

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

[Quantification of quinine in extracts from stems *Cinchona pubescens* and evaluation of antiplasmodial and cytotoxic activity]

Ana María MESA-VANEGAS¹, Andrés QUINTO-QUINTO, Silvia BLAIR-TRUJILLO

Grupo de Investigación Malaria. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Carrera 62 52-59. Torre 1. Lab. 610 SIU. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín, Colombia

Contactos / Contacts: Ana María MESA-VANEGAS - E-mail address: anamv@gmail.com

Abstract

Plants belonging to the genus *Cinchona* L. (Rubiaceae), whose active ingredient is quinine, was used for centuries to treat malaria. Plants of this genus are a potential source of new structural templates in the search for new antimalarial candidates. This study aimed to the identification, quantification of quinine and other metabolites present in extracts of different polarity of the stems of *Cinchona pubescens* Vahl. , oxoquinovic acid isolation, antiplasmodial activity, and measuring its cytotoxic effect. The results show a high activity to antiplasmodial alkaloids extract ($IC_{50} = 2.20 \pm 0.0325 \mu\text{g/mL}$), cytotoxicity ($CC_{50} = 80.2 \pm 12.2 \mu\text{g/mL}$), and a quinine content of 21.3 ± 0.0247 ppm. The compound known as acid antiplasmodial activity oxoquinovic presented in $IC_{50} = 11.3 \pm 0.741 \mu\text{g/mL}$, and cytotoxicity $CC_{50} = 72.4 \pm 3.85 \mu\text{g/mL}$. These results motivate phytochemical studies in the search for active structural analogues quinine and quinolinic core as a source of new antimalarial agents.

Keywords: *Cinchona*, quinine, antiplasmodial activity, *Plasmodium falciparum*, cytotoxicity

Resumen

Las plantas pertenecientes al género *Cinchona* L. (familia Rubiaceae), cuyo principio activo es la quinina, fueron utilizadas durante siglos para tratar la malaria. Este género es una fuente potencial de nuevas plantillas estructurales en la búsqueda de nuevos candidatos antimaláricos. El presente trabajo tuvo como objetivo la identificación y, cuantificación de la quinina y de otros metabolitos presentes en los extractos de diferente polaridad, de los tallos de *Cinchona pubescens* Vahl. , el aislamiento del ácido oxoquinóvico, la actividad antiplasmodial y, además, la medición de su efecto citotóxico. Los resultados muestran una alta actividad antiplasmodial para el extracto de los alcaloides ($IC_{50} = 2,20 \pm 0,0325 \mu\text{g/mL}$), una baja citotoxicidad ($CC_{50} = 80,2 \pm 12,2 \mu\text{g/mL}$), y un alto contenido de quinina el cual fue $21,3 \pm 0,0247$ ppm. El compuesto ácido oxoquinóvico presentó una actividad antiplasmodial de $IC_{50} = 11,3 \pm 0,741 \mu\text{g/mL}$, y una citotoxicidad de $CC_{50} = 72,4 \pm 3,85 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados motivan los estudios fitoquímicos en la búsqueda de principios activos y análogos estructurales en diferentes especies de *Cinchonas* como una fuente de nuevos agentes antimaláricos.

Palabras Clave: *Cinchona*, quinina, actividad antiplasmodial, *Plasmodium falciparum*, citotoxicidad.

Recibido | Received: 5 de Febrero de 2013

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 9 de Abril de 2013

Publicado en línea | Published online: 30 de Noviembre de 2013.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Ministerio de Agricultura de Colombia proyecto (N° 009-2007-V7552-38-07), a la Universidad de Antioquia por el programa de sostenibilidad 2011-2012.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: AM Mesa-Vanegas, A Quinto-Quinto, S Blair-Trujillo. 2013. Cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona pubescens* y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 12(6): 592 – 602.

INTRODUCCIÓN

Las plantas pertenecientes al género *Cinchona* L. (Rubiaceae), cuyo principio activo es la quinina, fueron utilizadas durante siglos para tratar las fiebres, principalmente aquellas asociadas con la malaria. Este alcaloide quinolínico ha jugado un papel importante y esencial en la medicina por cientos de años, su química ha fascinado a muchos investigadores y ha motivado cambios en la química orgánica, síntesis enantioselectiva y en la química industrial moderna (Raheem *et al.*, 2004). Este poderoso fármaco empleado para tratar las manifestaciones graves causadas por *Plasmodium falciparum* Welch (Haemosporida: Sporozoa), se convirtió en un modelo para sintetizar nuevos agentes antimaláricos como la cloroquina, amodiaquina, mefloquina, primaquina, halofantrina y lumefantrina (Vipan *et al.*, 2009). En la actualidad, la malaria sigue siendo uno de los problemas de salud más graves en muchas partes del mundo, particularmente en África y América Latina, dado que son las regiones con más altos índices de mortalidad (WHO,

2011), por lo que ha surgido un interés por descubrir nuevos metabolitos secundarios a partir de plantas de género *Cinchona*, esto debido a la resistencia que ha desarrollado *P. falciparum* a los medicamentos de síntesis, los cuales actualmente son empleados para tratarla (Robert *et al.*, 2002).

El género *Cinchona*, llamado comúnmente cascarillas o quinas está distribuido desde Costa Rica hasta Bolivia con más de 40 especies e híbridos. Las dos especies *Cinchona* más estudiadas son *C. officinalis* L. y *C. calisaya* Wedd. donde la mayoría de estas especies contienen los alcaloides: quinina, quinidina, cinchonina y cinchonidina, los cuales varían en su contenido en la corteza, con un porcentaje entre el 7 - 12%, y una distribución porcentual de 70 - 90% quinina, 1 - 3% cinchonidina y hasta 1% quinidina (McCalley *et al.*, 2002), también existen otros alcaloides minoritarios que son precursores de la formación de los alcaloides mayoritarios en las distintas rutas biogénicas como el triptófano, ácido quínico, entre otros (Figura 1) (Leete *et al.*, 1968).

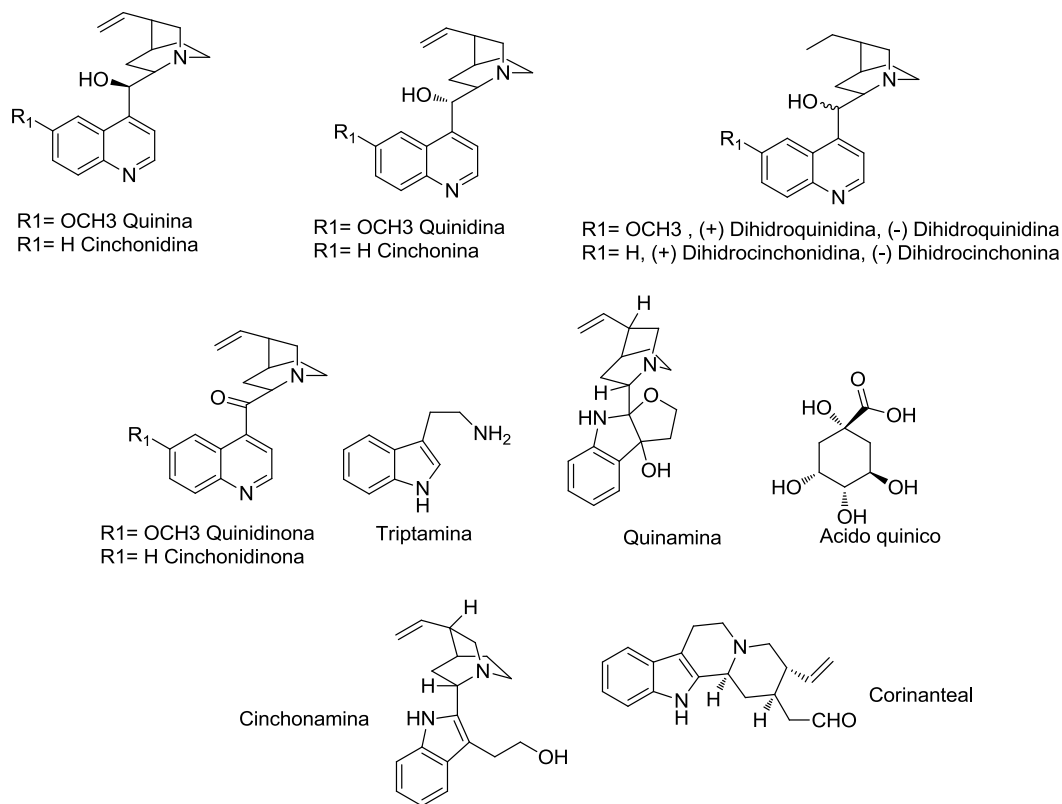


Figura 1
Compuestos aislados del género *Cinchona* L. (Rubiaceae)

Al inicio del siglo XX la producción estimada de quinina era de 300 a 500 toneladas por año, lo cual significa que debieron procesarse entre 5 a 10 mil toneladas de corteza de *Cinchona* (Condor *et al.*, 2009). Actualmente, las especies del género *Cinchona*, están catalogadas en vía de extinción o se encuentran en las listas de especies amenazadas (Jaramillo *et al.*, 2010). Los factores que influyen son; la explotación que se dio en el siglo XVII por sus propiedades antimaláricas, además de la pérdida de la biodiversidad del norte de los Andes, dada por la transformación de los ecosistemas entre ellos los que acobijan a la distribución de *Cinchona* por nuevas colonizaciones. Estos factores han provocado una reducción en las poblaciones de *Cinchona* en algunas regiones, encontrándose únicamente en pequeños parches o individuos aislados (Fernández *et al.*, 2004). Por otra parte, en otras regiones los impactos de las invasiones de plantas están siendo reconocidas como un de las mayores amenazas a la biodiversidad. En Galápagos- Ecuador, las especies nativas y endémicas de la región se ven amenazadas por la invasión de la especie *C. pubescens*, sobre la vegetación nativa, por lo que en algunos casos se han implementado métodos eficaces para su control como la introducción de otras especies que suprimen su abundancia, sin embargo, esta estrategia presenta la desventaja de una invasión por otras especies. La explotación sostenible de la especie *C. pubescens* podría ser una estrategia en cuanto a la producción de los principios activos como la quinina, ya que podría disminuir de esta manera el impacto ecológico que genera (Jäger *et al.*, 2007).

Plantas de este género aun son una fuente potencial de quinina y de nuevas plantillas estructurales en la búsqueda de nuevos candidatos antimaláricos (Andrade-Neto *et al.*, 2003). Esto hace necesario que en nuestra región, se exploren nuevas especies de *Cinchona* mediante estudios fitoquímicos que validen la presencia de alcaloides, principalmente en su contenido de quinina, y que se valide su potencial antimalárico como una estrategia de conservación y preservación de especies tan importantes que han contribuido e impactado el desarrollo de la humanidad. En Colombia, se conocen siete especies, la mayoría exclusivas de la región Andina en altitudes por encima de los 1.000 m.s.n.m. Estas especies se encuentran en el piedemonte pacífico del departamento de Nariño y pueden bajar hasta los 100 metros de altitud, entre las especies conocidas se encuentra la especie *Cinchona*

pubescens, la cual ha sido poco estudiada desde un punto de vista químico y biológico (Mendoza *et al.*, 2004). Por lo que en este trabajo, se obtuvieron extractos de diferente polaridad a partir de los tallos de la planta *C. pubescens*, se cuantificó el contenido de quinina presente en estos, se aisló y caracterizó uno de los compuestos de mayor abundancia en el extracto de diclorometano y se determinó el potencial antiplasmodial sobre cultivos continuos de cepas de *P. falciparum* NF-54 sensible a la cloroquina, y su efecto citotóxico en células HepG2, con el fin de contribuir a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la malaria y así mismo, contribuir al fortalecimiento de los estudios de especies de género *Cinchona* como fuente importante de quinina y nuevos antimaláricos naturales, además de promover la conservación y preservación de estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del material vegetal

Cinchona pubescens fue colectada en el municipio de Copacabana situado a 18 Km del norte de la ciudad de Medellín (Antioquia, Colombia), con altitud de 1971 m.s.n.m y una temperatura de 21°C, entre las veredas Sabaneta y Juan Cojo en el sitio del Alto el Lumbi. La identificación de estas especies fue realizada por el botánico Felipe Cardona de la Universidad de Antioquia, especímenes de herbario fueron procesados y depositados en el herbario Universidad de Antioquia (HUA) con el número Voucher (1896).

Preparación de los extractos de diferente polaridad y los extractos de alcaloides totales

El material vegetal (Corteza y tallos) se secó a temperatura ambiente durante 10 días y posteriormente se molieron con un tamaño de partícula de 5mm. Se llevaron inicialmente 611 g del material vegetal molido a un proceso de percolación hasta agotamiento (5 días/3 veces), utilizando etanol (E) destilado como solvente. Posteriormente, se filtró y se concentró el extracto en un rotaevaporador para obtener el extracto etanólico codificado como (CPExtE). Por otra parte, 600g del material molido se sometió a un proceso de extracción con solventes de polaridad ascendente (1000mL) mediante un proceso de percolación hasta agotamiento con cada uno de los siguientes solventes: hexano (H), diclorometano (D), acetato de etilo (A) y metanol (M). Después de tres días se comenzó la concentración del extracto a presión reducida en un

rotoevaporador. El solvente recuperado en el rotoevaporador se agregó nuevamente al material vegetal y se repitió el proceso de extracción tres veces hasta cambiar el solvente. Los cuatro extractos se codificaron con las iniciales de *Cinchona pubescens* y el tipo de extracto (CPExtH, CPExtD, CPExtA, CPExtM) y se monitorearon por

cromatografía de capa delgada con fase estacionaria de Sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck®, mediante sistema de elución diclorometano: metanol (DCM -MeOH; 9:1) y revelando con lámpara ultravioleta UVGL-58 a 254 y 366 nm, revelador universal y reactivo de Dragendorff para determinar la presencia de alcaloides.

Los porcentajes de extracción de los extractos se calcularon según la ecuación:

$$\% \text{ de Extracción} = \frac{\text{Peso Extracto}}{\text{Peso Material Vegetal}} \times 100$$

Preparación del extracto de los alcaloides totales

Una vez se corroboró la presencia de alcaloides en el extracto etanólico se procedió a preparar el extracto de alcaloides totales agregando 200 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 5% sobre el extracto disuelto en diclorometano. La fase acuosa fue alcalinizada con hidróxido de amonio concentrado (5%) (NH₄OH) hasta un pH =9. Se agregó nuevamente diclorometano, se separó la fase orgánica, se filtró sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) como secante y se concentró en un rotavaporador. El extracto de alcaloides totales obtenido se codificó como CPExtAT y se guardó cubierto de la luz y con atmósfera de nitrógeno hasta los ensayos biológicos (Maldoni, 1991).

Método analítico para la identificación, y cuantificación de quinina en los extractos mediante HPLC-DAD y HPLC-DAD-MS

Se validaron y se optimizaron las condiciones de separación de los extractos empleando un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD *Agilent Technology* 1200 series), y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS *Agilent Technology* 1200 series). El método cromatográfico se ha desarrollado para la inyección de quinina, teniendo en cuenta las sugerencias reportadas por MacCalley (2002), donde se modificaron y optimizaron algunas condiciones con lo cual se propone un nuevo método para la identificación de la quinina. Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración con concentraciones seriadas en un rango de 0,0785 - 1000 ppm con sulfato de quinina

(C₂₀H₂₄N₂O₂)H₂SO₄·2H₂O (SIGMA) y se prepararon los extractos (CPExtH, CPExtD, CPExtA, CPExtM, CPExtAT) a una concentración de 3000ppm. Los estándares y extractos fueron disueltos en una solución buffer fosfato (0,06M) – acetonitrilo 95:5 y antes de la inyección fueron filtrados en filtros de Nylon 0.45 μm (hidrofílico) DISMIC-13 NP; 0.39 MPa. ADVANTEC. Se inyectaron por triplicado 20 μL de los estándares y de extractos en el equipo con una columna Luna phenomenon 5u C 18(2) 100Å (250 x 4.60mm x 5μm tamaño de partícula, serie 564054-31) y la lectura se realizó a una longitud de onda de λ = 222 nm. Los solventes de elusión fueron: solución buffer fosfato (0,06M) como solvente (A) y acetonitrilo como solvente (B). La elusión se programó siguiendo el gradiente de solventes a un flujo de 1.0 mL/min de 95% de A y 5% de B durante 15 min. hasta 35% de A y 65% B durante 3 min y de nuevo un gradiente de solvente 35% de A y 65% B hasta 95% de A y 5% de B durante 2 min. El tiempo de corrido fue de 20 min.

Para la cuantificación por espectrometría de masas se cambió la buffer de fosfato por ácido fórmico a pH = 3. La elusión del análisis se realizó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. En el análisis de espectrometría de masas (MS), se usó un equipo con ionización química a presión atmosférica (APCI), en modo positivo, con detector cuadrupolo, la temperatura de vaporización fue de 450 °C y el voltaje fue de 3000 V para el capilar. La identificación de la quinina se llevó a cabo comparando el tiempo de retención con el estándar correspondiente. Para la corriente total iónica se observa la abundancia relativa de iones

moleculares, y los picos mayoritarios se seleccionaron como el ión molecular [M+1].

Aislamiento y purificación del compuesto

El extracto de diclorometano se sometió a cromatografía en columna flash con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF₂₅₄ Merck® empleando gradientes ascendentes de concentración hexano: acetato de etilo y acetato de etilo: metanol y realizando un monitoreo continuo mediante cromatografía de capa delgada. Posteriormente, se le realizó cromatografía en columna flash con fase estacionaria Sílica Gel, iniciando con 100% de hexano y luego con gradientes hexano: acetato de etilo (90:10) hasta un 100% de acetato de etilo. Se obtuvieron 12 fracciones del extracto de diclorometano, que fueron nombradas CPD# 1 - 12. Posteriormente, se realizó cromatografía en capa preparativa a la fracción 8 con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF₂₅₄ Merck® eluido con un sistema de elución DCM- MeOH 9:1 para purificar un compuesto mayoritario presente en este extracto denominado CP1 (80 mg). El compuesto puro aislado de la planta *C. pubescens*, se identificó por técnicas espectroscópicas.

Análisis espectroscópico

Los espectros infrarrojo (IR) se obtuvieron en un equipo Perkin-Elmer RX/FT-IR, modelo 2005 (Spectrum One) con un software Spectrum v.5.3.1 a un rango de 4000-450cm⁻¹. Para el análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro Bruker 300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) como solvente. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) tomando como referencia el TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

Evaluación biológica “in vitro” de los extractos

Ensayos de actividad antiplasmodial

Los ensayos de actividad antiplasmodial *in vitro* se realizaron en la cepa (NF-54) cloroquino sensible (Ponnudurai *et al.*, 1981). La cepa de *P. falciparum* fue mantenida en cultivos continuos en el laboratorio del Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia. Estas cepas fueron cultivadas y mantenidas según el método de Trager and Jensen (1976); usando una suspensión de eritrocitos humanos tipo A+ al 5%, en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma R6504) disuelto en agua estéril con 25 mM de HEPES, 5,0% de NaHCO₃, suero humano fresco tipo A+ al 10%

(inactivado a 56 °C por 30 min); incubado en una atmósfera de 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂. Se realizó cambio de medio diariamente y se adicionaron glóbulos rojos frescos dos veces por semana.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos de fondo plano marca Falcon®. Se preparó una suspensión de glóbulos rojos parasitados con un hematocrito del 2,5% y una parasitemia del 1%. El cultivo con los tratamientos y el control positivo cloroquina (CQ), se incubaron a 37 °C durante 48 horas en atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂. Posteriormente, se transfirió el contenido de cada pozo a platos Greiner Pro one y los parásitos fueron marcados con una solución de SYBR® Green I 2X en buffer de lisis. Los platos se incubaron a temperatura ambiente durante una hora en oscuridad y las unidades relativas de fluorescencia (RFU) fueron leídas en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de excitación de 485nm y de emisión de 538nm. Los tratamientos a partir de cada extracto crudo se prepararon a una solución madre de 10 mg/mL en DMSO puro y se llevaron a ultrasonido para facilitar la disolución. A partir de esta solución, se tomaron 50 µL y se ajustaron hasta 1000 µL con medio RPMI-1640 completo, obteniendo una concentración final de 0,5 mg/mL. La concentración de DMSO en la primera dilución fue de 1% que se ha demostrado no ser tóxica para el parásito. Se evaluaron 7 concentraciones seriales de cada extracto en un rango entre 1,56 - 100 µg/mL, cada concentración se evaluó por duplicado en el plato y se realizaron tres ensayos independientes. El control CQ se evaluó en un rango entre 4,7 - 150 nM. Los datos de tres ensayos, se analizaron con el programa GraphPad Prism 5 para hallar la concentración inhibitoria 50 en µg/mL (IC₅₀) mediante un modelo de regresión logística no lineal. Para clasificar la actividad antiplasmodial de un extracto, el Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia estableció un consenso para los extractos evaluados: altamente activo < 5 µg/mL, promisorios 6-15 µg/mL, moderada actividad 16-30 µg/mL, baja actividad 31-50 µg/mL y no active > 50 µg/mL.

Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar la actividad citotóxica de los extractos se utilizó el método del bromuro 3-(4,5dimetiliazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) según Mosmann (Mosmann, 1983; Bautista *et al.*, 2002), el cual revela daños celulares a nivel mitocondrial. Las células

HepG2 células de hepatoma humano fueron mantenidas en cultivos continuos en el Laboratorio del Grupo Malaria. Estas células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ en medio RPMI suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado. Los cambios de medio, se realizaron cada 48 horas o de acuerdo a los cambios de pH del medio, con centrifugación por 10 min a 1000 rpm, reemplazando con medio nuevo (Moore *et al.*, 1967).

En cámara de Neubauer se contaron las células HepG2 y se sembraron en una placa de 96 pozos de fondo plano 200, 000 células /mL en medio RPMI 1640 con 10% SBF. Se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ durante 72 horas en presencia de cada una de las siete concentraciones de cada extracto evaluadas en un rango entre 1,56 - 100 µg/mL, cada concentración se evaluó por duplicado en el plato y se realizaron tres ensayos independientes. El control positivo fue el medio de cultivo y el control negativo fue la anfotericina evaluada en un rango entre 1,56 - 100 µg/mL, la concentración de DMSO no fue tóxica para la máxima concentración evaluada al 1%. Posteriormente, se midió la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, adicionando 20 µL/pozo de MTT a una concentración de 5 mg/mL e incubando durante 3 horas a 37 °C y 5% CO₂. Para

disolver los cristales formados, se adicionaron 100 µL/pozo de una solución al 50% de isopropanol y 10% de SDS y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA (BioRad). Los datos obtenidos de tres ensayos independientes se analizaron con el programa GraphPad Prism 5 para hallar la concentración tóxica en µg/mL (CC₅₀) mediante un modelo de regresión logística no lineal (Reed *et al.*, 2002). Para clasificar la citotoxicidad del extracto, el Grupo de Malaria de la Universidad de Antioquia estableció un consenso para las muestras evaluadas: altamente tóxico < 10 µg/mL, citotóxico 10-40 µg/mL, moderadamente citotóxicos 41-100 µg/mL y no citotóxicos > 100 µg/mL. Adicionalmente, se calculó el índice de selectividad (IS), el cual indica la selectividad hacia el parásito y corresponde a la relación entre la actividad citotóxica CC₅₀ y actividad antiplasmodial IC₅₀; valores de IS superior a 2 se consideraron extractos promisorios.

RESULTADOS

Los rendimientos de la extracción, la concentración de quinina en partes por millón (ppm), los valores de IC₅₀ y CC₅₀ con el índice de selectividad de los diferentes extractos y el compuesto CP1 se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1
Contenido de quinina en los extractos y su actividad antiplasmodial y citotóxica

Extracto	% rendimiento	Concentración de quinina presente en cada extracto ([Q ppm]± SD)	IC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	IS***
			X ± SD*	X ± SD	
			Cepa de <i>P. falciparum</i> NF-54**	Línea Celular HepG2	
CPExtH	0,13	0,640 ± 0,00127	7,16 ± 0,214	37,1 ± 4,33	5,18
CPExtD	0,51	1,58 ± 0,0323	4,79 ± 0,651	39,1 ± 7,91	7,45
CPExtA	1,08	2,11 ± 0,0766	16,10 ± 0,716	107 ± 6,79	5,05
CPExtM	1,32	2,21 ± 0,0485	8,54 ± 0,742	167 ± 4,45	18,43
CPExtE	1,49	NE	7,50 ± 1,160	100 ± 14,7	12,04
CPExtAT	0,044	21,3 ± 0,0247	2,20 ± 0,033	80,2 ± 12,2	36,48
ácido oxoquinínico (CP1)	NE	---	11,3 ± 0,741	72,4 ± 3,85	6,43

*X (Media) ± SD (Desviación estándar); **Control positivo Cloroquina IC₅₀= 23,9 ± 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 (µg/mL) / IC₅₀ (µg/mL); Clasificación de la actividad antiplasmodial: altamente activo < 5 µg/mL, promisorios 6-15 µg/mL, moderada actividad 16-30 µg/mL, baja actividad 31-50 µg/mL y no activo > 50 µg/mL. Clasificación de la actividad citotóxica: altamente tóxico < 10 µg/mL, citotóxico 10-40 µg/mL, moderadamente citotóxicos 41-100 µg/mL y no citotóxicos > 100 µg/mL.; NE: No evaluado; ND: No determinado

De la planta *C. pubescens* se obtuvieron cinco extractos de diferente polaridad (hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y etanol). Los porcentajes de material extractable mostraron mejores rendimientos para el extracto etanólico de *C. pubescens* con 1,49%, y para los extractos de diferente polaridad los mejores rendimiento se obtuvieron para el extracto metanólico con un 1,32%. Ninguna asociación se encontró entre los rendimientos de extracción y las pruebas biológicas que se realizaron.

Se procedió a estandarizar el método para la identificación y cuantificación de la quinina en los diferentes extractos. La linealidad de la respuesta se determinó preparando soluciones con concentraciones de sulfato de quinina en un rango de 0,078125-1000 ppm e inyectando cada una de ellas por triplicado en el sistema HPLC-DAD. Mediante el método de interpolación, en la curva, se determinaron las concentraciones de quinina presente en cada uno de los extractos a partir de la ecuación de la curva. Se promediaron los tiempos de retención, las áreas de pico medias y los valores de la desviación estándar

relativa (DER) inferiores al 2%, lo que confirmó la precisión del sistema analítico. El contenido en ppm de quinina en cada uno de los extractos se presenta en la tabla 1. La fase móvil resolvió la quinina con gran eficiencia a un tiempo de retención $t_R=8.863$ min, con un tiempo de elusión inferior a 20 min (Figura 1). A partir de la pendiente de los resultados se calcularon los coeficientes de intercepción y de correlación (r^2). Al aplicar el método propuesto, se siguió la linealidad en el rango de concentración evaluada, y el coeficiente de correlación fue 0,9998 indicando una buena linealidad entre la concentración y el área pico. El valor de la pendiente 47,463, indicó la sensibilidad del método cromatográfico por HPLC. Se evidenció la presencia de quinina en todos los extractos de la planta colectada en Copacabana-Antioquia. Un alto contenido de quinina se determinó en el extracto de alcaloides totales con $[21,3 \pm 0,0247$ ppm], seguido de los extractos de metanol $[2,21 \pm 0,0485$ ppm], acetato de etilo $[2,11 \pm 0,0766$ ppm] y diclorometano $[1,58 \pm 0,0323$ ppm]. La menor concentración de quinina $[0,640 \pm 0,00127$ ppm] se determinó en el extracto de más baja polaridad (hexano).

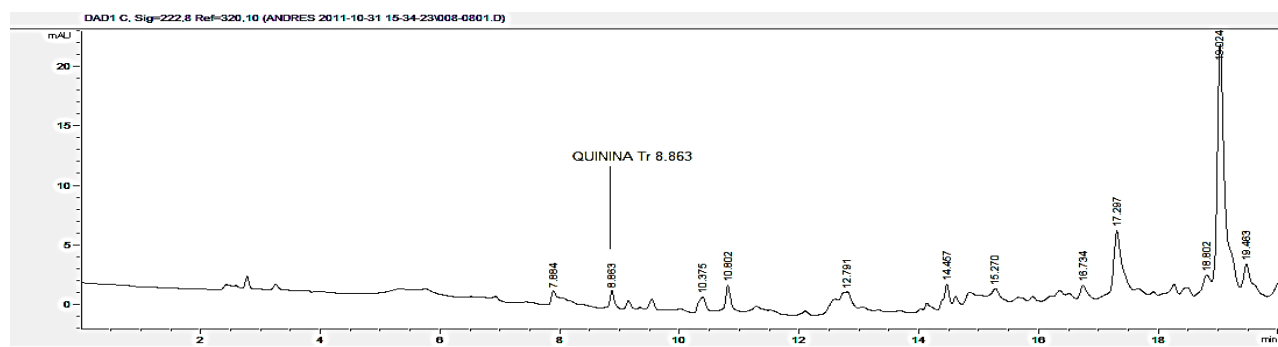


Figura 2
Perfil cromatográfico del extracto de hexano con un tiempo de retención para la quinina de t_R 8,863 min

Otros compuestos en los extractos mediante análisis de la corriente total iónica (TIC) en HPLC-DAD-MS

Se logró identificar el tiempo de retención de la quinina y otros metabolitos relacionados en su biogénesis de alcaloides mayoritarios y minoritarios que contiene las Cinchonas. La fase móvil resolvió la quinina con gran eficiencia con un promedio de tiempo de retención $t_R = 7,192$ min y un ión molecular de $[M+1] = 325,2$, con un tiempo de elusión inferior a 20 min. Los cromatogramas y

fragmentogramas típicos de los extractos se muestran en la figura 2. Uno de los metabolitos de gran interés es la triptamina con un tiempo de retención de 7,735min y un ión molecular de $[M+1] = 205,2$. Otros metabolitos relacionados en la biogénesis de los alcaloides de esta especie, los cuales se pudieron comparar con las relaciones masa/carga según la literatura son la emetina con un $t_R = 9,830$ y un $[M+1] = 455,4$ y el ácido quinolínico con un ión molecular $[M+1] = 173,2$ con un $t_R = 13,47$ (Leete *et al.*, 1968).

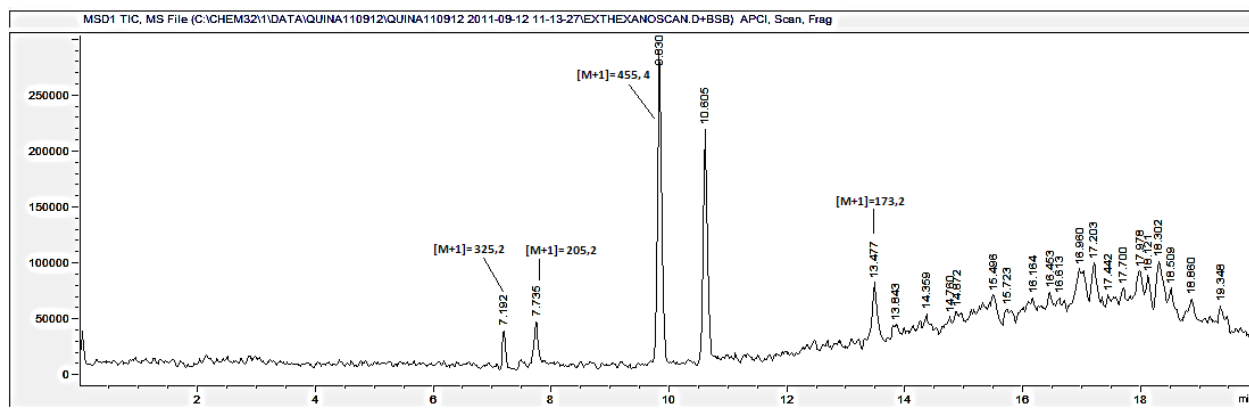


Figura 3
Corriente total iónica del extracto de hexano con un tiempo de retención para la quinina de t_R 7.192 min

Caracterización del compuesto ácido oxoquinínico:
Del extracto de diclorometano se aisló un sólido blanco, amorfo, con un punto de fusión de 165° C y

fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_5$, identificado como ácido oxoquinínico (Figura 3).

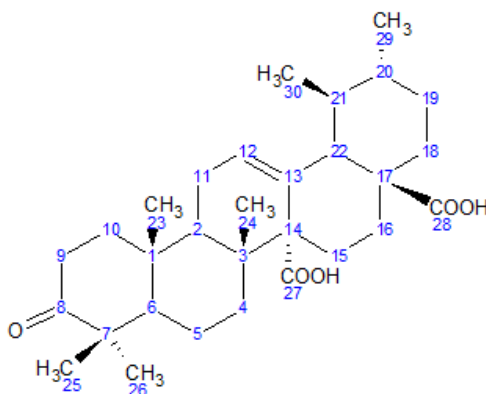


Figura 4
Estructura del ácido oxoquinínico

Datos espectroscópicos

IR ν (cm^{-1}) 3394; 2640; 2949; 1688; 1457; 1357. 1H RMN δ (ppm): 1,9 (m, J= Hz, 1H, H-1); 1,68 (m, J= Hz, 1H, H-4 y H-5); 1,34 (m, H-6); 2,69 (d, J= 10Hz, H-22); 5,50 (t, J: 3Hz H-12); 2,16 (m, H-15 y H16); 1,64 (m, H-18); 1,67 (m, H-19); 1,87 (m, H-21); 2,69(m, H-22); 1,04 (s, 3H, H-23); 1,16 (s, 3H, H-24); 1,07 (s, 3H, H-25); 1,00 (s, 3H, H-26); 0,90 (d, J= 6,5 Hz, 3H, H-29); 0,83 (d, J= 6,2 Hz, 3H, H-30). ^{13}C RMN δ (ppm) (DEPT 135): 37,1 (C1); 46,2 (C2); 39,2 (C3); 39,9 (C4); 19,9 (C5); 54,9 (C6); 47,1 (C7); 216,3 (C8); 34,2 (C9); 39,4 (C10); 23,4 (C11); 129,7

(C12); 135,6 (C13); 56,3 (C14); 27 (C15); 24,3 (C16); 46,39 (C17); 33,3 (C18); 37,8 (C19); 37,4 (C20); 43,6 (C21); 52,2 (C22); 21,4 (C23); 18,7 (C24); 26,8 (C25); 16,6 (C26); 177,5 (C27); 180,6 (C28); 32,1 (C29); 21,19 (C30).

Se determinó el crecimiento del parásito en presencia del extracto y/o compuesto sobre la cepa de *P. falciparum* NF-54 cloroquina-sensible. Los valores de IC_{50} de la actividad antiplasmodial y los valores de CC_{50} de la actividad citotóxica de los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, etanol, alcaloides totales y del compuesto CP1 (ácido

oxoquinóvico) con el índice de selectividad que se presentan en la tabla 1 y se clasificaron según el potencial antiplasmodial establecido por nosotros en el Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia. Para las 8 muestras analizadas se encontró una adecuada relación dosis respuesta, en ambos ensayos y el control positivo cloroquina presentó un valor promedio sobre la cepa de *P. falciparum* NF-54 de $IC_{50} = 23,9 \pm 2,78$ nM. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que todas las muestras evaluadas poseen un potencial antiplasmodial. En cuanto a la actividad antiplasmodial de los extractos obtenidos a partir de *C. pubescens*, el extracto de alcaloides totales presentó una alta actividad antiplasmodial ($IC_{50} = 2,20 \pm 0,0325$ $\mu\text{g/mL}$), 4 extractos presentaron promisoría actividad y un extracto presentó moderada actividad, el compuesto evaluado CP1 (ácido oxoquinóvico), presentó promisoría actividad con una $IC_{50} = 11,3 \pm 0,741$ $\mu\text{g/mL}$, y una $CC_{50} = 72,4 \pm 3,85$ $\mu\text{g/mL}$, los extractos de etanol y metanol presentaron una promisoría actividad antiplasmodial ($IC_{50} = 7,50 \pm 1,16$ $\mu\text{g/mL}$ y $IC_{50} = 8,54 \pm 0,74$ $\mu\text{g/mL}$), además, estos extractos presentan una baja toxicidad ($CC_{50} = 100 \pm 14,7$ $\mu\text{g/mL}$ y $CC_{50} = 167 \pm 4,45$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) y, su actividad sugiere la presencia de uno o más metabolitos activos, por lo que se debe realizar un ensayo biodirigido con estos extractos para buscar nuevos metabolitos de interés farmacológico. Otras especies de este mismo género como *Cinchona succirubra*, han presentado una actividad moderada $IC_{50} \leq 10$ $\mu\text{g/mL}$ sobre cepas de *P. falciparum* resistente a la cloroquina (Madureira et al., 2002). Para los ensayos de citotoxicidad, el control negativo fue el medio de cultivo y el control positivo fue la anfotericina que presentó toxicidad en la línea celular HepG2 a concentraciones mayores de 10 $\mu\text{g/mL}$, la concentración de DMSO no fue tóxica para la máxima concentración 1%, todas las muestras analizadas presentaron una buena relación dosis respuesta. Todos los extractos fueron altamente selectivos con un $IS > 2$, indicando la selectividad del extracto hacia el parásito y no hacia la célula hospedera.

DISCUSIÓN

Las últimas publicaciones referidas a *C. pubescens* tratan la parte cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en esta especie, en los cuales hay presencia de la quinina como uno de los metabolitos, tipo alcaloide, característico de este

género (Condor et al., 2009). En la actualidad, son pocos los reportes que se realizan de estas plantas, un número de procedimientos cromatográficos diferentes han sido desarrollados para la determinación cualitativa y cuantitativa de quinina (MaCalley et al., 2002). El análisis de estos compuestos en una variedad de matrices se realiza mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa, utilizando columnas C18 en combinación con fases móviles ácidas, y la detección mediante ultravioleta visible (UV). Sin embargo, se deben tomar precauciones debido a las fuertes interacciones silanofílicas que pueden ocurrir con estos analitos y la superficie de la columna, que pueden conducir a una pobre resolución. El método validado de cromatografía líquida de alto rendimiento propuesto en este manuscrito para la determinación de la quinina en muestras complejas como extractos, presentó una buena resolución de sus componentes demostrándose que el método es sensible, selectivo y reproducible en dos tipos de detectores (DAD y MS). Por tanto, se puede adoptar fácil y cómodamente como un método para la determinación de quinina no sólo en la especie *C. pubescens* sino para otras especies de este mismo género, incluso para posteriores estudios farmacológicos, e incluso como un método de identificación de los principales componentes de especies de género *Cinchona* en diversos procesos biotecnológicos que incluyen órganos de las plantas obtenidos mediante cultivo celular *in vitro* (Verpoorte et al., 1988; Verpoorte et al., 1991).

Otros metabolitos como el ácido quinóvico y oxoquinóvico son característicos de distintos géneros de la familia de la Rubiaceae. El estudio de la especie *Randia echinocarpa* Moc. et Sessé ex DC. (Rubiaceae) permitió la obtención de varios metabolitos como el manitol, sitosterol y los ácidos quinóvico, oxoquinóvico, ursólico y oleanólico (Bye et al., 1991). De las sustancias químicas aisladas, solamente el manitol es un osmодиурético, hasta el momento no se ha reportado en la literatura la actividad biológica del metabolito ácido oxoquinóvico, lo que motiva los estudios en la búsqueda de sustancias antimaláricas con este núcleo químico. Los resultados de este trabajo motivan los estudios fitoquímicos en la búsqueda de principios activos y análogos estructurales en diferentes especies de *Cinchonas* como una fuente de nuevos agentes antimaláricos.

CONCLUSIONES

Un nuevo método se propone para la identificación y cuantificación de la quinina y otros metabolitos en muestras complejas. Es un método fácil y cómodo de aplicar no sólo en la especie *C. pubescens* sino para otras especies de este mismo género, incluso para otro tipo de matrices y estudios. Por primera vez se reporta promisorio actividad antiplasmodial del metabolito ácido oxoquinóvico, lo que motiva los estudios en la búsqueda de sustancias antimaláricas con este tipo de núcleo químico en el desarrollo de nuevos antimaláricos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Ministerio de Agricultura de Colombia proyecto (N° 009-2007-V7552-38-07), a la Universidad de Antioquia por el programa de sostenibilidad 2011-2012. A la microbióloga Claudia Barbosa por los ensayos de actividad antiplasmodial y citotóxica.

REFERENCIAS

- Andrade-Neto V, Brandão M, Stehmann J, Oliveira L, Krettlí A. 2003. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used totreat fever and malaria in Brazil. **J Ethnopharmacol** 87: 253 - 256.
- Bautista C, Acosta E, Toledo I. 2002. Evaluación del bioensayo del MTT Para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino frescos y congelados. **Vet Mex** 31: 1 - 8.
- Bye R, Linares E, Mata R, Albor C, Castañeda PC, Delgado G. 1991. Ethnobotanical and phytochemical investigation of *Randia echinocarpa* (Rubiaceae). **An Inst Biol Univ Nac Autonoma México Bot** 62: 87 - 106.
- Condor E, Oliveira B, Ochoa K, Pinedo V. 2009. Estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens* Vahl. **Rev Soc Quím Perú** 75: 54 - 63.
- Fernández J, Jiménez C, Fonfria J. 2004. **Las quinas de Caldas**. UCM, Madrid, I.E.S. Santa Teresa de Jesús, Madrid. Actas VIII del Congreso de la Sociedad Española de la Historia de las Ciencias y las Técnicas, Madrid, España.
- Jaramillo T, Cornejo X, Pitman N. 2004. *Cinchona rugosa*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. www.iucnredlist.org

Downloaded on 19 February 2013

- Jäger H, Tye A, Kowarik I. 2007. Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (*Cinchona pubescens*) trees on native vegetation in Galápagos. **Biol Conservation** 140: 297 - 307.
- Leete E. 1969. Biosynthesis of Quinine and Related Alkaloids. **Acc Chem Res** 2: 59 - 64.
- Madureira M, Martins A, Gomes M, Paiva J, Proença Cunha A, Rosario V. 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. **J Ethnopharmacol** 81: 23 - 29.
- Maldoni B. 1991. Alkaloids Isolation and Purification. **J Chem Educ** 68: 700 - 703.
- McCalley D. 2002. Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. **J Chromatograph A** 967: 1 - 19.
- Mendoza H, Ramírez B, Jiménez LC. 2004. **Rubiaceae de Colombia. Guía ilustrada de géneros**. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.
- Moore G, Gerner R, Franklin H. 1967. Culture of normal human leukocytes. **JAMA** 199: 519 - 524.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Method** 65: 55 - 63.
- Ponnudurai T, Leeuwenberg A, Meuwissen J. 1981. Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to *in vitro* culture. **Trop Geogr Med** 33: 50 - 54.
- Raheem I, Goodman S, Jacobsen E. 2004. Catalytic asymmetric total syntheses of quinine and quinidine. **J Am Chem Soc** 126: 706 - 707.
- Reed G, Lynn F, Meade B. 2002. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. **Clin Diagn Lab Immunol** 9: 1235 - 1239.
- Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Benoit-Vical F, Meunier B. 2002. Recent Advances in Malaria Chemotherapy. **J Chin Chem Soc** 49: 301 - 310.
- Trager W, Jensen J. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. **Science** 193: 673 - 675.
- Verpoorte R, Van der L, Gulik V, Hoopen T. 1991. **Plant Biotechnology for the production**

- alkaloids: present status and prospects.** In A. Brossi edit.: *The Alkaloids*, Vol. 40, (Ed) Academic Press, San Diego Inc., USA.
- Verpoorte R, Schripsema J, Van der L. 1988. **Cinchona Alkaloids**, In A. Brossi edit.: *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*, Vol. 34, (Ed) Academic Press, San Diego Inc., USA.
- Vipani K, Mahajan A, Chibale K. 2009. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. **Bioorg Med Chem** 17: 2236 - 2275.
- WHO (World Health Organization). 2011. **World Malaria Report 2011**. WHO (World Health Organization). 2011. *World Malaria Report 2011*. Ginebra, Suiza.