.1. ORIGEN DE LA QUININA	12
4.4.2. ESTRUCTURA	12
4.4.3. BIOSÍNTESIS	12
4.4.4. SÍNTESIS DE LA QUININA	13
4.4.5. USOS	14
4.4.6. RELACIÓN CON GUATEMALA	14
4.5. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	15
4.5.1. ANÁLISIS CUALITATIVO	15
4.5.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO	17

5. REVISIÓN HISTORIA DE LAS METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA EXTRACCIÓN DEL ALCALOIDE QUININA	21
5.1. 1820: JOSEPH PELLETIER Y JOSEPH CAVENTOU	21
5.2. 1889: GEORGE WATT	22
5.3. 1990: DAVID V. McCALLEY	23
5.4. 1991: BETTY MALDONI	26
5.5. 2002: DAVID V. McCALLEY	26
5.6. 2002: MARIA de CÉU de MADUREIRA, ANA PAULA MARTINS, MILENE GOMES, JORGE PAIVA, ANTÓNIO PROENÇA da CUNHA Y VIRGÍLIO do ROSÁRIO	27
5.7. 2008: HIMANSHU MISRA, BHUPENDRA K. MEHTA Y DHARAM C. JAIN	28
5.8. 2009: ELENA CÓNDROR CUYUBAMBA, BRÁS H. de OLIVEIRA, KARIN LOAYZA OCHOA Y VÍCTOR REYNA PINEDO	30
5.9. 2013: ANA MARÍA MESA VANEGAS, ANDRÉS QUINTO QUINTO Y SILVIO BLAIR TRUJILO	36
5.10. 2017: ELSE HOLMFRED, CLAUS CORNETT, CARLA MALDONADO, NINA RØNSTED Y STEEN HONORÉ HANSEN	38
6. PROPUESTA PARA LA EXTRACCIÓN DEL ALCALOIDE QUININA A PARTIR DE LA MUESTRA DE CORTEZA	41
6.1. EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES POR MÉTODO TRADICIONAL USANDO ACEITE DE KEROSENO	41
6.2. PURIFICACIÓN POR RECRISTALIZACIÓN	42
6.2.1. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PARA LA QUININA	42
6.3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PROPUESTO	43
7. CONCLUSIONES	45
8. RECOMENDACIONES	47
9. BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE FIGURAS

1.	Estructura molecular de la quinina (Fuente propia; (Carey Giuliano, 2014)) .	12
2.	Biosíntesis de la quinina. (Dewick, 2009)	13
3.	Reacción para la preparación del reactivo de Mayer (Fuente propia; (Evans, 2009))	15
4.	Formación del complejo al reaccionar la quinina con el reactivo de Mayer (Fuente propia; (Evans, 2009))	15
5.	Secuencia de reacciones para la preparación del reactivo de Dragendorff (Fuente propia; (Evans, 2009))	16
6.	: Formación del complejo al reaccionar la quinina con el reactivo de Dragendorff (Fuente propia; (Evans, 2009))	16
7.	Reacción para la preparación del reactivo de Wagner (Fuente propia; (Evans, 2009))	17
8.	Formación del complejo al reaccionar la quinina con el reactivo de Wagner (Fuente propia; (Evans, 2009))	17
9.	Placa cromatográfica de referencia para los extractos de quinina (Wagner Bladt, 2001)	18
10.	Cromatograma de los alcaloides de la Cinchona usando LiChrosorb RP-8 Select B columna. (McCalley, 1990)	24
11.	Recuperaciones de alcaloides clavados en la corteza de <i>Cinchona calisaya</i> . (McCalley, 1990)	25
12.	Espectro UV completo de la quinina. (Misra et al., 2008)	28
13.	Cromatograma de la separación de la quinina. (Misra et al., 2008)	29
14.	Espectro de masas de la quinina aislada de los tallos de <i>Cinchona pubescens</i> . (Cuyubamba et al., 2009)	32
15.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de la quinina aislada de los tallos de <i>Cinchona pubescens</i> . (Cuyubamba et al., 2009)	33
16.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de la quinina aislada de los tallos de <i>Cinchona pubescens</i> . (Cuyubamba et al., 2009)	34
17.	Espectro 2D ¹ H- ¹ H COSY (400 MHz) de la quinina aislada de los tallos de <i>Cinchona pubescens</i> . (Cuyubamba et al., 2009)	35
18.	Perfil cromatográfico del extracto de hexano con un tiempo de retención para la quinina de t_R 8.863 min. (Mesa et al., 2013)	38

19.	Cromatograma de la corteza de <i>Cinchona</i> . (Holmfred et al., 2017)	40
20.	Diagrama del sistema soxhlet (Pavia et al., 2011)	41
21.	Diagrama de flujo del procedimiento propuesto	43

LISTA DE CUADROS

1.	Fármacos antipalúdicos: dosis, pauta y presentación (García López Hortelano et al., 2013)	10
2.	Evaluación de diferentes solventes para la extracción soxhlet de corteza de <i>Cinchona</i> . Todos los resultados están dados como porcentajes de corteza, masa seca. (McCalley, 1990)	25
3.	Actividad antimalárica de los extractos de plantas contra <i>P. falciparum</i> (Dd2) in vitro. (do Céu de Madureira et al., 2002)	27
4.	Extracto de la tabla 1: Optimización de condiciones y solventes de extracción. (Misra et al., 2008)	30
5.	Contenido de quinina en los extractos y su actividad antiplasmodial y citotóxica. (Mesa et al., 2013)	37
6.	Factores de retención, k , de los 4 alcaloides de la <i>Cinchona</i> como función de pH y el modificador orgánico en la fase móvil. (Holmfred et al., 2017)	39

RESUMEN

Descubierta en siglo XVII, siendo parte de los descubrimientos más importantes de la época, la quinina es un alcaloide que se encuentra en la corteza del árbol Cinchona y su importancia para la industria farmacéutica y alimenticia la ha llevado a ser uno de los alcaloides de interés con más de 200 años de estudios alrededor del mundo. Entre sus roles más importantes de la actualidad, la quinina es uno de los componentes en los fármacos más importantes para el tratamiento de la malaria. (Achan et al., 2011; OMS, 1996; Willcox Bodeker, 2004)

La importancia de la quinina no es solo en el ámbito médico, también ha presentado aplicaciones en la industria de alimentos y bebidas por su sabor amargo. La obtención de la quinina se ha estudiado por más de 200 años y los procesos ha sido exitosos en lo que es la extracción de esta misma. Varios científicos han tratado de sintetizar la quinina y pocos han tenido éxito ya que su estructura presenta un sitio esteroespecífico, el cuál muy pocos han podido sintetizar con éxito (Stork et al., 2001). Aunque si es posible sintetizar la quinina, se prefiere realizar una extracción porque es más viable y presenta mejores resultados.

Para ello se llevó a cabo una revisión histórica con el fin de proponer una metodología efectiva que pueda ser empleada en próximos estudios. Se concluyó que la quinina es uno de los alcaloides con estudios científicos con 200 años de antigüedad por su relevancia en el ámbito de la medicina e industria. A su vez, la metodología para su extracción todavía no ha sido perfeccionada y se siguen buscando nuevas alternativas que prometan mejores resultados.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria ocasionada por los microorganismos protistas del género *Plasmodium* el cuál ingresa al cuerpo del hospedero a través de la picadura de un mosquito. Esta enfermedad se caracteriza por una serie de síntomas como cefalea, náuseas, fiebres, vómitos y dolores musculares que se diferencian en la gravedad de estos dependiendo de la especie de *Plasmodium*. Los tratamientos para la malaria consisten en una serie de fármacos que son administrados al paciente para tratar los síntomas y eliminar al parásito simultáneamente. (García López Hortelano et al., 2013)

Entre los fármacos utilizados uno de los componentes utilizados es la quinina, cuya importancia cae en ser una de las medicinas efectivas ya que el parásito no ha generado algún tipo de resistencia a este y permite actuar como un medicamento complementario a otros sin tener problemas para mezclar varios fármacos durante el tratamiento del paciente (OPS, 2010).

La quinina es un alcaloide encontrado en la corteza del árbol *Cinchona* descubierto en el siglo XVII y sus aplicaciones en la industria han llevado a estudiosos a realizar diferentes extracciones, técnicas de análisis variadas y se han apoyado en equipos para identificar y aislar a la quinina de con la quinidina, cinchonina y cinchonidina (Achan et al., 2011). Este trabajo busca recopilar información sobre las diferentes metodologías en la extracción de quinina empleadas a lo largo de la historia para proponer una metodología experimental que sea efectiva y viable para la industria en Guatemala.

JUSTIFICACIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria tropical transmitido por los mosquitos del género *Anopheles*. Estos microorganismos protistas del género *Plasmodium* son los encargados o culpables de transmitir esta enfermedad. En Guatemala se encuentra en un proceso de suprimir la malaria, por lo que se han intensificado los esfuerzos en los diferentes niveles de atención en el departamento de Izabal, donde hay más incidencia (Chávez, E., 2017).

La quinina es un alcaloide dentro de la corteza del árbol de quina, el cual presenta propiedades contra la malaria debido a que es un agente antipalúdico (Achan et al. 2011). Son pocas las empresas dedicadas al cultivo de la quina en Guatemala (Ariscona, 2013). La necesidad de optimizar el proceso de la extracción ha llevado a buscar métodos más rápidos y efectivos. Por otro lado, los métodos también deben lidiar con la separación de los 4 alcaloides de la quina y la extracción y purificación de la quinina específicamente <https://www.overleaf.com/project/5ed692c3ee73ca000149560e> (Achan et al. 2011). La posibilidad de recuperación de la muestra -quinina- por medio de la recristalización, presenta beneficios para un método alternativo ante la optimización de este alcaloide.

Guatemala no posee una industria o fábrica donde se pueda trabajar con la *cinchona* por lo que se prefiere exportar la materia prima -la madera del árbol- hacia el extranjero a un costo bajo para que sea tratada, se producen los medicamentos y luego son vendidos a precios mayores a los costos de producción. Este trabajo busca determinar si es posible extraer la quinina para luego poder industrializar el proceso y exportar el extracto en lugar de la materia prima.

3.1. OBJETIVO GENERAL

Recopilar información sobre las diferentes metodologías en la extracción de quinina empleadas a lo largo de la historia para proponer una metodología experimental.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Proponer un método de extracción efectivo para el alcaloide quinina de la corteza de *Cinchona* y purificación como sulfato de quinina.

4.1. MALARIA

La malaria es una enfermedad parasitaria portada por los microorganismos del género *Plasmodium*. Este microorganismo se encuentra dentro de la especie de mosquitos del género *Anopheles*, encontrados en mayor concentración dentro de zonas tropicales debido a la humedad, temperatura y la disponibilidad. Para que un ser humano sea infectado, un mosquito hembra debe alimentarse de la sangre al introducir la probóscide e intercambia su saliva infectada por el *Plasmodium*, por sangre (Spencer et al., 2016). Es una enfermedad endémica en América Central y del Sur, Caribe, África, Sudeste asiático, Medio Oriente y en el Pacífico Sur. (García López Hortelano et al., 2013)

Existen 5 especies del *Plasmodium* (P.) causantes de la malaria en los humanos y cada uno afecta el cuerpo de manera diferente. Las especies son: *P. ovale* y *P. vivax*, pueden originar formas latentes en el hígado, presenta fiebres e hiperesplenismo, aunque los episodios más graves son causados por *P. vivax*; *P. malariae*, puede originar episodios de febriles años más tarde de haber contraído la infección y tiende a asociarse con un síndrome nefrótico, puede originar parasitemia asintomática crónica; *P. falciparum*, esta es la causante de complicaciones clínicas y la muerte del hospedero y, por último, *P. kwonlesi* recientemente descubierta en primates, pero se han documentados casos de infección en Malasia y Borneo, presenta síntomas similares al *P. falciparum* con mayor mortalidad y desencadenar insuficiencia hepatorenal severa (Spencer et al., 2016) (García López Hortelano et al., 2013). Otra diferencia presente en las diferentes especies es el tiempo de incubación ya que puede variar entre las especies. Para *P. ovale* y *vivax* son 14 días, *P. malariae* 18-40 días, *P. falciparum* 10-12 días y para *P. kwonlesi* 11 días, aproximadamente. (García López Hortelano et al., 2013)

4.1.1. SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO

Entre los síntomas probablemente iniciales que presenta esta enfermedad se encuentran cefalea, náuseas, vómitos y dolores musculares, aunque no hay un patrón entre ellos ni un orden en aparición. Posteriormente los síntomas se llegan a complicar ya que aparece una crisis con fiebres mayores a los 39 °C, escalofríos, problemas digestivos y/o respiratorios. Físicamente, al hacer un examen físico la persona con malaria tendría un tono pálido en la piel y mucosidades, esplenomegalia y, en ocasiones, hepatomegalia. (García López Hortelano et al., 2013). Claro que estos síntomas pueden variar en personas que vivan en un área endémica del mosquito, ya que se consideran semi-inmunes, y quienes son turistas en el área. En caso de haber un niño semi-inmune, es posible que no presente fiebres elevadas pero los demás síntomas sí. (García López Hortelano et al., 2013).

Para tener un diagnóstico completo y confirmar que los síntomas corresponden a la malaria, es necesario la realización de uno o varios exámenes clínicos. La malaria se suele sobre diagnosticar sobre a la base exclusiva de los síntomas, generalmente en zonas endémicas, debido a la falta de especificidad de los primeros síntomas (OMS, 2011). El diagnóstico de esta enfermedad se basa en demostrar la forma asexuada del parásito en la sangre periférica. Algunas de las técnicas que se utilizan son:

1. Frotis de sangre con tinción Giemsa

a) Consiste en tomar de muestra una gota de sangre gruesa, que contenga por lo menos 100-1,000 glóbulos rojos. Expresa el porcentaje en función de los eritrocitos parasitados por cada 100 eritrocitos sanos, (eritrocitos parasitados / 100 eritrocitos sanos). Es útil como diagnóstico etiológico y para llevar el seguimiento de la respuesta del tratamiento. Uno de los problemas de la técnica es que no es específica o determina la especie parásita de la muestra (García López Hortelano et al., 2013). También puede tomar una extensión de sangre hemolizada en función de los leucocitos de la muestra; debe contener por lo menos 100. Los resultados se expresan en parásitos/microlitros (número de parásitos/leucocitos = 100). Esta técnica permite determinar la especie parásita y el seguimiento de la enfermedad en el paciente. (García López Hortelano et al., 2013)

2. Técnicas inmunocromatográficas

a) Consiste en test rápidos para la determinación de antígenos del parásito en la sangre. Estos presentan una sensibilidad moderada y alta especificidad para *P. falciparum* y *P. vivax*, pero son propensos a presentar falsos negativos y no se puede cuantificar el grado de parasitación en el paciente. (García López Hortelano et al., 2013)

3. Detección genómica del parásito en la sangre por PCR

a) Esta técnica permite determinar parasitemias submicroscópicas con alta sensibilidad y especificidad. Es uno de los exámenes que permite determinar si hay parasitemias mixtas. (García López Hortelano et al., 2013)

Es importante que los pacientes sean diagnosticados ya que en la etapa inicial es menor la concentración de parásitos y facilita la recuperación del paciente. Sin embargo, si el

tratamiento consiste en medicamentos ineficaces o se retrasa, en el caso de una infección por *P. falciparum*, la enfermedad se propagarse y puede causar complicaciones más graves en la salud del hospedero. Una malaria grave puede identificarse con los siguientes signos: coma, acidosis metabólica, anemia grave, hipoglucemia, insuficiencia renal aguda o edema pulmonar agudo. Si estos se presentan estos síntomas y no se tratan, el infectado puede llegar a morir. (OMS, 2011)

4.1.2. MALARIA EN GUATEMALA

En Guatemala, la incidencia de malaria es más alta entre los meses de noviembre a marzo por ser meses con temperaturas bajas. El agente que más casos se le atribuyeron fue al *Plasmodium vivax*, cuyos síntomas consistían en fiebre intermitente, sudoración y escalofríos. En el 2016, las incidencias del primer trimestre disminuyeron en un 48 %, siendo los departamentos con mayor número de casos Izabal, Suchitepéquez y Escuintla. (Vásquez, 2017)

Toda la población corre riesgo de contraer la enfermedad, aunque hay unos más en riesgo que otros. Para principios del 2017, el grupo que más incidencia presentaron fueron mujeres menos de 1 año a mayores de 64 años con el 52% de casos reportados, 755 casos de 1,449. De los 755 casos de mujeres infectadas, el 25.56 % de las incidencias fueron en mujeres de 25 a 39 años y el 16.55 % en mujeres de 15 a 19 años. El 47.89 % de los 1,449 casos reportados corresponden al sexo masculino con 694 casos. De estos casos, el 24.78 % corresponde a hombres de 25 a 39 años y el 16.85 % de los casos en hombre de 15 a 19 años. (Vásquez, 2017)

4.2. TRATAMIENTOS FARMACÉUTICOS

Después de realizar un diagnóstico se puede encontrar un tratamiento adecuado a las necesidades del paciente. En el caso de una malaria sin complicaciones, la cura se define como la eliminación del parásito para prevenir la propagación agresiva y la morbilidad. Si se trata de una malaria grave, el objetivo principal es evitar la muerte del infectado, la prevención de la recrudescencia y efectos adversos (OMS, 2011). A continuación, se muestra un cuadro con los fármacos más empleados para tratar la quinina.

Cada medicamento no corresponde a un tipo de especie de *Plasmodium* específico, pero si para contrarrestar los efectos de algunos. No se recomienda la automedicación ya que si hay un riesgo grave si es tratada incorrectamente que presenta complicaciones en la salud y monetariamente es más costoso. En casos de una infección por parte de *P. falciparum*, por ser la más peligrosa para los humanos, es necesario internar al infectado en un hospital lo más pronto posible. (OPS, 2010)

<i>Fármaco y nombre comercial</i>	<i>Dosis máxima</i>	<i>Presentación</i>	<i>Accesibilidad</i>
<i>Artemeterlumefantrina</i> (Coartem®), <i>Riamet</i> ®)	4 comp ¹ ./dosis 24 comprimidos	Comprimidos, 20 mg artemeter y 120 mg de lumefantrina	Extranjero
<i>Atrovaquonaproguanil</i> (Malorone®), <i>Malorone pediátrico</i> ®)	4 comp./día juntos en una toma	Comp. Pediátrico: 62.5 mg atovaquone y 100 mg proguanil	Indicación legal establecida En farmacia
<i>Clindamicina</i> (<i>Dalacin</i> ®), <i>EFG</i>)	VO 1.8 g/día	Cápsulas 150 mg y 300 mg	
<i>Cloroquina</i> (<i>Resochin</i> ®)	600 mg base por toma Dosis máxima total 1,500 mg de base	Comprimidos 150 mg base, 250 mg sal	Indicación legal establecida
<i>Doxiciclina</i> (<i>Proderma</i> ®), <i>EFG</i>)	200 mg/día	Cápsulas de 100 mg	Medicamento extranjero
<i>Glucontao de quinina</i> (<i>Quinimax</i> ®)	600 mg/8 h, 1,800 mg/día	Ampolla 50 mg/ 2 mL	Medicamento extranjero
<i>Mefloquina</i> (<i>Lariam</i> ®)	Dosis total de 1,500 mg	Comprimidos 250 mg	Medicamento extranjero
<i>Primaquina</i> (<i>Primaquina</i> ®)	30 mg base/día, por 14 días	Comprimidos de 7.5 mg	Medicamento extranjero
<i>Sulfato de quinina</i> (<i>Quinine sulphate</i> ®)	600 mg/8h	Comprimidos de 300 mg	Medicamento extranjero

Cuadro 1: Fármacos antipalúdicos: dosis, pauta y presentación (García López Hortelano et al., 2013)

4.2.1. RESISTENCIA DEL PARÁSITO

“La resistencia a los antimaláricos se define como la capacidad de los parásitos para sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de las administración y absorción de un medicamento dado en dosis iguales o más altas que aquellas usualmente recomendadas y toleradas por el paciente” (OPS, 2010). Este es un proceso natural que los parásitos tienen para poder sobrevivir más tiempo, pero esta habilidad no permite que el hospedero mejore su salud y trae repercusiones más severas. Estudios recientes han demostrado que el *P. falciparum* ha desarrollado resistencia a casi todos los antimaláricos que se usan actualmente. Entre ellos tenemos la amodiaquina, cloroquina, mefloquina, quinina y sulfadoxina-pirimetamina con excepción a los derivados de las artemisininas (OPS, 2010). Las demás especies todavía pueden ser tratadas con algunos de los fármacos actuales, pero, cada una de las especies han desarrollado un nivel de resistencia a varios medicamentos. (OPS, 2010)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura que la resistencia a los antimaláricos se puede prevenir o disminuir más despacio si se toma una combinación de los diferentes medicamentos que posean diferentes mecanismos de acción y dosis específicas de dichos fármacos. Con esta combinación, se espera que el parásito no pueda generar resistencia a ambos medicamentos simultáneamente, por lo que se espera ganar tiempo y disminuir la concentración de parásitos mientras estos resisten uno de los medicamentos (OPS, 2010). Entre los diferentes medicamentos, se aconseja mezclar algún medicamento con uno que contenga, en su presentación, quinina.

¹Comp. Significa comprimidos. El tipo de forma que presenta la pastilla del medicamento.

4.2.2. MEDICAMENTOS CON QUININA

En el Cuadro 1, se mencionaron 2 medicamentos que contienen quinina, el Gluconato de quinina (Quinimax®) y el Sulfato de quinina (Quinine sulphate®). Estos medicamentos pueden mezclarse con Clindamicina o Doxiciclina en un tratamiento de 7 días para poder realizar pruebas de seguimiento con mejores resultados. El problema de tomar medicamentos mixtos es que el paciente puede sufrir alguna reacción que evite la actividad de ambos medicamentos. (OPS, 2010)

Estos medicamentos se han utilizado para tratar la malaria no complicada del *P. vivax* y *P. falciparum*. Es muy efectiva para ser tomada por embarazadas en todos los trimestres sin complicaciones graves si es una infección por *P. falciparum*. También se recomienda el uso de quinina para el tratamiento de menores de 2 años y la dosis cambia si se hace una mezcla de medicamentos o solo se quiere dar la quinina. Aunque la quinina tenga un rol muy importante como antimalárico, se prefiere usar la quinina como una segunda línea ya que puede causar hipotensión si no es administrada adecuadamente (OPS, 2010). Si se quiere tratar una malaria complicada, debe realizar lo más pronto posible y se recomienda usar medicamentos a base de alcaloides como los derivados de la artemisinina y la cinchona (quinina y quinidina).

4.3. ALCALOIDES COMO METABOLITOS SECUNDARIOS

Los medicamentos a base de alcaloides se refieren al uso de los alcaloides presentes en las plantas como metabolitos secundarios. Estos tienen funciones no vitales para el desarrollo porque no participan en los procesos esenciales para está, pero si para su supervivencia. Sus funciones varían dependiendo del alcaloide, entre ellas pueden encontrarse para la defensa hacia depredadores repeler, inhibir el crecimiento o competencia dentro de la especie; atracción de germinadores o polinizadores y protección como la respuesta a un estímulo estresante. (Pomilio, 2012)

Los alcaloides se caracterizan por ser compuestos orgánicos nitrogenados, solubles en agua y ser bioactivos (Pomilio, 2012). La presencia del nitrógeno en su estructura sugiere que una vía sintética a partir de aminoácidos como lisina, tirosina y triptófano. Están conformados por una amina terciaria y anillos heterocíclicos y suelen formar sales solubles en presencia de ácidos minerales (Dewick, 2009). Suelen encontrarse con un pH y en una solución básica ya que están protonados dentro de su medio (Pérez Gonzalez, 2006). Al ser bioactivos en animales, los alcaloides tienen aplicaciones médicas ya que pueden formar una amina cuaternaria al protonarse en el medio fisiológico por el cambio de pH. Algunos ejemplos de alcaloides son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estricnina. (Dewick, 2009)

4.4. QUININA

4.4.1. ORIGEN DE LA QUININA

Los árboles de cinchona son nativos la parte este de los Andes. Pertenecen a la familia Rubiaceae, y sus principales variedades son *Cinchona calisaya*, *C. flava*, *C. succirubra*, *C. condaminea*, *C. pitayensis*, *C. micrantha*, de más de 30 especies conocidas. A pesar de ser originaria de América, fue plantada en grandes cantidades en India, Sri Lanka, Indonesia y Myanmar, con el fin de aumentar la cantidad de quinina producida (Ebadi, 2006). De la corteza de este árbol se extrae en, el aserrín, polvo de quina. Este tiene propiedades como estimulante del apetito, digestivo y otras aplicaciones de interés farmacéutico. Aparte de la quinina, se tiene otros compuestos presentes en la corteza pueden encontrarse varios metabolitos y entre ellos están la quinacimina, quinamina, quinicina, la quinina y la quinidinina (Taylor, 2005).

4.4.2. ESTRUCTURA

La quinina presenta una estructura relativamente compleja. Posee una quinolina como su esqueleto y parte central de la molécula, la cual, contiene dos sustituyentes en la base. El primero forma un enlace de tipo éter y el segundo es un enlace carbono-carbono que conecta con un biciclo, donde uno de los puentes es un nitrógeno. Además, la estructura presenta un único carbono quiral que es la unión de la quinolina con el biciclo. Se conoce como un carbono quiral aquel carbono que posea 4 sustituyentes diferentes. Para este caso, los sustituyentes son: un alcohol primario, un hidrógeno, la quinolina y el biciclo, dando una configurado tetraédrica. (Carey Giuliano, 2014)

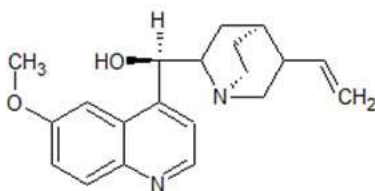


Figura 1: Estructura molecular de la quinina (Fuente propia; (Carey Giuliano, 2014))

4.4.3. BIOSÍNTESIS

La biosíntesis de la quinina comienza a partir de la strictosidina, modificando la molécula para dejar un grupo aldehído, seguido de una hidrólisis y descarboxilación produciendo el corynantheal. A ello, le sigue el rompimiento de un enlace C-N, dando la formación de un nuevo grupo aldehído y una ciclación por vía de iminas entre el N y el grupo aldehído previamente formado. Una nueva ruptura de otro enlace C-N, del lado lateral de triptamina, produce la apertura del anillo. Posteriormente, el grupo aldehído producto del rompimiento inicial del enlace C-N reacciona con esta nueva amina creando un heterociclo de seis miembros (cinchonina). Finalmente, se da una isomerización en el carbono 8 de la cinchonina y

una reducción con NADPH del grupo cetona seguido de una metilación da como producto la quinina (Dewick, 2009). Esto se resume en la figura siguiente:

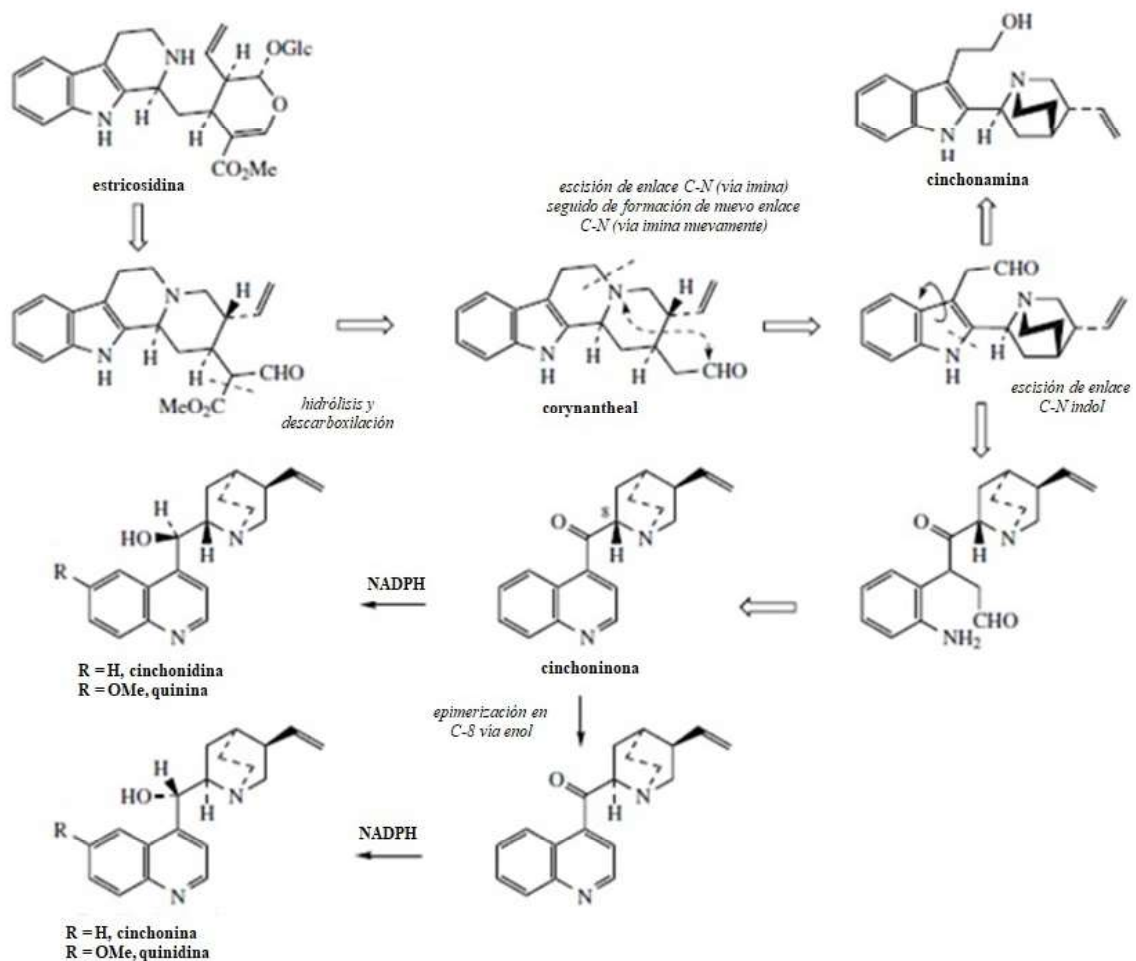


Figura 2: Biosíntesis de la quinina. (Dewick, 2009)

4.4.4. SÍNTESIS DE LA QUININA

A lo largo de 150 años, se han hecho varios intentos para hacer una síntesis total de la quinina. Uno de los obstáculos que impedía su síntesis exitosa fue la estereoselectividad. En 1944, Woodward y Doering proponen una ruta sintética para una muestra racémica de quinina, y luego argumentan que con un procedimiento publicado anteriormente se puede llegar a la quinina, pero no lo intentan. En 2001, Gilbert Stork propuso la primera síntesis estereoselectiva para la quinina y cuestiona la suposición de Woodward y Doering (Stork et al., 2001).

Más adelante, en 2007, se comprueba que el supuesto que utilizaron Woodward y Doering si se cumple, de manera que su ruta propuesta si permite sintetizar quinina estereoselectiva. El problema con ambas propuestas es que son muy complicadas y tienen un costo muy elevado, requieren de 16 y 17 pasos respectivamente (Seeman, 2007). En resumen, se prefiere

la extracción ya que presenta menor cantidad de recursos necesarios para obtener la quinina.

4.4.5. USOS

El descubrimiento de la quinina ha sido catalogado como uno de los descubrimientos médicos más importantes del siglo XVII. Nombrada en ese entonces como la “corteza jesuita” o “corteza sagrada” debido a su uso como tratamiento contra la malaria por misioneros jesuitas en América del Sur a principios de 1600, aunque se cree que la misma era usada por los nativos desde antes como remedio para la fiebre (Achan et al., 2011). Actualmente, la quinina es utilizada, junto al artesunato, como parte de la medicina tradicional para el tratamiento de la malaria (Willcox Bodeker, 2004). Esto se debe a que la quinina es un esquizotocida hemático (afecta la síntesis de proteínas del parásito), actuando así como agente antipalúdico más fuerte que la cloroquina (OMS, 1996).

La quinina, junto con la quinidina, cinchonina y cinchonidina (los cuatro alcaloides de la quina) son compuestos efectivos contra la malaria, y se usaron de esta manera hasta principios de 1920, donde fueron reemplazados por compuestos sintéticos más efectivos. Entre los compuestos sintetizados, el más usado fue la cloroquina, sin embargo, su uso sistemático provocó que el *Plasmodium falciparum*, parásito causante de la malaria, desarrollara resistencia ante la cloroquina a finales de 1950. Por ello, la quinina volvió a ser empleada para el tratamiento de malaria severa. (Achan et al., 2011). Actualmente, se utiliza principalmente para tratar el paludismo falciparum, producido por *Plasmodium falciparum*, en lugares donde el mismo ha desarrollado resistencia a otros medicamentos. (OMS, 1996).

4.4.6. RELACIÓN CON GUATEMALA

Son pocas las empresas dedicadas al cultivo de quina en Guatemala. Las plantaciones de esta se ubican principalmente en San Marcos y la boca costa, ocupando un estimado de 2,500 hectáreas y produciendo entre 700 y 800 toneladas de corteza al año, las cuales son exportadas a Europa y Asia. A pesar de ello, Guatemala representa aproximadamente un 10% de la producción nacional de corteza de quina. Por ello, con el fin de aumentar la producción nacional de quina, han surgido esfuerzos para implementar el cultivo de quina en los caficultores. Se espera que la quina sirva como fuente de ingresos alternativa al café, con lo cual la economía nacional no dependa de un solo producto de exportación. (Asicon, 2013)

Guatemala no posee una industria o fábrica donde se pueda trabajar con la *Cinchona* por lo que se prefiere exportar la materia prima -la madera del árbol- hacia el extranjero a un costo bajo para que sea tratada, se producen los medicamentos y luego son vendidos a precios mayores a los costos de producción.

4.5. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

4.5.1. ANÁLISIS CUALITATIVO

Existen reactivos genéricos para la caracterización de alcaloides mediante la reacción entre un reactivo y el grupo amina para formar un precipitado; en algunos casos también hay un cambio de color. Estas pruebas se conocen como reacciones de precipitación y son una combinación de metales pesados con alcaloides en un medio ácido para formar una amina cuaternaria, la cual se precipitará. Las pruebas colorimétricas son reacciones coloreadas donde se obtiene un resultado positivo cuando hay un cambio de color o un precipitado. (Wagner Bladt, 2001)

Prueba Mayer

La prueba de Mayer es una reacción de caracterización genérica para alcaloides. El fin es que los alcaloides reaccionen con yoduro potásico mercúrico o el reactivo de Mayer ($K_2[HgI_4]$) para formar una sal compleja de color blanco-amarillo. Esta sal puede disolverse en solventes poco polares para facilitar la identificación. La reacción comienza con la mezcla de cloruro de mercurio con yoduro de potasio para obtener el reactivo de Mayer. Este reacciona con el grupo amino del alcaloide para formar una amina cuaternaria que se manifestará como un precipitado colorido. (Wagner Bladt, 2001) (Evans, 2009)

La preparación del reactivo consiste en disolver 1.36 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua en un matraz de 125 mL. En un segundo matraz de 125 mL disolver 5 g de yoduro de potasio usando menos de 40 mL de agua. Las soluciones se en un balón de fondo plano y aforar a 100 mL con agua destilada. Para emplearlo como prueba cualitativa, la muestra debe tratarse con ácido sulfúrico $-H_2SO_4-$ o ácido clorhídrico $-HCl-$. Luego se toma una alícuota de 1 a 5 mL de la muestra en un tubo de ensayo. Después se agrega gota a gota el reactivo a la muestra. El resultado positivo estará dado por un precipitado blanco o color crema, soluble en ácido acético y metanol. (Evans, 2009)



Figura 3: Reacción para la preparación del reactivo de Mayer (Fuente propia; (Evans, 2009))

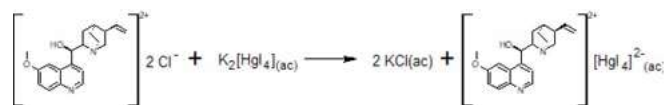


Figura 4: Formación del complejo al reaccionar la quinina con el reactivo de Mayer (Fuente propia; (Evans, 2009))

Prueba Dragendorff

La prueba de Dragendorff es la combinación de nitrato de bismuto pentahidratado y yoduro de potasio para formar el reactivo de Dragendorff (KBiI_4). Este reaccionara con el grupo amino para formar un precipitado de color naranja-rojizo. (Wagner Bladt, 2001) (Evans, 2009)

Su preparación consiste en disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico al 30% (v/v) en un matraz. Usando un segundo matraz, disolver 27.2 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua destilada. Se agrega la primera solución al segundo matraz para mezclarlas. Dejar en reposo por 24 horas. Se decanta la solución y colocar el residuo acuoso en un balón de fondo plano para aforar a 100 mL con agua destilada. Para emplearlo como prueba cualitativa, primero debe tratarse la muestra con H_2SO_4 o HCl . Se toma una alícuota entre 1 y 5 mL de la muestra en un tubo de ensayo. Luego se agrega gota a gota el reactivo a la muestra. El resultado positivo está dado por la formación de un precipitado naranja rojizo. (Evans, 2009)

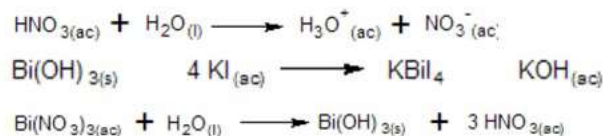


Figura 5: Secuencia de reacciones para la preparación del reactivo de Dragendorff (Fuente propia; (Evans, 2009))

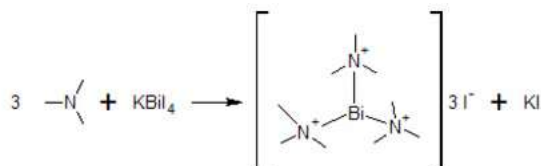


Figura 6: : Formación del complejo al reaccionar la quinina con el reactivo de Dragendorff (Fuente propia; (Evans, 2009))

Prueba Wagner

Esta prueba consiste en la reacción de color y precipitado donde una mezcla de yoduro de potasio con yodo para formar el reactivo de Wagner (I-KI). Al reaccionar con los alcaloides se obtiene un complejo de color marrón, el cual se precipitará. (Wagner Bladt, 2001) (Evans, 2009)

Para preparar este reactivo, se deben disolver 1.27 g de yodo re sublimado y 2 gotas de yoduro de potasio en 20 mL de agua en un balón de fondo plano de 100 mL y se afora con agua destilada. Para emplearlo como prueba, la muestra debe tratarse con H_2SO_4 o HCl antes. Se toma una alícuota entre 1 y 5 mL de la muestra y es colocada en un tubo de ensayo. Luego, agregar gota a gota el reactivo sobre la muestra. Se considera un resultado

positivo si aparece un precipitado marrón. (Evans, 2009)

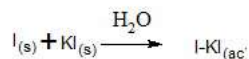


Figura 7: Reacción para la preparación del reactivo de Wagner (Fuente propia; (Evans, 2009))

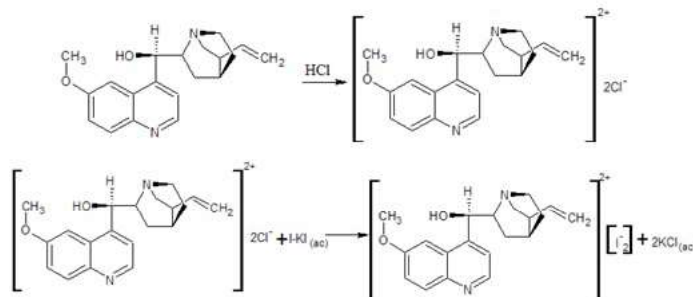


Figura 8: Formación del complejo al reaccionar la quinina con el reactivo de Wagner (Fuente propia; (Evans, 2009))

4.5.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en que los átomos o moléculas son excitados por absorción de radiación electromagnética. Al contrario de la fosforescencia, en fluorescencia las transiciones energéticas no cambian el spin del electrón excitado, provocando así que los estados excitados de fluorescencia presenten una vida media corta, en el orden de 10^{-5} s. Si bien la longitud de onda de emisión puede ser la misma que la de absorción (fluorescencia de resonancia), lo común es que la longitud de onda de emisión sea mayor a la de absorción, desplazamiento denominado como desplazamiento de Stokes (D. A. Skoog et al., 2015).

Para realizar una prueba por fluorescencia para la identificación o determinación de una sustancia de interés dentro de una matriz, se comienza a trabajar con una curva de calibración. Para ello se deben preparar soluciones estándares con diferentes concentraciones conocidas y trabajar el solvente como el blanco. Paralelamente, se debe obtener la longitud de onda de emisión máxima. Se puede tomar la investigación de Zieschang y compañía del 2015 como referencia para este procedimiento. (D. A. Skoog et al., 2015; Zieschang et al., 2015)

Cromatografía por capa fina de alta resolución, HPTLC

La cromatografía en capa fina o TLC por sus siglas en inglés es un método para la separación e identificación de matrices presentes en la muestra deseada. Esta se compone de dos fases las cuales varían dependiendo de la matriz de interés. Las fases son fase estacionaria

y fase móvil. Estas consisten en una mezcla de diluyentes y solventes capaces de separar los compuestos de la muestra. El análisis consiste en aplicar una pequeña porción de la muestra en la fase estacionaria en una cromatoplaaca y colocar una marca del lado contrario de la cromatoplaaca para definir el frente del solvente. Paralelamente, se toma un a caja de vidrio donde se prepara la fase móvil. Luego se coloca la cromatoplaaca verticalmente dentro de la caja de vidrio para que la fase móvil toque una pequeña parte de la cromatoplaaca. (Douglas A. Skoog et al., 2007)

Se debe esperar un tiempo, hasta que la fase móvil, por capilaridad, alcance el frente de solvente. Esto se hace para que el componente de interés de la muestra no se salga de la cromatoplaaca. Al terminar la placa debe secarse para eliminar el exceso de solvente y poder determinar el factor de retardo, R_f , del componente. Este sirve para identificar cuánto recorrió la sustancia de interés. Este factor es específico para cada sustancia y puede variar si se cambian los solventes. Para la quinina, se puede tomar como referencia un R_f entre 0.1 - 0.5 y la siguiente figura.

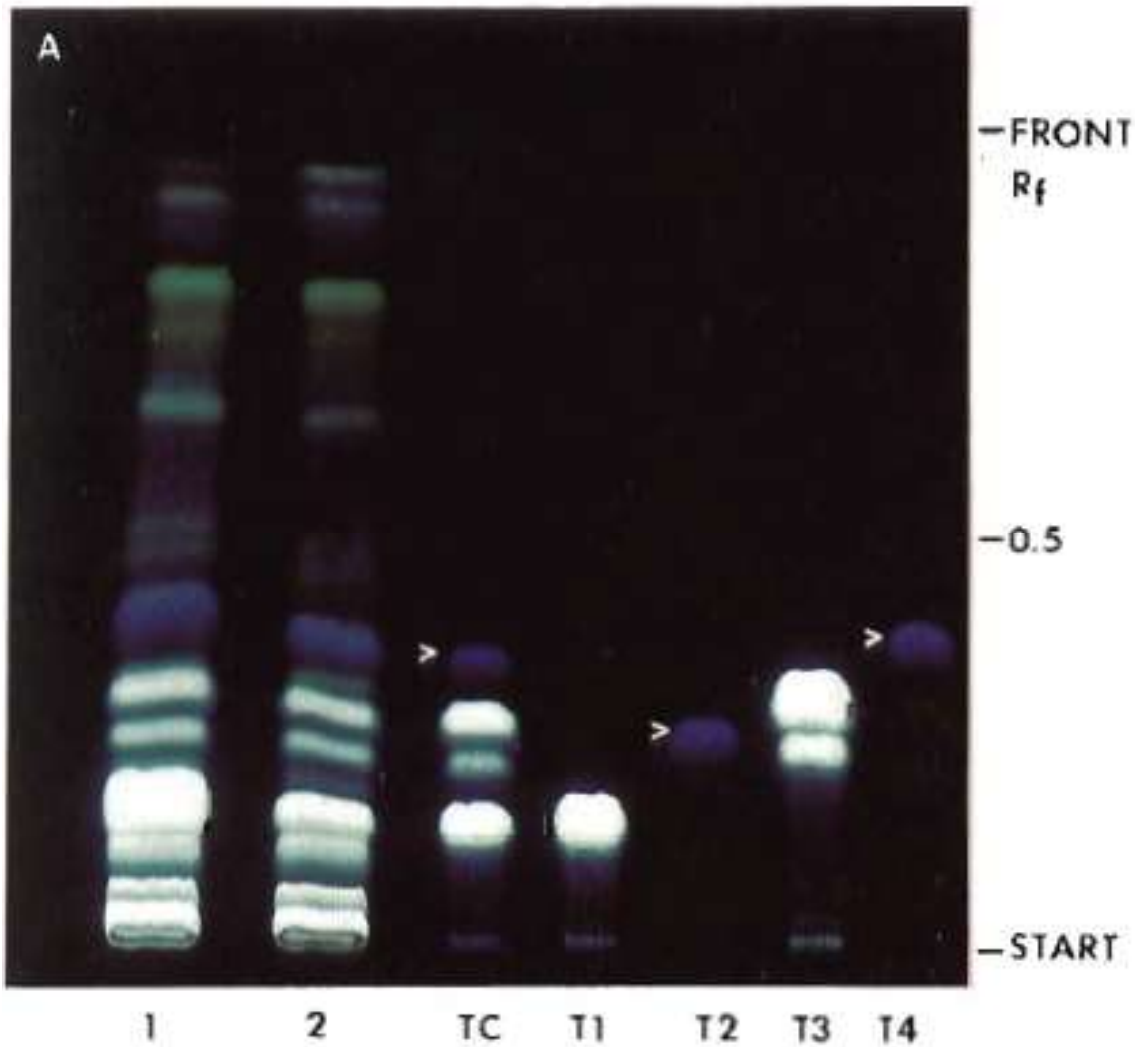


Figura 9: Placa cromatográfica de referencia para los extractos de quinina (Wagner Blatt, 2001)

En este caso, se estaban comparando las muestras *Cinchona calisaya* (1) y *Cinchona succirubra* (2) con los compuestos TC, T1, T2, T3 y T4 siendo estos una mezcla de alcaloides de la quina, quinina, cinchonidina, quinidina y cinchonina. Todos los metabolitos fueron extraídos con metanol, su fase móvil fue cloroformo:dietilamina (90:10) y detectados usando 10 % etanol y ácido sulfúrico a 365 nm del espectro visible. (Wagner Blatt, 2001)

REVISIÓN HISTORIA DE LAS METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA EXTRACCIÓN DEL ALCALOIDE QUININA

Luego de su descubrimiento y primeros estudios, el alcaloide de la quinina ha estado bajo el interés de diferentes científicos investigadores por las diferentes aplicaciones que esta posee en las industrias químicas, farmacéuticas, bioquímicas, médicas y en alimentos. Es curioso que desde 1820 este alcaloide siga teniendo gran impacto e interés hoy en día.

5.1. 1820: JOSEPH PELLETIER Y JOSEPH CAVENTOU

El primer gran estudio que presentó la quinina fue en 1820 por Joseph Pelletier y Joseph Caventou con su investigación “*ANALYSE CHIMIQUE DES QUINQUINA*” donde se mencionan los primeros estudios, metodologías de extracción y cristalización para la quinina y la cinchonina. La metodología que usaron es general para los alcaloides donde la materia prima fue pulverizada, se usaron alcoholes como solventes para extraer el alcaloide. El estudio confirmó que la quinina puede ser extraída y purificada como cristal. Sin embargo, esta no puede cristalizarse por su mismo por lo que es necesario realizar un tratamiento con ácido para que cristalice como una sal. Además de analizar varias de las especies de cinchona conocidas también fueron los pioneros en tratar la quinina para obtenerla en su forma cristalina usando diferentes solventes en el proceso. Los más utilizados fueron H_2SO_4 y HCl ; siendo este último de gran interés para este estudio. (Delépine, 1951; Pellentier Caventou, 1821)

5.2. 1889: GEORGE WATT

Luego del trabajo de Pelletier y Caventou con la extracción, la India presentó un gran interés en las aplicaciones de este alcaloide por lo que decidieron traer muestra de América para distribuirla en Europa. En 1889 se publicó un libro donde mencionan una de las primeras metodologías específicas y a gran escala para la quinina. Esta metodología fue usada a nivel industrial para poder aprovechar al máximo sus propiedades. Dicha extracción consiste en el tratamiento de la materia prima, la extracción y el tratamiento de la muestra para obtener como su producto final el sulfato de quinina. Al ser un procedimiento a gran escala de casi 200 años, solo se mencionan las partes utilizadas y no mencionan la maquinaria de la época. («Manufacture of Quinine in India», 1890; Watt, 1889)

La metodología puede separarse en 4 etapas: obtención de materia prima, tratamiento de materia prima, extracción líquido-líquido con aceite y solución ácida y, por último, aislamiento y cristalización de la quinina. En el libro hay una sección dedicada a la plantación y cosecha de las diferentes especies de cinchona plantados en India para facilitar el traslado de la materia prima a la fábrica. Esto es lo que se consideraría como la primera etapa de la extracción de la quinina. La segunda etapa, comienza secando y triturando la corteza del árbol para obtener un polvo fino donde se puede aumentar el área de contacto con el solvente y lograr procesar la mayor cantidad de alcaloide. (Watt, 1889)

La tercera etapa consiste en los tratamientos químicos de la materia prima para la extracción de la quinina. Se comienza agregando 8 partes de soda cáustica por cada 100 del polvo junto a 500 partes de agua mezclándolas para formar una pasta. Esto se realiza para destrozarse la celulosa presente en la corteza y empezar la extracción. Al tener la muestra se agrega 600 partes de una mezcla de aceites con una proporción de 4 partes de aceite de keroseno con 1 parte de aceite de fusel y se agitan por 4 horas dentro de un recipiente de agitación. Luego se deja reposar la muestra para separar el aceite del agua para quitar la soda cáustica de la muestra y dejar únicamente el aceite con el alcaloide de interés. Después de que se hayan separado completamente estos líquidos, se traspasa únicamente el aceite a un segundo recipiente de agitación junto a una solución de ácido por un tiempo de 5 y 10 minutos. Esto hará que la quinina pase a la fase acuosa para aislar completamente este metabolito y dar paso a una purificación por cristalización. (George Watt, 1889; «Manufacture of Quinine in India», 1890)

La última etapa abarca lo que es la cristalización del producto final, siendo el sulfato de quinina para ellos el principal, pero mencionan que el ácido puede ser cambiado a conveniencia del interesado. A la solución ácida previamente, separada del aceite, se calienta para eliminar un poco del exceso de agua en caso de tener una gran cantidad de agua en la solución inicial. A esta solución se le agrega poco a poco una solución básica con el fin de neutralizar el pH usando soda cáustica o una sal de amonio la cual no debe estar saturada para facilitar la lectura en el cambio del pH. Luego de ajustar el pH, se deja enfriar a temperatura ambiente y se espera a que los cristales se formen. Para aislar los cristales, se filtra la solución y se dejan secar. Estos son pesados y se disuelven en una cantidad de agua hirviendo que sea 150 veces el peso de los cristales junto a carbón activado para eliminar la mayor cantidad de impurezas que pudieron quedar atrapadas en los cristales. Para terminar el proceso, se realiza una filtración mientras la solución permanece caliente y se deja enfriar para que los cristales se formen nuevamente. (George Watt, 1889; «Manufacture of Quinine

in India», 1890)

“Al comparar este proceso de extracción con otros que se han probado en la India, las principales ventajas que presenta parecen ser-(1) que los alcaloides se extraen completamente de la corteza en un estado de pureza mucho mayor, que las operaciones finales para obtener los productos terminados y puros se simplifican mucho; (2) que todo el proceso de extracción se puede realizar a temperaturas ambientales; (3) que los aparatos y electrodomésticos requeridos son todos de carácter simple y, por lo tanto, muy adecuados para su uso en las plantaciones ²” («Manufacture of Quinine in India», 1890). Una de las ventajas de trabajar con el aceite, es que se puede reutilizar de 3 a 4 veces o hasta que el primer tratamiento de la muestra ya no presente resultados positivos para detectar alcaloides. Esto permite realizar el mismo procedimiento y reducir reactivos y tiempos de extracción. Claro que las condiciones que se presentan dependerán de la cantidad de alcaloide que presente la muestra, la durabilidad del aceite, y que los tiempos de reposo no estén muy espaciados para que no ingresen impurezas o el material se degrade o termine su vida útil durante la primera parte del proceso.

5.3. 1990: DAVID V. McCALLEY

En 1990 David V. McCalley publicó un artículo donde buscaba obtener resultados cuantitativos de los alcaloides usando HPLC. McCalley acopló una metodología para la extracción de sus muestras y estándares además de emplear dos pretratamientos, los cuales aseguraban ser mejor que el otro, para comparar si existía una diferencia significativa y determinar el procedimiento más adecuado para la extracción de quinina (McCalley, 1990). Estos procedimientos no habían sido analizados para comprobar su efectividad y reproducibilidad empleando cromatografía líquida de alta resolución o HPLC; por sus siglas en inglés. (McCalley, 2002)

Este estudio estuvo dividido en 2 partes donde la primera consistía en probar si era posible realizar un análisis HPLC de los alcaloides. Esto lo determinó usando *Cinchona calisaya* como material vegetal y su metodología consistió en 3 secciones. La primera fue el tratamiento de las muestras y estándares donde se molieron, tamizaron a 30 mesh y secaron a 80°C hasta que la masa fuera constante. Luego se tomó 1 g de muestra y fue molido con 0.3 gramos de hidróxido de calcio -Ca(OH)₂- y 3 cm³ de hidróxido de sodio -NaOH- al 5%. Se dejó reposar por 0.5 horas y para la validación del método, se mantuvieron las mismas proporciones empleando 100 mg de muestra. La segunda sección consistió en una extracción por soxhlet por 7 horas usando un solvente orgánico. Luego se evaporó el solvente a temperatura ambiente -T°_{amb}- en un cuarto de helio. Se emplearon como solventes orgánico tolueno y metanol, por lo que se realizó el mismo procedimiento para ambos solventes. En el caso de las validaciones, las muestras fueron diluidas en metanol antes de ser analizadas. Y la tercera sección consistió en un análisis por HPLC para caracterizar e identificar los de

²Texto obtenido de («Manufacture of Quinine in India», 1890) traducido textualmente. Texto original: “Comparing this process of extraction with others that have been tried in India, the chief advantages it presents appear to be (1) that the alkaloids are completely extracted from the bark in a much greater state of purity, that the final operations for obtaining pure and finished products are much simplified; (2) that the whole process of extraction can be performed at common temperatures; (3) that the apparatus and appliances required are all of a simple character, and therefore well suited for use on the plantations.”

las muestras y los estándares para los siguientes análisis. (McCalley, 1990)

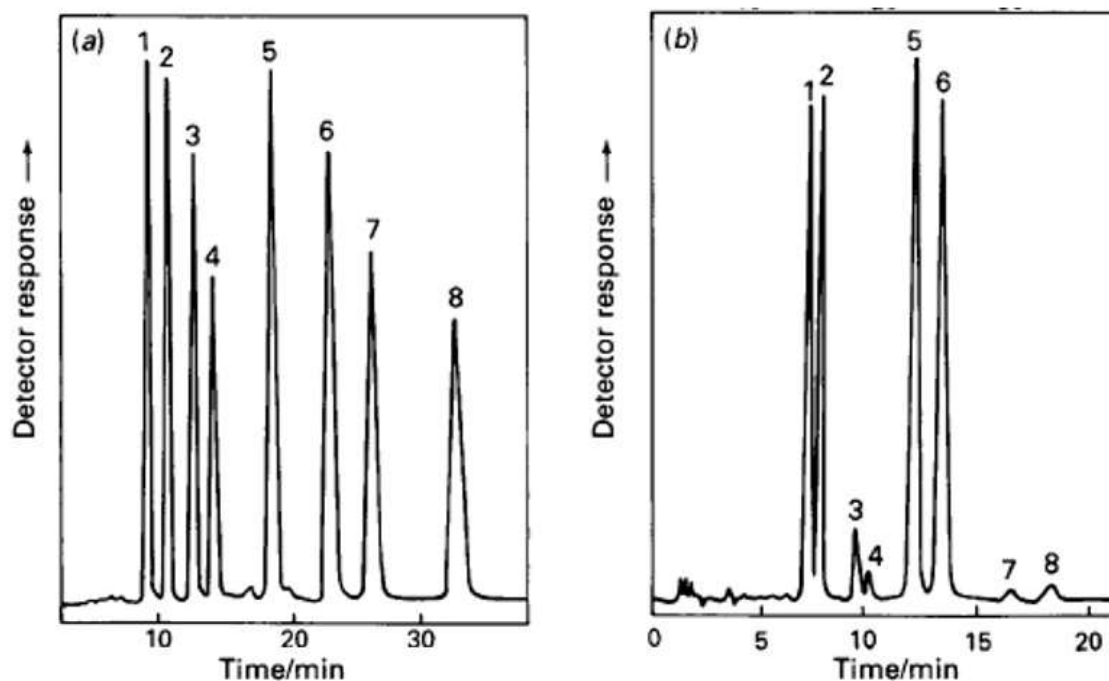


Figura 10: Cromatograma de los alcaloides de la Cinchona usando LiChrosorb RP-8 Select B columna. (McCalley, 1990)

Identidades de los picos: 1 Cn: cinchonina; 2 Cd: cinchonidina; 3 HCn: dihidroxicinchonina; 4 HCd: dihidroxicinchonidina; 5 Qd: quinidina; 6 Qn: quinina; 7 HQd: dihidroxiquinidina; 8 HQn: dihidroxiquinina. Detección a 200 nm, volumen de muestra de 10 μL , tasa de flujo de $1\text{cm}^3\text{min}^{-1}$. (a) Eluyente: acetonitrilo al 8 % en hexilamina 0.05M ajustado a pH 3 con ácido fosfórico H_3PO_4 . (b) Eluyente: acetonitrilo al 15 % en buffer fosfato 0.1M ajustado a pH 3 con ácido fosfórico H_3PO_4 . Aproximadamente 250 ng por estándar. (McCalley, 1990)

Esta parte del experimento busca poder realizar un análisis de los componentes de la corteza para luego, comparar dos pretratamientos en la muestra. En la figura 10, los picos más importantes de destacar son el 1, 2, 5 y 6 los cuales corresponden a la cinchonina, cinchonidina, quinidina y quinina respectivamente. Como se puede ver, en la figura 10(b), se puede ver que se prefiere usar acetonitrilo al 15 % en buffer fosfato 0.1 M porque separa mejor los picos de los metabolitos y poder identificar solamente los alcaloides de interés. (McCalley, 1990)

Al obtener resultados exitosos para los análisis HPLC, McCalley prosiguió con la segunda parte del estudio. La cuál era determinar si había una diferencia entre los dos pretratamientos de la muestra. El primer método se conoce como el método estándar Bruxelles el cual consiste en moler, tamizar y secar la muestra a 110°C para eliminar la mayor cantidad de humedad³ seguido por un tratamiento alcalino con hidróxido de calcio e hidróxido de sodio previo a una extracción por soxhlet usando benceno. El problema de este método es que solo se ha usado para determinar 2 de los 4 alcaloides siendo estos la quinina y cinchonidina (McCalley, 1990, 2002). El segundo método fue propuesto Haznagy, ya que este afirmaba que el método de

³A esa temperatura no se reportó pérdida de alcaloides. (McCalley, 1990)

Bruxelles era poco eficiente (McCalley, 2002). Por esto, el propuso que se debía realizar un tratamiento de la muestra usando una solución de ácido tricloroacético -ATC- en metanol, seguido por una solución de amonio previo a una extracción por soxhlet usando benceno. De esta manera era posible desnaturalizar la celulosa de la muestra para extraer más alcaloides (McCalley, 1990).

Solvente	Cinchona	Cinchonidina	Quinidina	Quinina
Tolueno	<0.02	0.11	<0.02	0.58
TCA - metanol	0.23	1.10	0.15	6.37
Ca(OH) ₂ - NaOH - metanol	0.21	1.09	0.15	6.34
Ca(OH) ₂ - NaOH - tolueno	0.22	1.11	0.16	6.20
Metanol	0.20	1.05	0.13	5.94

Cuadro 2: Evaluación de diferentes solventes para la extracción soxhlet de corteza de *Cinchona*. Todos los resultados están dados como porcentajes de corteza, masa seca. (McCalley, 1990)

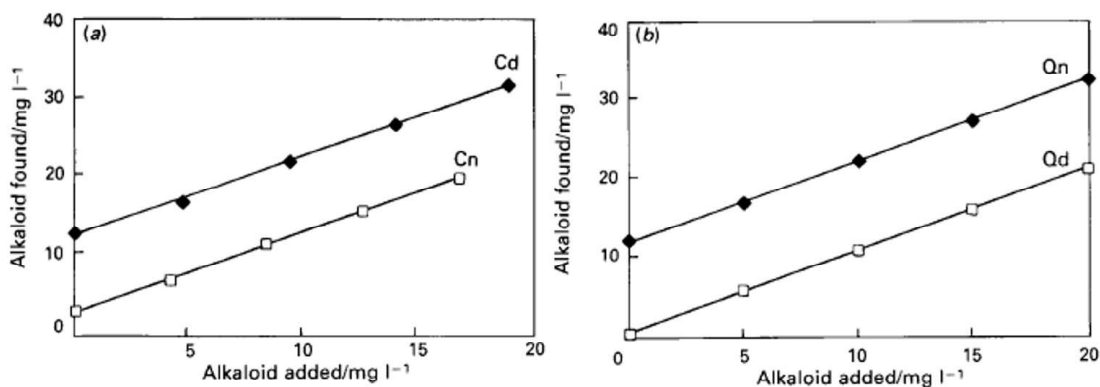


Figura 11: Recuperaciones de alcaloides clavados en la corteza de *Cinchona calisaya*. (McCalley, 1990)

Recuperación de (a) Cn: cinchonina y Cd: cinchonidina; y (b) Qn: quinina y Qd: quinidina. (McCalley, 1990)

Los resultados obtenidos fueron dados para los 4 alcaloides. Estos presentaron ser positivos y la quinina fue quién presento los resultados más altos entre los 4 alcaloides. A su vez, se notó que el tolueno no es un buen solvente para la extracción debido a la diferencia en sus polaridades, siendo este quién obtuvo el resultado más bajo. A su vez, los datos obtenidos para las extracciones con tratamiento previo presentaron ser mejores que usar solo el solvente orgánico. “El método de pretratamiento de Haznagy seguido por una extracción de metanol parecería un procedimiento exhaustivo, sin embargo, los valores de alcaloides no parecían ser más alto”⁴. Para validar los métodos utilizados se trabajó con las muestras de 100 mg en soluciones similares en peso disueltas en metanol. Las curvas de la figura 11, presentaron una media de recuperación de 100 % para la quinina, 101 % cinchonidina y cinchonina y 103 % para la quinidina lo que indicó un desempeño muy favorable para el estudio (McCalley, 1990). Con esto se demostró que un pretratamiento a la muestra puede aumentar la cantidad de alcaloides extraídos junto al metanol como el solvente con mejores

⁴Texto obtenido de (McCalley, 1990) traducido textualmente. Texto original: “The pre-treatment method Haznagy followed by methanol extraction would seem an exhaustive procedure, however, alkaloid values did not appear to be higher.”

resultados. A su vez, se demostró que es posible analizar los alcaloides empleando el método de HPLC. (McCalley, 1990)

5.4. 1991: BETTY MALDONI

En el año 1991 en Argentina, Betty Maldoni publicó un artículo donde explica el procedimiento que se debe llevar para la extracción de alcaloides junto a varias pruebas cualitativas para qué, en el futuro, los investigadores pudieran realizar extracciones empleando equipo de laboratorio. El método propuesto por Maldoni consiste en una serie de tratamientos a la materia prima junto a diferentes análisis para determinar la eficiencia del proceso. (Maldoni, 1991)

La metodología empieza secando el material vegetal a una temperatura menor a 50°C al vacío para luego ser pulverizada y secada otra vez para eliminar la mayor cantidad de agua y humedad de la planta. Luego se colocaron 100 g del polvo junto a 500 mL de éter de petróleo en un sistema soxhlet, el cuál fue calentado entre 60 – 80°C por 8 horas. Con el fin de eliminar carotenoides y lípidos de la planta. El resultante se dejó secar al vacío hasta obtener 100 mL finales. Se tomó una alícuota de 20 mL y fue guardada para pruebas, mientras que los 80 mL restantes fueron colocados en un nuevo sistema soxhlet junto a 500 mL de etanol y se calentó a 50°C por 8 horas. (Maldoni, 1991)

Nuevamente, se evaporó el solvente hasta obtener un volumen final de 50 mL de muestra. Se tomó una alícuota de 20 mL para pruebas de detección de alcaloides. Los 30 mL de restantes de la muestra fueron tratados con 60 mL de HCl para remover los alcaloides básicos como sales. Se dejó reposar por la noche para que se diera una separación de fases. Luego se realizaron dos lavados con 5 mL de agua para eliminar material viscoso. Seguido a los lavados, se ajustó el pH a 10 usando una solución de hidróxido de sodio -NaOH- al 15 % dentro de un baño de hielo por la reacción exotérmica entre el HCl y NaOH. Luego la solución se trató con cloroformo para movilizar las bases a la fase orgánica. (Maldoni, 1991)

Para la parte orgánica, el solvente fue evaporado al vacío y el líquido restante guardado para pruebas de detección de alcaloides. La parte acuosa presentará al alcaloide de interés. Para esto, se tomó una alícuota de 2 mL y se ajustó el pH entre 2-3 con HCl 2N. Luego se agregó el reactivo de Reinecke y dejar reposar durante la noche a oscuras en un ambiente frío. Por último, la muestra presentará una sal de Reinecke la cual es soluble en acetona, seguido de una segunda dilución con metanol. La solución se introdujo a una columna de intercambio aniónica para activar el anión del HCl y separar el producto de los solventes orgánicos. La columna fue lavada antes y después de su uso con una solución de acetona:metanol (1:1). El resultante de la columna consistirá en el alcaloide convertido en una sal cuaternaria de la cual, el solvente se deberá evaporar para dar paso a la cristalización. (Maldoni, 1991)

5.5. 2002: DAVID V. McCALLEY

Para el 2002, McCalley analizó los 4 alcaloides principales de la *Cinchona* empleando diferentes técnicas de separación cromatográficas. Las más conocidas para la separación

y análisis de muestras es la HPLC y TLC. El fin de este artículo no era presentar las aplicaciones de los diferentes alcaloides, sino evaluar diferentes análisis para la separación de estos (McCalley, 2002). Estos equipos de análisis pueden ser de utilidad para poder lograr el aislamiento de cada uno de los isómeros y no solo ser empleados para analizar el contenido de estos en las muestras de una investigación. (McCalley, 2002)

5.6. 2002: MARIA de CÉU de MADUREIRA, ANA PAULA MARTINS, MILENE GOMES, JORGE PAIVA, ANTÓNIO PROENÇA da CUNHA Y VIRGÍLIO do ROSÁRIO

El interés de este compuesto y las diferentes técnicas para su extracción dieron paso a la investigación y diferentes análisis fitoquímicos sobre este alcaloide y sus diferentes isómeros para determinar las propiedades únicas de este metabolito. En el mismo año, se realizó un estudio que buscaba medir la actividad antimalárica de diferentes plantas usadas en la medicina tradicional en las islas de Santo Tomé y el Príncipe ubicadas en el golfo de Guinea. En ella se compararon 13 plantas de diferentes especies, entre ellas la corteza de *Cinchona succirubra* Pav./Rubiaceae.

Para estos análisis, la materia prima fue recolectada, secada y pulverizada como primer tratamiento para la eliminación de agua y humedad dentro del material vegetal. Se realizó una extracción con etanol al 70 % y las muestras se concentraron usando un rotavapor. La solución resultante fue disolver en solución de metanol:agua (1:2). De esta muestra, se separó en fracciones de éter de petróleo, diclorometano y etil acetato. Las cuales fueron concentradas en rotavapor, liofilizadas y almacenadas a -20°C, hasta analizar. (do Céu de Madureira et al., 2002)

Número	Especie de planta	IC ₅₀ , valores de la media (µg/mL)				
		CEE	PE	DM	EA	MW
1	<i>Struchium sparganophorum</i>	180	<10	100	100	240
2	<i>Vernonia amygdalinaa</i>	120	170	235	500	n.d.
3	<i>Vernonia amygdalinab</i>	340	200	80	10	n.d.
4	<i>Ageratum conyzoides</i>	150	110	55	220	n.d.
5	<i>Cinchona succirubra</i>	<10	<10	<10	<10	<10
6	<i>Aloe humilis</i>	260	150	150	25	500
7	<i>Tithonia diversifolia</i>	15	<10	<10	140	500
8	<i>Cedrela odorata</i>	190	110	50	n.d.	n.d.
9	<i>Premna angolensis</i>	180	250	250	250	n.d.
10	<i>Pycnanthus angolensis</i>	<5	100	100	100	n.d.
11a	<i>Morinda lucida (bark)</i>	<10	50	50	100	500
11b	<i>Morinda lucida (leaves)</i>	10	130	60	500	125
12	<i>Cestrum laevigatum</i>	100	100	50	150	135
13	<i>Canna bidentata</i>	500	130	25	245	500

Cuadro 3: Actividad antimalárica de los extractos de plantas contra *P. falcipaum* (Dd2) in vitro. (do Céu de Madureira et al., 2002)

CEE, extracto etanólico crudo; PE, fracción de éter de petróleo; DM, fracción de diclorometano; EA, fracción de acetato de etilo; MW, fracción remanente de metanol y agua; n.d., no determinado; IC₅₀ (cloroquinina), 0.094 (µg/mL). (do Céu de Madureira et al., 2002)

Los resultados fueron prometedores para la especie de *C. succirubra* para la inhibición

de *P. falciparum* in vitro y los ensayos antimaláricos in vivo de *P. berghei* en ratas de laboratorio. Por lo que se puede decir que los solventes utilizados fueron efectivos para la extracción del metabolito, dando resultados positivos para el estudio. Sin embargo, la extracción fue muy general y no lo suficiente específica para determinar si el producto era quinina o una mezcla de la quinina con su estereoisómero quinidina. (do Céu de Madureira et al., 2002)

5.7. 2008: HIMANSHU MISRA, BHUPENDRA K. MEHTA Y DHARAM C. JAIN

Para el 2008, los métodos de extracción ya se conocen y el nuevo interés es la optimización de esos métodos para obtener mejores resultados y con mayor rapidez. Con esto en mente, un nuevo grupo de investigadores buscaron la manera de optimizar las condiciones de extracción de la quinina y su determinación tanto en la materia prima como en productos de mercado. Para esto, se analizaron las especies *C. calisaya*, *C. legeriana*, *C. officinalis* y *C. succirubra* por medio de la extracción de sus materias primas, seguido de un análisis por HPTLC. La extracción es una metodología simple, empezando por pulverizar muestra a 14 mesh. Luego, se tomaron 10 g muestra y 200 mL de solvente fueron colocados en un sistema soxhlet por 10 horas. El resultante fue reconcentrado en un rotavapor. El extracto fue diluido en 100 mL de metanol para poder realizar los análisis. (Misra et al., 2008)

Para el análisis de HPTLC usaron cromatoplasacas de sílica gel como fase estacionara y una solución de acetato de etilo:dietilamina (88:12) como fase móvil. Usando un densitómetro se realizó una corrida en el espectro visible para la detección de la quinina, presentando el pico con mayor absorbancia en 236 nm y presentando un R_f de 0.24. (Misra et al., 2008)

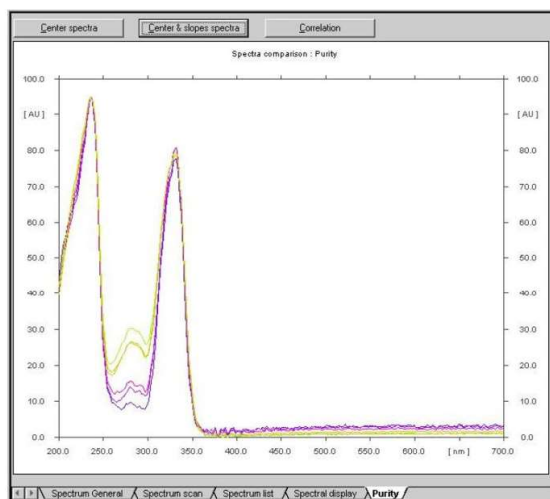


Figura 12: Espectro UV completo de la quinina. (Misra et al., 2008)

Realizado por un densitómetro Camag TLC escáner 3 en modo reflectancia-absorbancia a 236 nm y analizado con el software Camag *winCATS* de cromatografía plana. (Misra et al., 2008)

Emplearon diferentes solventes orgánicos para determinar si una modificación en el sol-

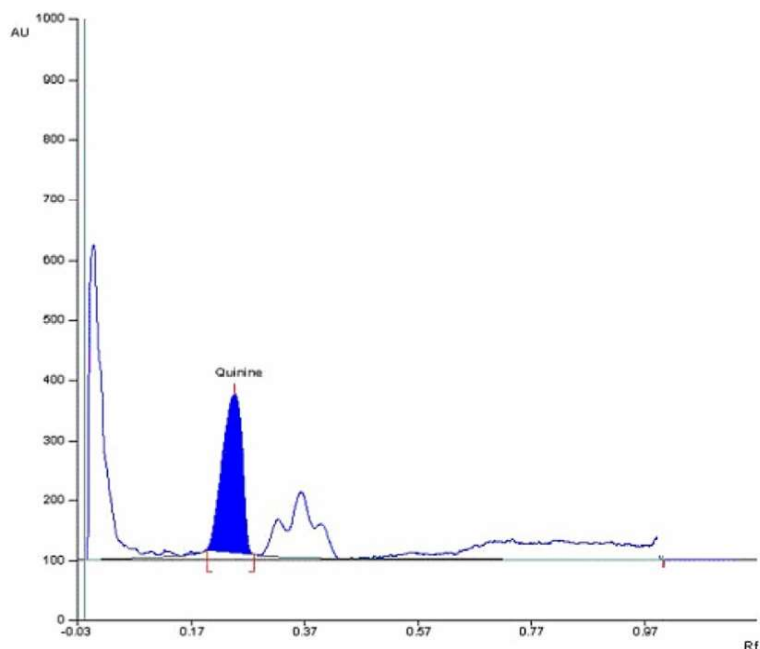


Figura 13: Cromatograma de la separación de la quinina. (Misra et al., 2008)
 Realizado por un densitómetro Camag TLC escáner 3 en modo reflectancia-absorbancia a 236 nm y analizado con el software Camag *winCATS* de cromatografía plana. Con un R_f de 0.24. (Misra et al., 2008)

vente podía presentar mejores resultados. Los solventes fueron *n*-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol variando proporciones con 0 %, 10 % y 20 % de di etilamina. En el cuadro 4, se puede ver el extracto de los resultados tabulados en la tabla 1 del artículo. En ellos se pueden ver los resultados más altos en la media en el contenido de quinina. (Misra et al., 2008).

De los solventes, el metanol presentó el porcentaje de recuperación más alto comparado con los demás solventes orgánicos y entre las muestras del metanol, el mejor resultado se obtuvo al emplear la solución de di etilamina al 20 % en metanol con la concentración de quinina más alta y el %RSD más bajo. El uso de la di etilamina con los solventes si presentó un aumento en la concentración de quinina al estar presente en un 20 % en la solución. “Concluye que la polaridad del solvente (solvente con constantes dieléctricas más altas) y la base son los dos factores principales que influyen en la extracción de quinina”⁵ mencionan (Misra et al., 2008). A su vez, el uso del análisis por HPTLC obtuvo resultados favorables, sin interferencia de picos y presenta ventajas en simplicidad, selectividad y rapidez, además de brindar un enfoque mejorado para la detección de la quinina tanto para muestras crudas como para muestras comerciales. (Misra et al., 2008)

⁵Texto obtenido (Misra et al., 2008) traducido textualmente. Texto original: “It concludes that polarity of solvent (solvent with higher dielectric constants) and base are the two main factors influencing extraction of quinine.”

No. de muestra	I.D. de muestra	% de contenido de quinina	Media del % de quinina (peso seco), (\pm DE)	% RSD
4	20 % DEA en <i>n</i> -hexano	1.800	1.814 % (\pm 0.012)	0.662
		1.818		
		1.824		
8	20 % DEA en cloroformo	1.817	1.825 % (\pm 0.011)	0.603
		1.837		
		1.820		
12	20 % DEA en acetato de etilo	2.063	2.036 (\pm 0.037)	1.817
		2.050		
		1.994		
16	20 % DEA en metanol	2.193	2.202 % (\pm 0.008)	0.363
		2.206		
		2.206		

Cuadro 4: Extracto de la tabla 1: Optimización de condiciones y solventes de extracción. (Misra et al., 2008)

RSD: desviación típica relativa; DE: desviación estándar

5.8. 2009: ELENA CÓNDROR CUYUBAMBA, BRÁS H. de OLIVEIRA, KARIN LOAYZA OCHOA Y VÍCTOR REYNA PINEDO

En el 2009 se logró aislar el alcaloide de la quinina identificándola por sus espectros de Masas, RMN¹H, RMN¹³C y ¹H-¹H COSY seguida por análisis cualitativos y TLC. Este estudio trabajó con la especie *C. pubescens* ya que las más estudiadas son *C. officinalis* y *C. calisaya* donde sus alcaloides han sido aislados y caracterizados por HPLC principalmente porque estas especies presentan los porcentajes más altos en concentración de quinina y quinidina. Para este estudio se implementó una metodología extensa para asegurar la total extracción de alcaloides (Cuyubamba et al., 2009). Esta inició con secar los tallos de *C. pubescens* a 35°C por 20 horas en un plazo de 2 días. Luego, estos fueron pulverizados y tamizados en mallas de 500 μ m. (Cuyubamba et al., 2009)

De este polvo se tomaron 150 g y fueron lavados con 300 mL de *n*-hexano 12 veces para eliminar la parte grasosa. El solvente se eliminó dejando secar a temperatura ambiente. Luego, se humedeció la muestra con solución de amoníaco 15 N (200 mL) y se dejó en reposo por 2 horas. Seguido a esto, se agregaron 200 mL de una solución de cloroformo:metanol (1:1) y se maceró por 24 horas. La solución resultante fue colocada en un sistema soxhlet cuyo balón contenía una solución de 900 mL de metanol:cloroformo:aceto de etilo (1:1:4). El reflujo duró un total de 6 horas al día por 35 días hasta que el solvente del cuerpo central diera negativo con la prueba de Mayer. Luego, la muestra fue concentrada en un rotavapor a 40°C a 300-400 mbar casi hasta sequedad. Luego se le realizó un tratamiento con H₂SO₄ 0.5 N (4x200 mL) para formar las sales de los alcaloides de interés. Para eliminar las sales libres, la muestra fue tratada con cloroformo (2 x 350 mL). De último se realizó un tratamiento alcalino con amoníaco -NH₃- 7.5 N (36 mL) para ajustar el pH final a 9. Para la separación de alcaloides se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo (35 x 100 mL) y fue

reconcentrada en un rotavapor a 30°C hasta casi sequedad. El residuo de alcaloide fue lavado con 100 mL de cloroformo y rotavaporado nuevamente. Este proceso fue repetido 4 veces para eliminar bases disueltas volátiles de NH₃. (Cuyubamba et al., 2009)

El producto final fue un sólido marrón oscuro, el cual fue comprobado por TLC empleando una cromatoplaaca de sílica gel y fase móvil de cloroformo:acetona:amoniaco (10:17:1) con revelador en UV y la quinina estuvo presente dando un valor de $R_f = 0.62$. Los resultados presentan todos los espectros obtenidos junto a las caracterizaciones de la quinina, por lo que el estudio si presenta probabilidades para futuros metodologías y promueve a próximas validaciones a los métodos. (Cuyubamba et al., 2009)

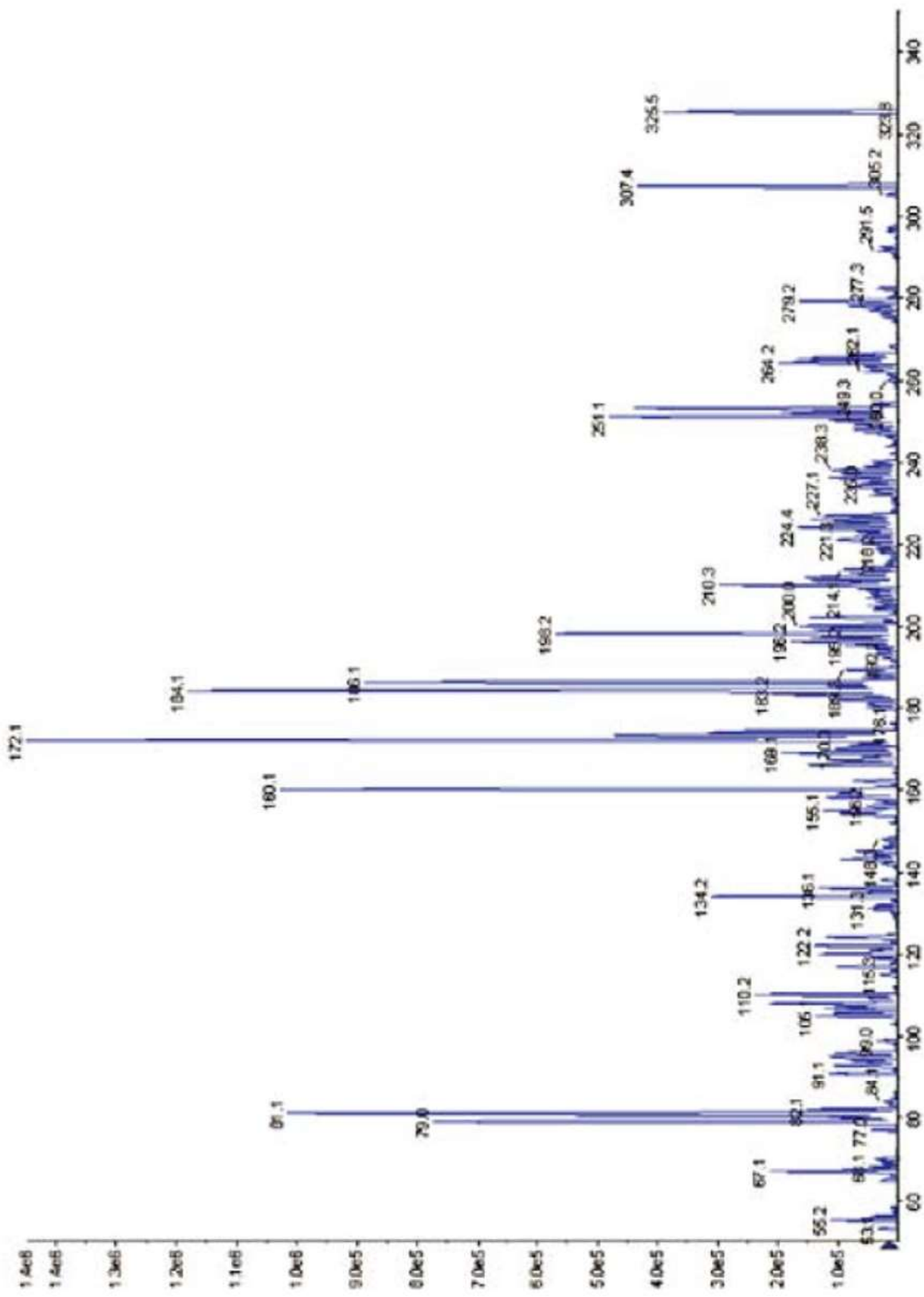


Figura 14: Espectro de masas de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*. (Cuyubamba et al., 2009)
 Espectrómetro de masa triple cuadrupolo acoplado a cromatografía líquida, Applied Biosystems modelo API300. Ión molecular: 325.5 m/z. (Cuyubamba et al., 2009)

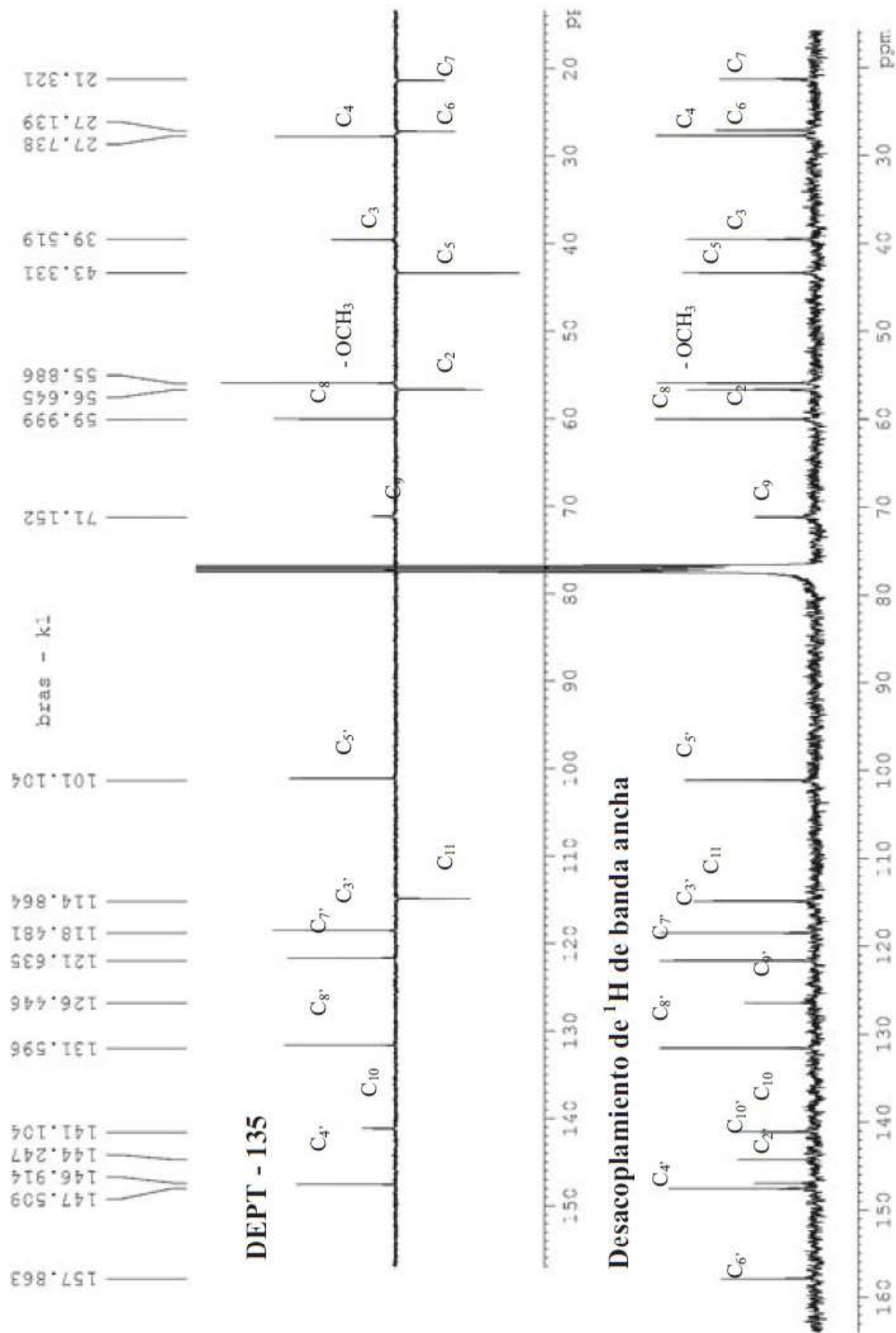


Figura 16: Espectro de RMN¹H (400 MHz) de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*. (Cuyubamba et al., 2009)
 Equipo Bruker DRX-400 (400 MHz) en cloroformo deuterado. (Cuyubamba et al., 2009)

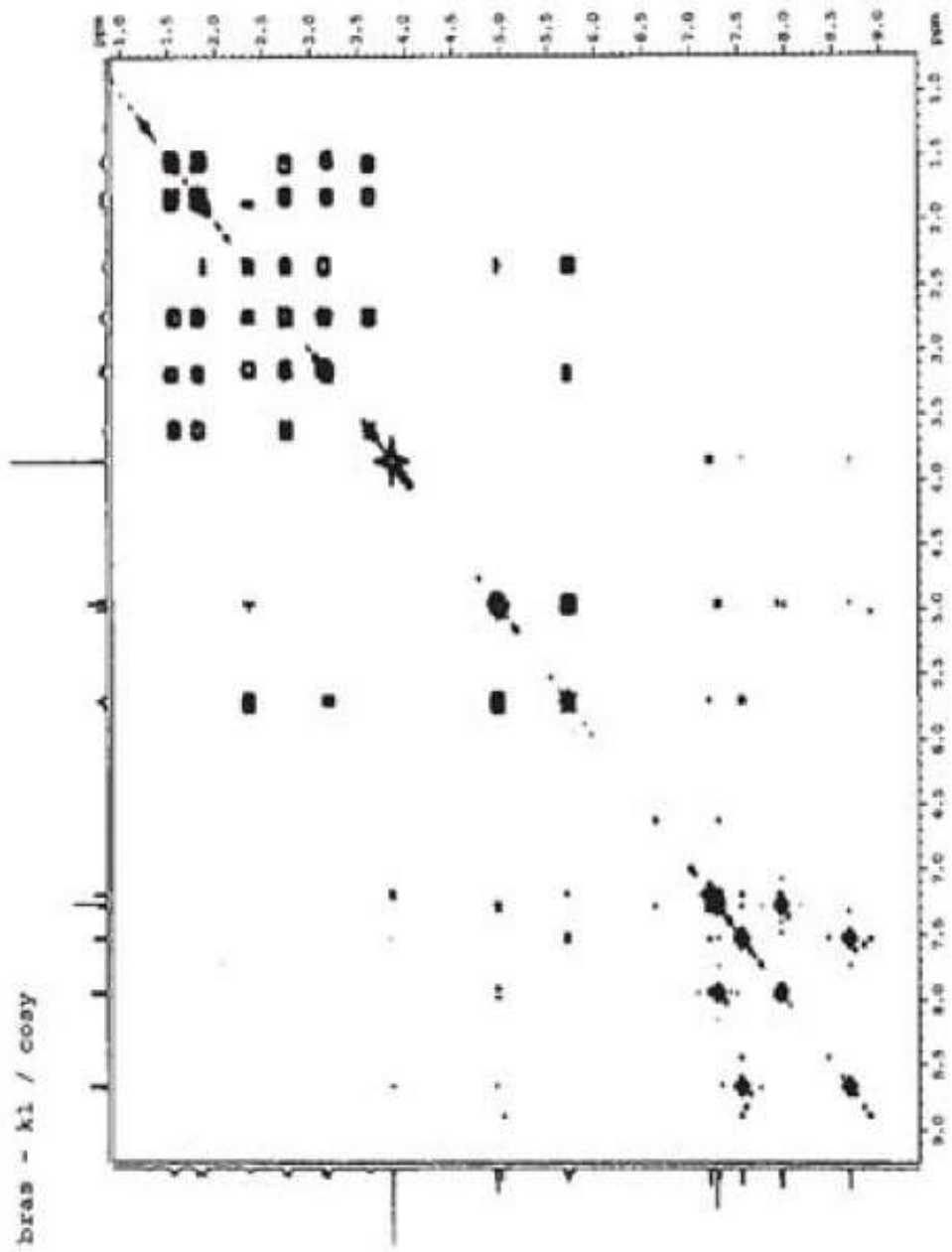


Figura 17: Espectro 2D ¹H-¹H COSY (400 MHz) de la quinina aislada de los tallos de *Cinchona pubescens*. (Cuyubamba et al., 2009)
 Equipo Bruker DRX-400 (400 MHz) en cloroformo deuterado. (Cuyubamba et al., 2009)

5.9. 2013: ANA MARÍA MESA VANEGAS, ANDRÉS QUINTO QUINTO Y SILVIO BLAIR TRUJILO

Para el 2013, la quinina sigue siendo de los medicamentos preferidos para tratar la malaria a nivel mundial por la falta de resistencia que posee el parásito al sulfato de quinina y su facilidad para ser un medicamento que puede ser de complemento de otros para los tratamientos en un paciente. Siendo América latina y África las regiones con mayor incidencia en muertes causadas por esta enfermedad, ha surgido un interés en el descubrimiento de nuevos metabolitos en todas las especies de *Cinchona*. En América se conocen más de 40 especies e híbridos de *Cinchona*, donde las más estudiadas e importantes son *C. officinalis* y *C. calisaya* ya que estas presentan un contenido alto de alcaloides antimaláricos. (Mesa et al., 2013)

Tomando en consideración el párrafo anterior, un estudio en la universidad de Colombia con el objetivo de identificar y cuantificar la quinina de los tallos de *C. pubescens* y medir su actividad antiplasmodial y el efecto citotóxico. Para esto, se empleó la siguiente metodología para extracción, aislamiento y análisis químico. El procedimiento inició con el tratamiento del material vegetal, el cual fue secado a temperatura ambiente por 10 días y luego fue molido para que el tamaño partícula fuera de 5 mm. Luego se realizaron 2 procedimientos los cuales variaron por el uso de diferentes solventes orgánicos. Esto para la detección de alcaloides generales en los tallos de *C. pubescens*. (Mesa et al., 2013)

El primero, consistió en tomar 611 g del polvo y se trató en un proceso de percolación hasta agotamiento 3 veces al día, por 5 días usando etanol como solvente orgánico. El resultado fue filtrado y concentrado en rotavapor para tener el primer extracto usando. Este fue nombrado como CPExtE. Para el segundo, se trabajó con 600 g material molido se extrajo usando 1 L de usando como solventes hexano, etil acetato, diclorometano y metanol en un proceso de percolación hasta agotamiento por 3 días. Cada extracto fue nombrado como CPExtG donde G representa la inicial del solvente utilizado. El extracto fue concentrado usando un rotavapor y el solvente recuperado se agregó al extracto nuevamente. Esta parte fue realizada 3 veces hasta cambiar el solvente. Para ambos procedimientos, se realizó un monitoreo por pruebas con reactivo de Dragendorff y TLC. Para el TLC se usó una cromatoplaque de sílica gel con fase móvil de diclorometano:metanol (9:1) usando lámpara UV a 254 y 366 nm. (Mesa et al., 2013)

Luego, se preparó solo el extracto etanólico usando 200 mL HCl al 5% para después realizar un tratamiento alcalino con hidróxido de amonio -NH₄Cl- al 5% hasta ajustar el pH a 9. Para separar las bases libres y extraer los alcaloides de interés se agregó diclorometano y se separó la fase orgánica. El líquido resultante fue filtrado sobre sulfato de sodio -Na₂SO₄- y concentrado en rotavapor. (Mesa et al., 2013)

Para la identificación de los alcaloides, se realizaron empleando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de diodos -HPLC-DAD- y un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de diodos y masas .HPLC-DAD-MS-. Se realizó una curva de calibración de sulfato de quinina y los extractos concentrados a 3000 ppm, disueltos en buffer fosfato:acetonitrilo (95:5), filtrados e inyectados por triplicado y en una longitud de onda de 222 nm. Para la purificación de los alcaloides, se trabajó en una columna flash usando sílica gel de fase estacionaria y como fase móvil se usó una mezcla de hexano:etil acetato y etil

acetato:metanol. Y como último análisis, se empleó un espectrómetro infrarrojo y resonancia magnética nuclear con detección de hidrógeno -RMN-1H- con cloroformo deuterado como solvente. (Mesa et al., 2013)

Los resultados mostraron preferencia al solvente etanólico con un rendimiento de 1.49 %, seguido del metanólico con 1.32 %. Se procedió a estandarizar la identificación y cuantificación de la quinina para los extractos, dando mejores resultados variando el tiempo de retención de la quinina para cada solvente, pero todos los resultados presentaron una buena linealidad determinada por sus valores del R^2 próximos a 1. A pesar de esto, la concentración total de quinina se vio afectada por el solvente utilizado teniendo preferencia por los solventes polares, siendo el hexano quien presentó la menor concentración de quinina en comparación del etanol y metanol. El estudio concluye la posibilidad y eficiencia de emplear estas técnicas para la detección de quinina y otros metabolitos con capacidad de emplearse para otras especies de la *Cinchona* y promueven al estudio de otros metabolitos para el análisis de su actividad antimalárica. (Mesa et al., 2013)

Extracto	% de rendimiento	Concentración de quinina presente en cada extracto ([Q ppm] \pm SD)	IC ₅₀ (μ g/mL) X \pm SD*	CC ₅₀ (μ g/mL) X \pm SD	IS***
			Cepa de <i>P. falciparum</i> NF-54**	Línea celular HepG2	
CPExtH	0.13	0.640 \pm 0.00127	7.16 \pm 0.214	37.1 \pm 4.33	5.18
CPExtD	0.51	1.58 \pm 0.0323	4.79 \pm 0.651	39.1 \pm 7.91	7.45
CPExtA	1.08	2.11 \pm 0.0766	16.10 \pm 0.716	107 \pm 6.79	5.05
CPExtM	1.32	2.21 \pm 0.0485	8.54 \pm 0.742	167 \pm 4.45	18.43
CPExtE	1.49	NE	7.50 \pm 1.160	100 \pm 14.7	12.04
CPExtAT	0.044	21.3 \pm 0.0247	2.20 \pm 0.033	80.2 \pm 12.2	36.48
Ácido oxoquinóvico (CP1)	NE	—	11.3 \pm 0.741	72.4 \pm 3.85	6.43

Cuadro 5: Contenido de quinina en los extractos y su actividad antiplasmodial y citotóxica. (Mesa et al., 2013)

* X (Media) \pm SD (Desviación estándar); **Control positivo Cloroquina IC₅₀ = 23.9 \pm 2.78 nM; ***Este valor se obtuvo de la relación del promedio de CC₅₀ en la línea celular HEPG2 y el promedio de IC₅₀ en la cepa NF-54 de *P. falciparum* (IS) = CC₅₀ (μ g/mL) / IC₅₀ (μ g/mL); *Clasificación de la actividad antiplasmodial*: atentamente activo < 5 μ g/mL, *Clasificación de la actividad citotóxica*: altamente tóxico < 10 μ g/mL, citotóxico 10-40 μ g/mL, moderadamente citotóxicos 41-100 μ g/mL y no citotóxicos > 100 μ g/mL; NE: No Evaluado; ND: No Determinado. (Mesa et al., 2013)

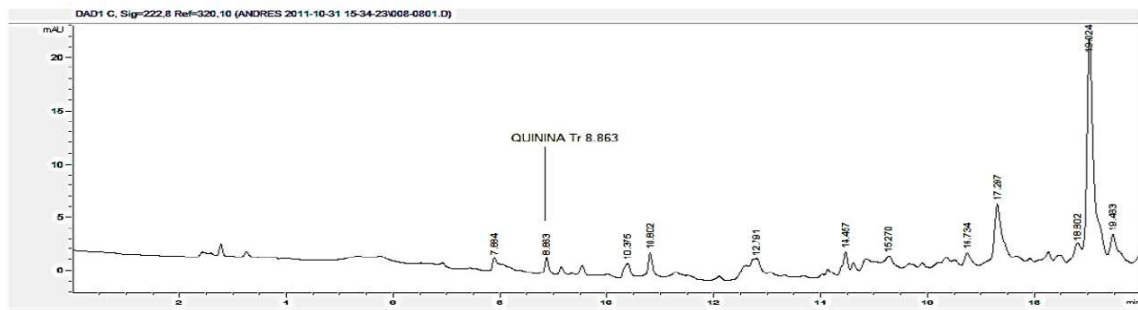


Figura 18: Perfil cromatográfico del extracto de hexano con un tiempo de retención para la quinina de t_R 8.863 min. (Mesa et al., 2013)

5.10. 2017: ELSE HOLMFRED, CLAUS CORNETT, CARLA MALDONADO, NINA RØNSTED Y STEEN HONORÉ HANSEN

Ahora las metodologías buscan proponer extracciones novedosas, cuyos agregados o modificaciones a extracciones anteriores propongan un beneficio al mejorar los resultados, disminuir el tiempo del análisis o similar. Para el 2017, Holmfred y compañía propusieron una metodología optimizada para la separación y detección de alcaloides en *Cinchona* usando HPLC acoplado con detector de UV y fluorescencia. (Holmfred et al., 2017)

La metodología empieza pulverizando y tamizando a $180 \mu\text{m}$ la muestra. Se tomaron 50 mg de muestra en un matraz junto a 1 mL de dimetil sulfóxido -DMSO- en baño ultrasónico por 10 minutos. Se agregaron 4 mL de una solución acuosa al de 70 % de metanol conteniendo 0.1 % de ácido fórmico y fue sonicado por 10 minutos. Luego la muestra fue centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm. Se toma la parte acuosa y se trasvasa a balón de 50 mL 2 veces. En el balón se agrega una solución de ácido fórmico al 0.1 % en agua. Para la detección se emplea un HPLC usando una fase invertida empleando acetonitrilo y metanol. Además de 3 diferentes buffers sin solventes orgánicos. (Holmfred et al., 2017)

pH del buffer	Acetonitrilo (%)	Metanol (%)	Cinchonina	Cinchonidina	Quinidina	Quinina
pH 6.3, formiato de amonio 20 mM	25	0	2.90	2.90	3.96	3.96
	20	6	4.32	4.32	6.38	6.38
	15	12	6.11	6.20	9.45	9.71
	10	18	8.49	8.80	14.00	14.87
	0	31	10.00	11.07	17.56	20.27
pH 3.0, formiato de amonio 20 mM con 0.1 % de ácido fórmico	25	0	1.66	1.66	2.17	2.17
	20	6	2.36	2.40	3.19	3.30
	15	12	3.27	3.39	4.61	4.97
	10	18	4.27	4.60	6.25	7.04
	0	31	4.57	5.31	6.82	8.77
pH 2.7, 0.1 % ácido fórmico	25	0	0.70	0.70	0.70	0.70
	20	6	0.74	0.74	0.74	0.74
	15	12	0.82	0.82	0.91	0.99
	10	18	0.94	1.04	1.14	1.31
	0	31	1.13	1.38	1.50	1.81

Cuadro 6: Factores de retención, k , de los 4 alcaloides de la Cinchona como función de pH y el modificador orgánico en la fase móvil. (Holmfred et al., 2017)

Los resultados presentaron que los factores de retención k para todas las muestras, aumentaron mientras el metanol aumento en concentración y el acetonitrilo disminuyó. La preferencia de la quinina al metanol evidencia a este como un solvente muy útil para la extracción y eso en los análisis para la detección de quinina. A su vez, los buffers pudieron influir a los factores de retención ya que mientras más bajo el pH, el factor de retención sería menor a pesar de que la muestra es afín al metanol. Si se toman en consideración a los otros alcaloides importantes de la *Cinchona*, el método parece lograr sepáralos a medida que el metanol aumenta. Sin embargo, a un pH bajo, parece ser que la separación de estos alcaloides no es visible ya que presenta valores muy cercanos (Holmfred et al., 2017). Esto puede ser causado por la protonación del grupo amino cuaternario a valores de pH bajos. Este es un método que permite detectar y cuantificar a los principales alcaloides en la corteza de la *Cinchona*, pero, no parecer ser muy adecuado para trabajarlo a niveles industriales. Se puede recomendar para el análisis de la corteza como materia prima o al final de la cosecha para detectar si hay o no alcaloides. (Holmfred et al., 2017)

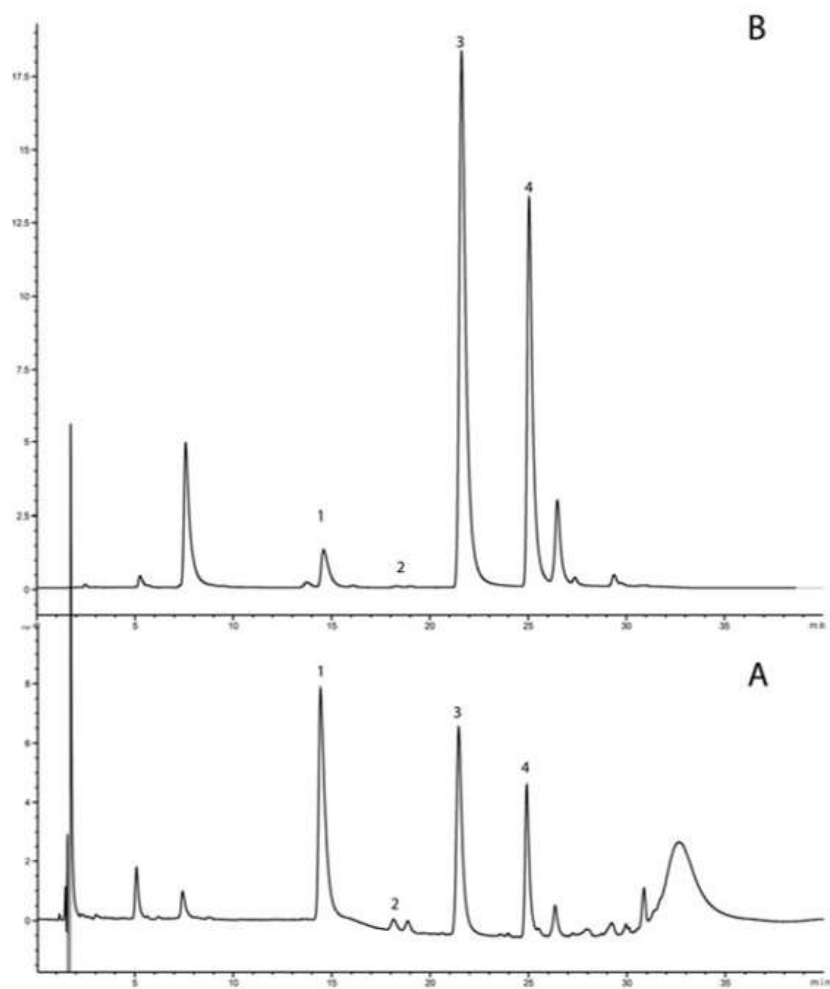


Figura 19: Cromatograma de la corteza de *Cinchona*. (Holmfred et al., 2017)
Detección: (A) UV a 330 nm; (B) Fluorescencia con excitación a 330 nm y emisión a 420 nm. Picos: 1 cinchonina, 2 cinchonidina, 3 quinidina, 4 quinina. (Holmfred et al., 2017)

PROPUESTA PARA LA EXTRACCIÓN DEL ALCALOIDE QUININA A PARTIR DE LA MUESTRA DE CORTEZA

6.1. EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES POR MÉTODO TRADICIONAL USANDO ACEITE DE KEROSENO

Secar la muestra. Pulverizar la corteza de *Cinchona* a mesh 60. Se trabajará únicamente con la variedad de *Cinchona legeriana*. Moretear 25.00 g de la corteza previamente pulverizada con 2.00 g de hidróxido de sodio -NaOH- hasta formar una pasta oscura. Posteriormente agregar 125 mL de agua y dejar reposar por al menos 24 h. Agregar aceite de keroseno a una proporción de 6 partes de aceite a 5 del aceite (150 mL de keroseno). Colocar en sistema soxhlet y calentar por 24 horas. (Nair, 2010; Sullivan, 2012)

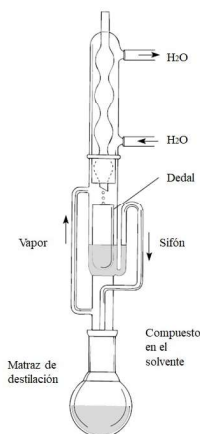


Figura 20: Diagrama del sistema soxhlet (Pavia et al., 2011)

6.2. PURIFICACIÓN POR RECRISTALIZACIÓN

Realizar 3 extracciones líquido-líquido del aceite, utilizando 250 mL H_2SO_4 6N en cada una. La fase orgánica será guardada en frío y oscuridad hasta el día de las pruebas, mientras que se seguirá trabajando el resto del procedimiento en la fase acuosa. Realizar un tratamiento alcalino con una solución de NaOH concentrado para ajustar el pH 5.5. Esperar a que aparezcan cristales de tonos grisáceos en la solución. Deberían formarse en la superficie y filtrar. Estos son sulfato de quinina. («Manufacture of Quinine in India», 1890; Nair, 2010; Sullivan, 2012)

Para purificar la muestra se debe agregar 1 g de carbón activado caliente por cada litro de solución. Hervir, mezclar vigorosamente y filtrar en caliente. Luego, dejar enfriar y volver a filtrar. Finalmente se recristaliza con agua caliente, con un baño de hielo y una varilla de agitación. (Nair, 2010; Sullivan, 2012)

6.2.1. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PARA LA QUININA

Pruebas cualitativas

Tomar muestras de la extracción en todas las etapas de la extracción. Emplear las pruebas de Mayer, Dragendorff y Mayer para determinar la presencia de alcaloides a lo largo de todo el procedimiento de la extracción.

Análisis analítico

Realizar una prueba por fluorescencia preparando 10 soluciones estándar de sulfato de quinina de concentraciones desde 0.05 hasta 1000 ppm y preparando soluciones de extracto de quinina en H_2SO_4 0.05 M. Correr blanco de H_2SO_4 0.05 M y obtener una curva de calibración tomando como longitud de onda de referencia la de emisión máxima. Correr las soluciones de las muestras de extraídas y determinar su concentración en función de la intensidad de emisión. (Zieschang et al., 2015)

Realizar una prueba por HPTLC preparando una cromatopla de sílica gel y aplicar 10 uL del estándar las muestras, una muestra de la fase móvil y de los solventes utilizados en la extracción. Secar para eliminar excesos y fija las aplicaciones a la cromatopla. La fase móvil será una mezcla de cloroformo y dietilamina con proporciones 90:10 respectivamente. Sumergir la placa en la fase móvil y se esperar a que la fase móvil alcance el frente del solvente. Secar la placa y se harán lecturas a diferentes longitudes de onda entre 254 y 365 nm para determinar el R_f . Puede usarse H_2SO_4 o Yodo re sublimado como derivatizantes y revelar las bandas. (Wagner Blatt, 2001)

6.3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PROPUESTO

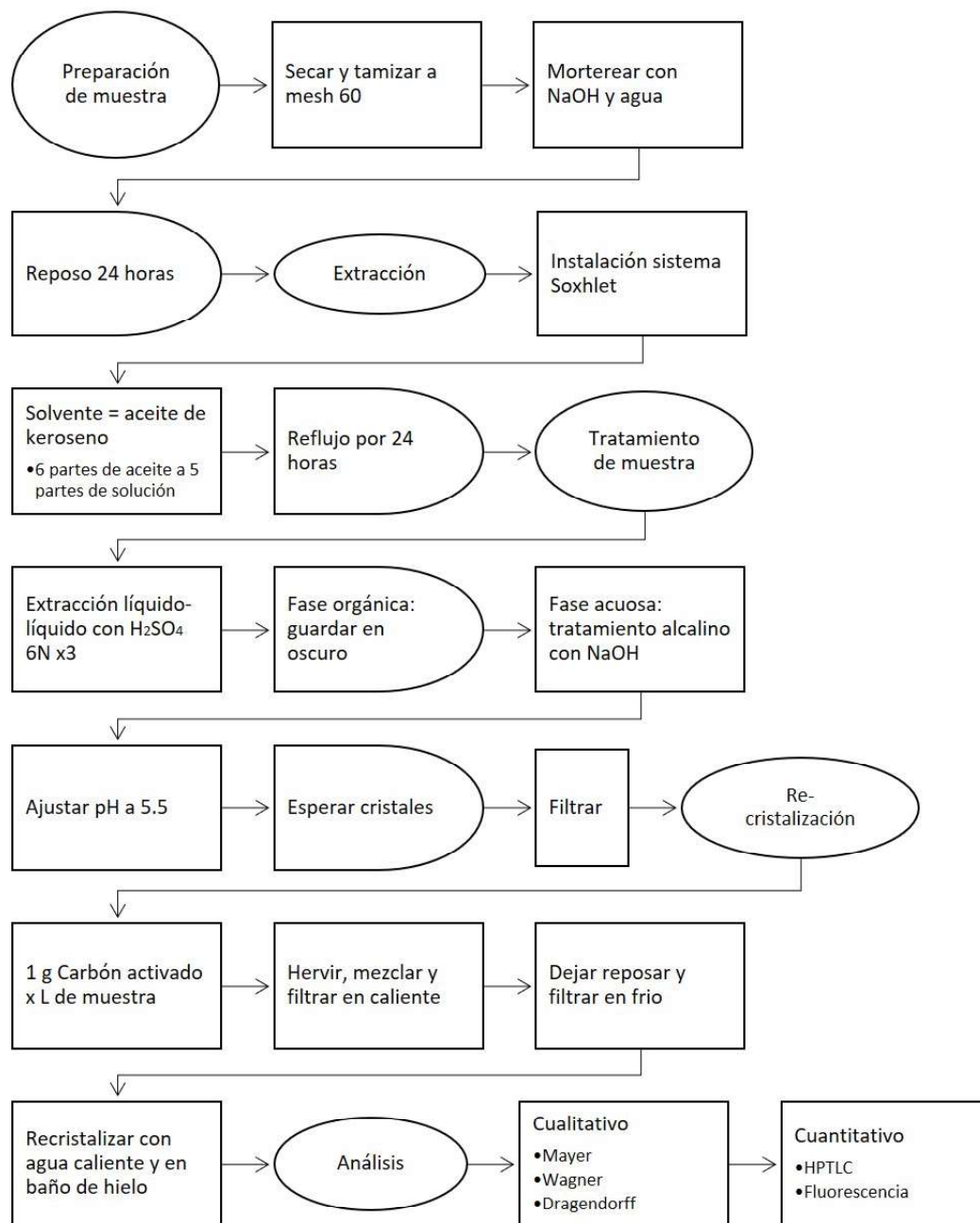


Figura 21: Diagrama de flujo del procedimiento propuesto

CONCLUSIONES

1. El alcaloide quinina es uno de los alcaloides con estudios científicos con 200 años de antigüedad por su relevancia en el ámbito de la medicina e industria. Esto demuestra que la metodología para la extracción de la quinina todavía no ha sido perfeccionada y se siguen buscando nuevas alternativas que prometan mejores resultados.
2. todos los estudios se puede ver que el solvente orgánico que presenta mejor afinidad por la quinina es el etanol y metanol. Sin embargo, según el estudio de Misra etl al. del 2008 demostró que el uso de una solución de metanol con dietilamina presentó mejores resultados a comparación de usar el solvente orgánico por sí mismo.

RECOMENDACIONES

1. Para comparar la efectividad del procedimiento propuesto, se recomienda realizar la metodología de Misra, et. al. del año 2008 ya que posee un sistema soxhlet y la preparación del material vegetal es factible, fácil y más parecido a la metodología de Watt del año 1890. También se recomienda tomar como metodología de control la propuesta por Holmfred en 2017 ya que el uso del baño ultrasónico puede mejorar la extracción y separación de los alcaloides del material vegetal.
2. Varios de los estudios buscan y alientan a otros a proponer y validar una metodología de análisis para la cuantificación de la quinina. En este caso, si la metodología propuesta presenta resultados positivos, se recomienda realizar una validación de la metodología apoyándose del análisis TLC y fluorescencia.
3. Para el desarrollo de la industria guatemalteca, se recomienda realizar la extracción y luego hacer un análisis para determinar la viabilidad de esta metodología y su aplicación a una escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

Asicona, P. (2013). *EVALUACIÓN DE CUATRO SUSTRATOS EN SEMILLEROS DE*. 81.

Carey, F., Giuliano, R. M. (2014). *Química Orgánica*(9na ed.). McGraw Hill.

Cuyubamba, E. C., de Oliveira, B. H., Ochoa, K. L., Pinedo, V. R. (2009). ESTUDIO QUÍMICO DE LOS TALLOS DE *Cinchona pubescens* Vahl. *Rev Soc Quím Perú.*, 10.

Delépine, M. (1951). JOSEPH PELLETIER AND JOSEPH CAVENTOU. *Journal of Chemical Education*, 28, 454-461. <https://doi.org/10.1021/ed028p454>

Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach* (3rd ed.). Wiley.

do Céu de Madureira, M., Paula Martins, A., Gomes, M., Paiva, J., Proença da Cunha, A., do Rosário, V. (2002). Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 23-29. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00005-3)

Ebadi, M. (2006). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine* (2nd ed.). Taylor Francis Group.

Evans, W. C. (2009). *Trease and Evans Pharmacognosy* SIXTEENTH EDITION (16th ed.). Saunders Elsevier. https://www.academia.edu/38664516/Trease_and_Evans_Pharmacognosy_SIXTEENTH_EDITION

García López Hortelano, M., Fumadó Pérez, V., González Tomé, M. I. (2013). Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. *Anales de Pediatría*, 78(2), 124.e1-124.e8. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.06.007>

George Watt. (1889). *A Dictionary Of The Economic Products Of India Vol 2*. <http://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.83735>

Holmfred, E., Cornett, C., Maldonado, C., Rønsted, N., Hansen, S. H. (2017). An Optimised Method for Routine Separation and Quantification of Major Alkaloids in Cortex Cinchona by HPLC Coupled with UV and Fluorescence Detection. *Phytochemical Analysis*, 28(5), 374-380. <https://doi.org/10.1002/pca.2684>

Maldoni, B. (1991). Alkaloids: Isolation and purification. *Journal of Chemical Education*, 68(8), 700. <https://doi.org/10.1021/ed068p700>

Manufacture of Quinine in India. (1890). *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)*, 1890(38), 29-34. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/4118253>

McCalley, D. V. (1990). *Quantitative Analysis of alkaloids From Cinchona Bark by High-performance Liquid Chromatography*. 115, 1355-1358.

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. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01557-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01557-6)

Mesa, A. M., Quinto-Quinto, A., Blair, S. (2013). *Cuantificación de quinina en extractos de Cinchona pubescens y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica*.

Misra, H., Mehta, B. K., Jain, D. C. (2008). *Optimization of Extraction Conditions and HPTLC - UV Method for Determination of Quinine in Different Extracts of Cinchona species Bark*. 9.

Nair, K. P. (2010). *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World* (1st ed., Vol. 1). Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/the-agronomy-and-economy-of-important-tree-crops-of-the-developing-world/nair/978-0-12-384677-8>

OMS, O. M. de la S. (1996). *Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias—Segunda edición*. <https://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/>

OMS, O. M. de la S. (2011). *Directrices para el tratamiento de la malaria (2da ed.)*. World Health Organization.

OPS, O. P. de la S. (2010). *Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria* (p. 124). Instituto Nacional de Salud.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Engel, R. G. (2011). *A Small Scale Approach to Organic Laboratory Techniques* (Third Edition). Cengage Learning.

Pellentier, J., Caventou, J. (1821). *Analyse Chimique Dess Quinquina* (Vol. 1).

Pérez Gonzalez, L. E. (2006). *Estudio fitoquímico biodirigido de las plantas con potencial actividad insecticida trichilia havanensis y croton ciliatoglanduliferus* [Universidad de las Américas Puebla]. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/perez_g_le/

Pomilio, A. B. (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(1), 73-82.

Seeman, J. I. (2007). The Woodward-Doering/Rabe-Kindler total synthesis of quinine: Setting the record straight. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 46(9), 1378-1413. <https://doi.org/10.1002/anie.200601551>

Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2015). *Principles of instrumental analysis*. (6th ed.). Cengage.

Skoog, Douglas A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2007). *Principios de análisis instrumental* (6ta ed.). Cengage Learning. <http://latinoamerica.cengage.com>

Spencer, L. M., Gómez, A., Collovini, E. (2016). Mecanismos de invasión del esporozoíto y merozoíto de Plasmodium. *Revista Bionatura*, 1(2), 89-94.

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. <https://doi.org/10.1021/ja004325r>

Sullivan, D. J. (2012). Cinchona alkaloids: Quinine and quinidine. *Treatment and Prevention of Malaria: Antimalarial Drug Chemistry, Action and Use*, 45-68. https://doi.org/10.1007/978-3-0346-0480-2_3

Taylor, L. (2005). *El poder curativo de las hierbas de la selva tropical*. Square One Publishers Inc.

Vásquez, L. E. C. (2017). *Malaria primer trimestre (semana epidemiológica 13) Guatemala*, 2017. 4.

Wagner, H., Bladt, S. (2001). *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas* (2da ed., Vol. 1). Springer.

Watt, G. (1889). *A Dictionary of the Economic Products of India* (Vol. 2). Cambridge University Press.

Willcox, M. L., Bodeker, G. (2004). Traditional herbal medicines for malaria. *BMJ: British Medical Journal*, 329(7475), 1156-1159.

Zieschang, F., Grant, K., Agilent Technologies, Inc. (2015, diciembre 7). *Quantify Quinine in Beverages Using the Agilent Cary Eclipse Spectrofluorometer and a Fiber Optic Dip Probe*. 4.