

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL



CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES DE *Ladenbergia oblongifolia*
(Humb. Ex Mutis) L. Andersson, DISTRITO PUEBLO NUEVO,
PROVINCIA LEONCIO PRADO

Tesis

Para optar el Título de:

INGENIERO FORESTAL

PRESENTADO POR:

SANTISTEBAN VILCA, EDREY CARLOS

Tingo María - Perú

2023



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María- Perú
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N°098-2023-FRNR-UNAS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 09 de noviembre de 2023, a horas 10:05 a.m. de la Escuela Profesional de Ingeniería Forestal de la Facultad de Recursos Naturales Renovables para calificar la tesis titulada:

“CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES DE *Ladenbergia oblongifolia* (Humb. Ex Mutis) L. Anderson, DISTRITO PUEBLO NUEVO, PROVINCIA LEONCIO PRADO”


Presentado por el Bachiller: **SANTISTEBAN VILCA, EDREY CARLOS**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara **APROBADO** con el calificativo de “MUY BUENA”.

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, Tramitándolo al Consejo Universitario para el otorgamiento del Título Correspondiente.

Tingo María, 13 de noviembre de 2023


Ing. M. Sc. LAURIANO A. ZAVALTA DE LA CRUZ
PRESIDENTE


Ing. M. Sc. WILFREDO TELLO ZEVALLOS
MIEMBRO


Ing. M. Sc. GUNTER DAZA PANDURO
MIEMBRO




Dra. TANIA ELIZABETH GUERRERO VEJARANO
ASESOR


Ing. M. Sc. FELIX ANDY EUGENIO QUIROZ
ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL



CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES DE *Ladenbergia oblongifolia* (Humb. Ex Mutis) L. Andersson, DISTRITO PUEBLO NUEVO, PROVINCIA LEONCIO PRADO

Autor : SANTISTEBAN VILCA, Edrey Carlos

Asesor (es) : Dra. GUERRERO VEJARANO, Tania Elizabeth

Ing. EUGENIO QUIROZ, Félix Andy

Programa de investigación : Ciencias Básicas Forestales (Química, Física, Anatomía, Biotecnología Forestal)

Línea de investigación : Química Forestal

Eje temático : Fitoquímica

Lugar de ejecución : Universidad Nacional Agraria de la Selva – Tingo María

Duración : 10 MESES

Financiamiento : S/. 3561.8

Tingo María – Perú

2023

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACION
OFICINA DE INVESTIGACION**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

**REGISTRO DE TESIS PARA LA OBTENCION DEL
TITULO UNIVERSITARIO, INVESTIGACIÓN DOCENTE
Y TESIS TA**

(Resol. N° 113-2019-CU-R-UNAS)

I. Datos Generales de Pregrado

Universidad : Universidad Nacional Agraria de la Selva.
Facultad : Facultad de Agronomía.
Título de tesis : Cuantificación de alcaloides de *Ladenbergia oblongifolia* (Humb. Ex Mutis) L. Andersson, distrito Pueblo Nuevo, provincia Leoncio Prado
Autor : Bach. Santisteban Vilca, Edrey Carlos
Asesor (es) de tesis : Dr. Guerrero Vejarano, Tania Elizabeth
Ing. Eugenio Quiroz, Félix Andy
Escuela Profesional : Forestal
Programa de investigación : Ciencias Básicas Forestales (Química, Física, Anatomía, Biotecnología Forestal)
Línea(s) de investigación : Química Forestal
Eje Temático : Fitoquímica
Lugar de ejecución : Universidad Nacional Agraria de la Selva
Duración : Inicio : Octubre 2022
Término : Julio 2023
Financiamiento : FEDU : S/0.00
Propio : S/3561.8
Otros : S/0.00

Tingo María, Perú, agosto 2022.

Santisteban Vilca Edrey
Carlos
Tesis ta

Dr. Guerrero Vejarano,
Tania Elizabeth
Asesor

Ing. Eugenio Quiroz,
Félix Andy
Asesor

DEDICATORIA

A dios, por el regalo de la vida. En cada paso que he dado él me ha acompañado y guiado, me ha brindado sabiduría para afrontar cada reto, sin él nada sería posible.

A mi padre Maximiliano Santisteban Domínguez y a mi madre Antonia Vilca Ávila, quienes me han brindado su apoyo incondicional desde que tengo memoria, gracias por estar en los momentos difíciles, gracias por ser mi ejemplo a seguir, estaré profundamente agradecido por cada sacrificio que han realizado para verme sobresalir y superar los obstáculos de la vida, no puedo expresar todo lo que siento por ustedes en palabras, estoy muy agradecido.

A mis hermanas, Carmen, Maira, Flor y Alelhi, por bríndame su apoyo y cariño incondicional, además por ser mi fuente más confiable de consejos, estoy agradecido con la vida por haberme premiado con hermanas tan maravillosas.

AGRADECIMIENTOS

A dios, por ser mi guía en cada etapa de mi formación profesional.

A mi familia, por ser mi fortaleza y apoyarme en todo momento, sin su cariño y constante motivación no hubiese sido posible cumplir mis metas.

A mi alma mater Universidad Nacional Agraria de la Selva por haberme formarme como profesional.

A todo el personal docente y administrativo de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, en especial a la Escuela Profesional de Ingeniería Forestal, quienes me brindaron conocimientos y enseñanzas para poder desarrollarme como un buen profesional.

A mis asesores, Dr. Tania Elizabeth Guerrero Vejarano e ing. Félix Andy Eugenio Quiroz por el tiempo dedicado y por su sólida orientación en este trabajo de investigación.

Al ing. Fernando Laza, por su apoyo en el procesamiento de los extractos de las muestras.

A la señora Consuelo e Ing. Roy Reategui, quienes ejercen como personal técnico del laboratorio de Fitoquímica Forestal, gracias por su constante apoyo en el desarrollo experimental de la investigación.

A mis amigos, por formar parte de esta etapa universitaria, hemos pasado por muchas dificultades académicas, muchas experiencias compartidas, pero siempre apoyándonos unos a los otros.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. Objetivo general	2
1.1.2. Objetivo específico	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Marco teórico	3
2.1.1. El árbol de la quina	3
2.1.2. Descripción botánica	3
2.1.3. Taxonomía	4
2.1.4. Propagación del árbol de la quina	5
2.1.5. Usos medicinales de la quina	5
2.1.6. Alcaloides	6
2.1.7. Acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas	7
2.1.8. Cromatografía en capa fina (CCF)	10
2.2. Estado del arte	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Lugar de ejecución	16
3.1.1. Ubicación política	16
3.1.2. Ubicación geográfica	16
3.2. Materiales y equipos	17
3.2.1. Material de uso común de laboratorio	17
3.2.2. Reactivos	17
3.2.3. Equipos	17
3.2.4. Material vegetal	17
3.3. Métodos	18
3.3.1. Secado y triturado de las muestras	18
3.3.2. Identificación de alcaloides por CCF	19
3.3.3. Preparación de estándares de los cuatro alcaloides de interés de <i>L. oblongifolia</i> para GC/MS	20
3.3.4. Extracción de alcaloides para análisis con GC-MS	21

3.3.5. Análisis GC-MS	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Identificación de los alcaloides mediante CCF	25
4.2. Identificación y cuantificación de los alcaloides de <i>L. oblongifolia</i> mediante CG/MS	28
V. CONCLUSIONES	33
VI. PROPUESTAS A FUTURO	34
VII. REFERENCIAS	35
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación taxonómica de <i>Ladenbergia oblongifolia</i> (Humb. ex Mutis) L. Andersson	4
2. Polaridades de la fase estacionaria para CCF	11
3. Coordenadas UTM de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.....	16
4. Datos de peso inicial, peso anhidro y %CH de las muestras de hojas, corteza y raíz de <i>L. oblongifolia</i>	18
5. Concentraciones en ppm de los estándares para CCF.	19
6. Rf de los alcaloides de interés calculados por la Cuarta directiva de la comisión (CEE) 58/490.	20
7. Preparación inicial de las soluciones de alcaloides puros.	20
8. Datos numéricos de la composición de los 7 estándares de los alcaloides de la quina.	21
9. TR promedio de los estándares calculados en el GC/MS.....	21
10. Peso seco o anhidro calculado al descotar la humedad a cada peso inicial de las muestras de <i>L. oblongifolia</i>	22
11. Volumen de diclorometano recuperado para cada extracto.....	23
12. Cálculo del Rf para los cuatro alcaloides de interés de la especie <i>L. oblongifolia</i> usando los patrones puros.....	25
13. Identificación de los alcaloides de interés de <i>L. oblongifolia</i> en corteza, hojas y raíz.....	26
14. Cuantificación de los alcaloides presentes en hojas de <i>L. oblongifolia</i>	28
15. Identificación y cuantificación de alcaloides en corteza de <i>L. oblongifolia</i>	30
16. Datos de los estándares de quinina, quinidina, cinchonina y cinconidina.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Moléculas quinolónicas de mayor importancia aisladas del extracto de la quina.....	7
2. Imagen representativa de proceso de CCF dentro de la cámara de desarrollo.....	10
3. Esquema de la placa cromatográfica CCF, para poder determinar el valor Rf.	12
4. Mapa de ubicación de la zana de trabajo.....	16
5. Componentes del equipo Soxhlet.	22
6. Placa cromatográfica del extracto de hojas y los cuatro patrones.	26
7. Placa Cromatográfica del extracto de corteza y los cuatro patrones.	27
8. Placa cromatográfica del extracto de raíz y los cuatro patrones.....	27
9. Cromatograma del extracto de hojas de <i>L. oblongifolia</i> en el GC/MS.....	29
10. Cromatograma del extracto de corteza de <i>L. oblongifolia</i> en el GC/MS.	31
11. Cromatograma del extracto de raíz de <i>L. oblongifolia</i> en el GC/MS.....	32
12. Figuras de los estándares de quinina, quinidina, cinconina y cinconidina.	43
13. Cromatograma del corrido de la muestra de hojas en modo scan.	44
14. Constancia de identificación de muestras botánicas de <i>L. oblongifolia</i>	45
15. Desarrollo anual de altura de la plantación de quina con 8 años de instalación.....	46
16. Desarrollo anual de diámetro de la plantación de quina (<i>L. oblongifolia</i>) con 8 años de instalación.....	46
17. Extracción de muestra de corteza de un individuo de <i>L. oblongifolia</i>	47
18. Muestra de hojas de <i>L. oblongifolia</i>	47
19. Extracción de muestra de corteza de <i>L. oblongifolia</i> de un segundo individuo.	48
20. Muestra de raíz de <i>L. oblongifolia</i>	48
21. Corte transversal de la muestra de raíz de <i>L. oblongifolia</i>	49
22. Secado en estufa de las muestras de <i>L. oblongifolia</i>	49
23. Triturado de muestras de corteza de <i>L. oblongifolia</i>	50
24. Alcaloides puros de quinina, quinidina, cinconina y cinconidina.	50
25. Inicio del proceso de extracción de alcaloides en el baño de ultrasonido para análisis de CCF.	51
26. Placa cromatográfica dentro de la cámara corrido.	51
27. Pesado de la muestra de corteza para la extracción en el equipo Soxhlet.	52
28. Instalación del equipo Soxhlet.....	52
29. Pesado de alcaloide puro (quinidina) en la balanza analítica.	53
30. Medición del pH luego de haber agregado hidróxido de amonio a la solución ácida.	53

31. Separación del extracto de alcaloides (diclorometano) y el residuo acuoso.	54
32. Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrometría de masas GC/MS.....	54

RESUMEN

Las plantas medicinales se han usado desde tiempos ancestrales para tratar diferentes enfermedades, este es el caso del grupo de las quinas, tal como la especie *Ladenbergia oblongifolia*; la quina o cascarilla fue explotado con la finalidad de tratar la malaria, aquí surge una problemática debido a que se puso en peligro la especie por la sobreexplotación, como alternativa para resolver esta problemática surge la idea de aprovechar los individuos de plantaciones forestales, este estudio tuvo como finalidad cuantificar los alcaloides de la especie *L. oblongifolia* perteneciente a una plantación de 8 años de edad, primero se realizó la identificación de los alcaloides mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF), el cual nos brindó los siguientes resultados: para el extracto de hojas se identificó la quinina ($R_f = 0,226$) y quinidina ($R_f = 0,426$), en el extracto de corteza se identificó solo la cinconidina ($R_f = 0,386$), mientras que en el extracto de raíz no se detectó ninguna mancha; como segunda fase se realizó el análisis en el Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS) en el cual para el extracto de hojas se obtuvo el siguiente resultado: la quinina tiene $12,6614 \mu\text{g/g}$ de muestra, quinidina tiene $3,7019 \mu\text{g/g}$ y la cinconina tiene $2,7330 \mu\text{g/g}$, no se logró identificar ni cuantificar el alcaloide de la cinconidina; en el extracto de corteza se determinó: $2,0364 \mu\text{g/g}$ de cinconina y $3,0220 \mu\text{g/g}$ de cinconidina, el alcaloide de la quinina y quinidina están ausentes en este extracto; finalmente en el extracto de raíz no se logró identificar ningún alcaloide.

Palabras clave: Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS), *Ladenbergia oblongifolia*, alcaloide.

ABSTRACT

Medicinal plants have been used since ancestral times to treat different diseases, which is the case of the quinine group, such as the *Ladenbergia oblongifolia* specie. Quinine or cascarilla was exploited with the purpose of treating malaria, but that is where the problem began, due to the fact that the specie was put in danger due to its overexploitation. An alternative that came about for resolving this problem was the idea of taking advantage of specimens from forest plantations. The purpose of this study was to quantify the alkaloids for a *L. oblongifolia* specie, belonging to an eight year old plantation. First an identification of the alkaloids was done through thin-layer chromatography (TLC; CCF in Spanish); this offered the following results: for the extract of the leaves, the quinine ($R_f = 0.226$) and quinidine ($R_f = 0.426$) were identified, and for the extract from the bark, only the cinchonidine was identified ($R_f = 0.386$). Meanwhile, for the extract from the roots, no stains were detected. In the second phase, an analysis of the gas chromatograph coupled with mass spectrometry (GC-MS) was done, from which the following results was obtained for the extract from the leaves: the quinine was $12.6614 \mu\text{g/g}$ of the sample, the quinidine was $3.7019 \mu\text{g/g}$, and the cinchonine was $2.7330 \mu\text{g/g}$; it was not possible to identify nor quantify the alkaloid from the cinchonidine. For the extract from the bark, it was determined that there were $2.0364 \mu\text{g/g}$ of cinchonine and $3.0220 \mu\text{g/g}$ of cinchonidine; the alkaloid from the quinine and quinidine were absent from this extract. Finally, for the extract from the roots, it was not possible to identify any alkaloids.

Keywords: thin-layer chromatography (TLC; CCF), gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), *Ladenbergia oblongifolia*, alkaloid

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido usadas desde hace miles años, estas fueron uno de los medios más usados en la lucha contra enfermedades, incluso, en la actualidad no debemos de hacer a un lado el uso de estas plantas, muchas de ellas aun no son estudiadas a profundidad y por ende no somos capaces de aprovecharlos. Los alcaloides están presentes en muchas de estas plantas medicinales, estos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas a través de aminoácidos.

La quina es una planta medicinal que contiene alcaloides, uno de los más importantes presentes en la quina es la quinina, este es un alcaloide que tomó importancia debido a que fue usada para tratar la malaria, enfermedad que fue mortal durante mucho tiempo; debido a esto la explotación de la quina fue una actividad meramente extractiva y muy destructiva, ya que se derribaban los árboles silvestres para aprovechar su corteza; esto generó que en los sectores más aprovechados los árboles escasearan.

El grupo de árboles denominados como quina pertenecen en su mayoría a los géneros *Cinchona* y *Ladenbergia*, justamente, la diversidad que existe en este grupo genera interrogantes con respecto al tipo y cantidad de alcaloides presentes en cada especie del grupo de las quininas, además, los alcaloides en la plantas pueden estar en mayor o menor concentración dependiendo de muchos factores, entre ellos se encuentra la madures del individuo; también, tenemos que considerar que la parte de las quininas que se aprovecha es la corteza del árbol y hojas, pero no existen estudios que demuestren que en raíces no estén presentes los alcaloides de interés comercial, por lo expuesto en líneas anteriores, se plantea el siguiente problema: ¿Cuáles son los alcaloides y en qué cantidad están presentes en hojas, corteza y raíces de individuos de *Ladenbergia oblongifolia* provenientes de una plantación de 8 años de edad?.

La investigación brindará diversos alcances como, por ejemplo: la cantidad de alcaloides presentes en la especie *L. Oblongifolia* de individuos cuya edad es conocida, de tal manera que podremos tener una idea con respecto al aprovechamiento de plantaciones de quina, además, podremos saber la cantidad de alcaloides presentes en hojas, corteza y raíz, esto podría ayudar a que se aproveche todas las partes del árbol.

Habiendo revisado diferentes artículos relacionados al tema, se plantea la siguiente hipótesis: los individuos de *L. oblongifolia* provenientes de una plantación de 8 años de edad tienen presencia de quinina, quinidina, cinconina, cinconidina en hojas, corteza y raíz.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Cuantificar alcaloides en corteza, hojas y raíces de *Ladenbergia oblongifolia* proveniente de una plantación de 8 años

1.1.2. Objetivo específico

- Identificar los alcaloides presentes en la especie *L. oblongifolia* mediante cromatografía de capa fina (CCF)
- Cuantificar los alcaloides presentes en hojas, corteza y raíces de *L. oblongifolia* mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Marco teórico

2.1.1. El árbol de la quina

Larreátegui y Lafuente (2013) reconoce como “quina” a la corteza proveniente del árbol de la cascarilla o quino, de este árbol hay varias especies por lo cual existe variabilidad de aspectos entre ellos, además, señala que la quina se propaga en el Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia a altitudes que van desde los 800 msnm hasta los 3000 msnm.

Muchas de las especies de quina habitan zonas con clima y fisiografía similares, para describir de manera general estos aspectos, tomaremos la descripción de Zevallos (1989); se menciona que el género *Cinchona* se distribuye en “ceja de selva”, en zonas cálidas y húmedas con abundantes precipitaciones, en cuanto a la fisiografía, la especie se desarrolla bien en laderas de los valles interandinos y en zonas empinadas.

Algunos autores consideran como quina a especies de varios géneros, con respecto a ello, Andersson (1997) hace mención que el género *Ladenbergia* es afín a los géneros *Cinchona* y *Remijia*, estos tienen algunas características en común; con respecto a la especie *L. oblongifolia*, este mismo autor señala que tiene sinonimia, resaltando el nombre científico de *Cinchona oblongifolia*. Contribuyendo a la cita anterior, Andersson y Antonelli (2005), Manns y Bremer (2010) y Andersson (1995) señalan que la tribu Cinchoneae perteneciente a la familia Rubiaceae, está fuertemente respaldada como monofilética, esto quiere decir que todos los miembros de la tribu tienen un descendiente en común, los géneros incluidos en este grupo son *Cinchona*, *Cinchonopsis*, *Joosia*, *Ladenbergia*, *Remijia* y *Stilpnophyllum*.

Epperson et al. (1995) recaban información con respecto a los acontecimientos históricos del uso de los extractos de quina; la importancia médica de esta planta inicia en el siglo XVII, cuando la condesa de Cinchon contrajo la malaria en 1638, dicha enfermedad es mortal y solo pudo ser tratada con los extractos de la Quina.

2.1.2. Descripción botánica

Andersson (1997) ha descrito el género *Ladenbergia* tomando características de varias especies pertenecientes a este mismo, además, menciona que todos los

individuos de este género son arbustos o árboles. La especie *L. oblongifolia* es capaz de alcanzar una altura de 35 m y un DAP de 60 cm, sin embargo, la mayoría de las especies son medianas a pequeñas, por lo general alcanzan alturas menores de 15 m. Las hojas son decusadas, las estipuladas son interpeciolares y por lo regular son triangulares, linguladas u obovadas; estas estipulaciones se desprenden cuando las láminas de las hojas comienzan a desplegarse. El género se caracteriza por poseer inflorescencias terminales y paniculadas, con un eje principal y ramas laterales dicasiales; la cantidad de flores por inflorescencia varía entre 10 y 200 unidades. Los frutos son generalmente dehiscentes en forma de basipétalo, el rango de medida está entre 3 a 10 cm. de largo; las semillas son lenticulares con el hilio ubicado centralmente en el lado aplanado y poseen un ala exotesta alargada.

Gentry (1993) reconoce 30 especies del género *Ladenbergia*, además, señala que los individuos de este género son árboles o arbustos que poseen hojas grandes, anchas, oblongas, base truncada o subcordada y pecíolo largo; con estípulas caducas y triangulares. Las flores de *Ladenbergia* son blancas, lubulares, alargadas y generalmente sin pelos densos dentro del lóbulo de la corola, esto es precisamente por lo que difiere del género *Cinchona*; el género *Remijia* también está relacionado con *Ladenbergia*, pero poseen frutos más cortos y con flores axilares.

2.1.3. Taxonomía

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Ladenbergia oblongifolia* (Humb. ex Mutis) L. Andersson

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Ladenbergia</i>
Epíteto específico	<i>Oblongifolia</i>
Nombre científico	<i>Ladenbergia oblongifolia</i> (Humb. ex Mutis) L. Andersson

Fuente: (Andersson, L).

2.1.4. Propagación del árbol de la quina

Campos-Ruíz et al. (2014) mencionan que el manejo agrícola y silvícola depende en la mayoría de los casos de las semillas, sin embargo, con el género *Cinchona* se presentan problemas debido a que sus semillas no se pueden almacenar por periodos largos de tiempo debido a que pierden su viabilidad germinativa. Esta problemática ha impulsado el desarrollo de alternativas de propagación, Lima et al. (2018) han investigado la propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L. a partir de las semillas de esta especie, cuyos resultados no fueron alentadores. Con respecto a esto, Eras, et al. (2021) realizaron una investigación con respecto a la propagación in vitro del árbol de la quina, considerando a este método como una forma alternativa de propagación de la especie *C. officinalis*; de esta manera obtuvieron un resultado del 70% de enraizamiento usando la interacción de auxina (AIB) – citocinina (BAP) en concentraciones 0.5 y 0 mg/L respectivamente.

Jerez (2017) realizó la propagación de *C. officinalis* mediante semillas, para ello colectó los frutos antes de que se abrieran y se dispersaran las semillas en su interior, posterior a eso esperó alrededor de dos semanas para que los frutos se abran, permitiendo la extracción de las semillas, para culminar desinfectó las semillas y preparó el sustrato para su posterior siembra, en esta investigación logró tener un porcentaje de germinación del 70,67 %. Además, este mismo autor realizó la propagación asexual de *C. officinalis* mediante estacas, para ello colectó ramitas de 25 a 30 cm de longitud, con 1 o 2 cm de diámetro y con presencia de 1 o 2 yemas, el transporte de las estacas lo realizó envolviéndolos en papel periódico, posteriormente desinfectó y aplicó hormonas enraizantes para luego proceder con la plantación de las estacas en bolsas de polietileno, este experimento no logró buenos resultados en cuanto al porcentaje de prendimiento de las estacas, se atribuye este fracaso a las características de la especie.

Vásquez et al. (2019) realizaron una investigación con respecto al tipo de sustrato que brinda mejores resultados en la propagación de *C. officinalis*, tuvieron mayor porcentaje de germinación de semillas y prendimiento de estacas usando un sustrato compuesto por: 35% de hojarasca + 35% de franco arenoso + 20 % de tierra orgánica + 10 de arena.

2.1.5. Usos medicinales de la quina

Loayza et al. (2010) realizaron un estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens* Vahl., entre todos los componentes detectados se destacan los alcaloides,

de los cuales hacen énfasis sobre la quinina, siendo este el alcaloide más conocido, además mencionan que el árbol de la cascarilla contiene quinidina, cinconina y cinconidina.

Warhurst (1981) resalta la importancia de los alcaloides quinina y quinidina para contrarrestar los efectos del protozoo parásito *Plasmodium falciparum* welch que es causante de la malaria, si bien es cierto, la malaria fue controlada con cloroquina, sin embargo, esta puede tener efectos tóxicos a largo plazo, además que el parásito se vuelve resistente a este compuesto, entonces, el uso de los alcaloides de la quina o Cinchona es útil para combatir los síntomas de la malaria.

Rojas et al. (2006) describieron algunas plantas medicinales, entre estas plantas incluyeron a *C. officinalis*, a la cual se le atribuye su uso en la medicina popular en el tratamiento de faringitis, gingivitis, bronquitis, heridas infectadas, úlceras tóxicas y como agentes antiparasitarios.

Debido a la problemática sanitaria que se dio a partir del virus SARS-CoV2, se han realizado diferentes estudios sobre el árbol de la quina, Pucha-Cofrep et al. (2020) realizaron un estudio con respecto al aumento del uso de *C. officinalis* en una provincia de Loja en el año 2020, esto con la finalidad de poder determinar si la especie estaría en riesgo de ser sobreexplotada.

2.1.6. Alcaloides

Los alcaloides pertenecen al grupo de los metabolitos secundarios, estas además de estar constituidas por carbono, hidrógeno y oxígeno, contienen nitrógeno, por lo cual se entiende que todo alcaloide tiene por lo menos un átomo de Nitrógeno en un heterociclo; además, son de carácter alcalino (Martínez, 2020).

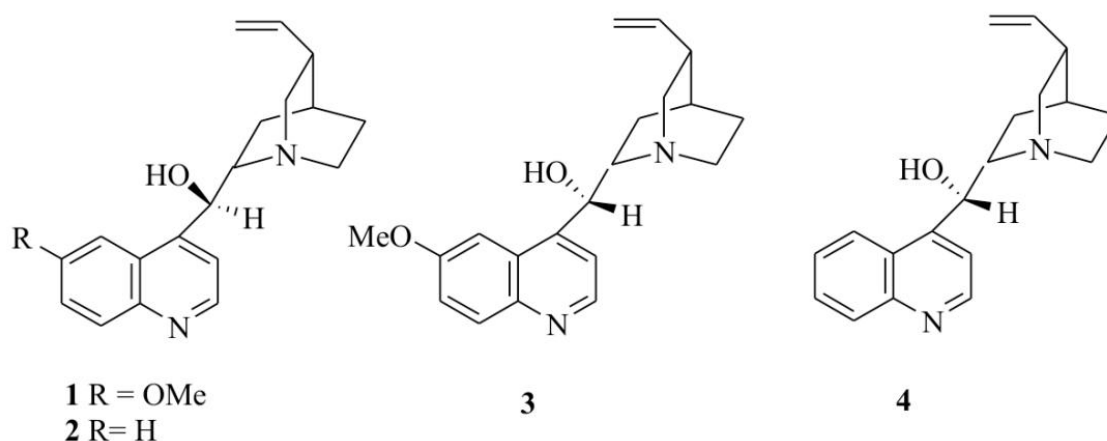
Los alcaloides se encuentran en Angiospermas especialmente en dicotiledóneas y en menor cantidad en Monocotiledóneas y Gimnospermas (Henning, 2013). En estado natural, los alcaloides se encuentran en todos los órganos de la planta: en hojas, flores, frutos, corteza y raíz (Arango, 2008).

Arango (2008), Ávalos y Pérez-Urria (2009) y Martínez (2020) mencionan que no se tiene definido las funciones específicas que cumplen los alcaloides en el metabolismo de las plantas, sin embargo, mencionan algunas sugerencias, como por ejemplo que los alcaloides son producidos como medio de defensa contra plagas, insectos o

depredadores; otras hipótesis sugieren que algunos alcaloides son producto de desecho del metabolismo de las plantas, o también que sirven como reserva de nitrógeno para el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales que la producen. Lock de Ugaz (1994) menciona que los alcaloides al no estar presentes en aproximadamente el 80 % de las plantas da a entender que estos no son vitales para los organismos vegetales.

Henning (2013) menciona que la estructura molecular del alcaloide y la presencia y localización de grupos funcionales hacen que la característica de basicidad sea muy variable. Los métodos de extracción de alcaloides por lo general se basan en que los alcaloides pueden protonarse en medios ácidos y formar sales gracias al átomo de nitrógeno presente en la estructura de los alcaloides.

Los alcaloides son usados con diversos fines medicinales, en las especies de quina se encuentran 4 alcaloides de interés medicinal: quinina, quinidina, cinconina y cinconidina (Meléndez-Gómez y Kouznetsov, 2005), en la **Figura 1** se muestra la estructura química de estos alcaloides.



Fuente: Meléndez-Gómez y Kouznetsov (2005); 1: Quinina, 2: Cinchonidina, 3: Quinidina, 4: Cinconina; OMe=CH₃O

Figura 1. Moléculas quinolínicas de mayor importancia aisladas del extracto de la quina.

2.1.7. Acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas

La cromatografía de Gases es una técnica que se usa para separar los compuestos volátiles de una determinada solución o mezcla compleja, para realizar la identificación de componentes de una mezcla se realiza la comparación con los datos de muestra

puras y para cuantificarlas se elabora una curva de calibración de los patrones, todo basado solo en el Tiempo de Retención de cada componente (Gutiérrez, 2002).

La fase móvil de la Cromatografía de Gases por lo general es Helio, ahí se inyectó la muestra para luego ser transportada por la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna, actualmente las más empleadas son las columnas capilares; la columna se encuentra dentro de un horno cuya temperatura es controlada, la velocidad migración de cada componente (su tiempo de retención en la columna) será en función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria, la separación de los componentes se da debido a que cada soluto de la muestra tiene diferente afinidad hacia la fase estacionaria (Gutiérrez, 2002).

Existe una variedad de métodos de extracción, se puede usar la extracción en Soxhlet o la extracción de espacio en cabeza (HS: "head-space"), esta última es una alternativa rápida y que evita la pérdida de los componentes más volátiles (Gutiérrez, 2002).

La espectrometría de masas (MS) es un técnica analítica muy completa, sus principales cualidades son: capacidad de identificación de forma inequívoca, debido a que proporciona un espectro característico de cada molécula, permite cuantificar la concentración de las sustancias, gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt e incluso ppq, proporciona información estructural sobre la molécula analizada y es considerado como un método rápido, se puede realizar un espectro en décimas de segundo. El espectrómetro de masas adquiere un espectro de masas y muestra estos datos como un histograma de la abundancia de los iones que llegan al detector según su relación masa-carga (m/z). En el interior del Espectrómetro de Masas, se procede a la ionización de la muestra, el sistema de ionización más usado es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, son capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Una ventaja es que el espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador, de esta manera se puede comparar con los espectros de una colección o de una librería y proceder a su identificación (Gutiérrez, 2002; Lovestead y Urness, 2019).

Cada método por separado puede lograr identificar un determinado componente, pero si se realiza la unión de estos métodos (Cromatógrafo de Gases (GC) acoplado a Espectrometría de Masas (MS)) se logra tener resultados más precisos e inequívocos (Gutiérrez, 2002)

Un análisis en el GC-MS comienza con la preparación, inyección y separación de la muestra en una columna de GC. Para el funcionamiento de un espectrómetro de masas se requiere un sistema de alto vacío, para ello es necesaria una interfaz para dirigir las moléculas desde el GC al espectrómetro de masas, las moléculas que salen de la columna ingresan a una cámara de ionización donde son bombardeadas con una corriente de electrones energéticos, que ioniza y fragmenta las moléculas (Lovestead y Urness, 2019).

GC-MS es utilizado ampliamente en las industrias farmacéuticas para realizar investigaciones y desarrollo analítico, control de calidad, aseguramiento de calidad, producción, departamentos de plantas piloto para ingredientes farmacéuticos activos (API), medicamentos a granel y formulaciones; además, es parte fundamental de la investigación asociada con la química medicinal, análisis farmacéutico, farmacognosia, control de procesos farmacéuticos y biotecnología farmacéutica (Al-Rubaye et al., 2017).

Sleeman Y Carter (2005) mencionan los modos de escaneo para el análisis GC/MS, el primer modo es el monitoreo de iones seleccionados (SIM), también conocida como registro de iones seleccionados o detección de iones múltiples (MID), es el uso de un espectrómetro de masas para registrar las intensidades de un número limitado de iones; esto permite que el instrumento se detenga durante una mayor proporción del tiempo de análisis en aquellas relaciones masa-carga de mayor importancia en el espectro de masas de un compuesto de interés. La principal aplicación de la técnica es la espectrometría de masas orgánica (MS), donde los datos SIM generalmente se adquieren utilizando instrumentos acoplados a sistemas de entrada cromatográficos, lo que permite la determinación cualitativa o cuantitativa de compuestos orgánicos en concentraciones extremadamente bajas. Por otro lado el método scan nos proporciona datos de todos los componentes presentes en una determinada muestra de interés.

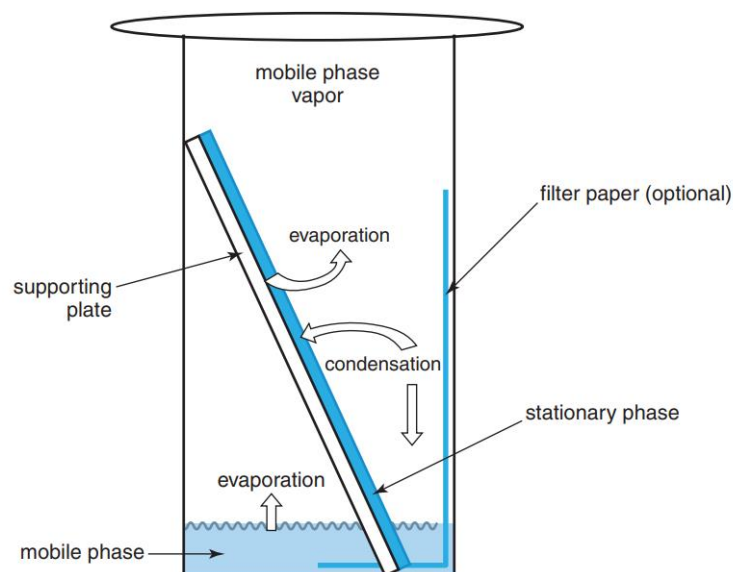
Las características del equipo usado para este trabajo (Espectrómetro de masas MS TSQ 9000 acoplado a un cromatógrafo de gases GC Trace 1310) son descritas en el manual de Thermo Fisher Scientific (2018), este equipo es una plataforma de GC de triple cuadrupolo, posee Ionización electrónica (EI), con escaneo completo (FS), SIM y FS/SIM simultáneo dentro de la inyección de muestra, adquisición temporizada (t-SIM) y FS/t-SIM, además incluye varios tipos de fuente de iones: Ionización de electrones Thermo Scientific™ ExtractaBrite™, Ionización electrónica avanzada (AEI) Thermo Scientific™, Ionización química (CI). Posee un rango de energía de colisión de 0-60 eV y un rango de masas de 1,2-

1100 u con resolución de masa unitaria, tiene la capacidad de adquirir más de 97 escaneos/s en FS al escanear en un rango de 125 u; la energía electrónica es ajustable hasta 150 eV dependiendo del tipo de fuente de iones. Este equipo dispone de dos Software, Software Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS) para cromatógrafos que utilizan MS, una plataforma común para cuantificación por GC, GC-MS, LC, LC-MS, IC e IC-MS y Software Thermo Scientific™ TraceFinder™, una plataforma común para la cuantificación rutinaria de GC, GC-MS, LC y LC-MS. Las dimensiones/pesos del sistema son las siguientes: el espectrómetro de masas mide 44 × 40 × 89 cm y pesa 61 kg, el sistema GC TRACE 1310 mide 45 × 44 × 67 cm y pesa 35 kg.

2.1.8. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía engloba un grupo diverso de métodos que tienen como finalidad separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de un determinado extracto, muestra o mezcla; todos los métodos implican la intervención de una fase estacionaria en donde tiene lugar el recorrido de la muestra con la ayuda de la fase móvil (Fried y Sherma, 1999).

La Cromatografía en Capa Fina (CCF) es un tipo de cromatografía líquida en donde se coloca una pequeña parte de la muestra en un punto inicial de la placa, la fase móvil recorre la fase estacionaria por acción capilar, este proceso se realiza dentro de una cámara (**Figura 2**) previamente saturada con los vapores del disolvente (Fried y Sherma, 1999; Cai, 2014).



Fuente: Cai, (2014)

Figura 2. Imagen representativa de proceso de CCF dentro de la cámara de desarrollo.

Fried y Sherma (1999) describen los pasos de una CCF clásica: todo análisis empieza con la colocación de la muestra en la placa, seguido por la evaporación del solvente de la muestra, se procede colocando la placa dentro de la cámara que contiene el solvente, la fase móvil asciende por acción capilar, el desarrollo tendrá fin cuando la fase móvil recorra entre 10 o 15 cm, luego se retira la placa y se deja evaporar el solvente, finalmente se realiza el proceso de revelado y luego se observa y se marcan las manchas para tener un resultado cualitativo.

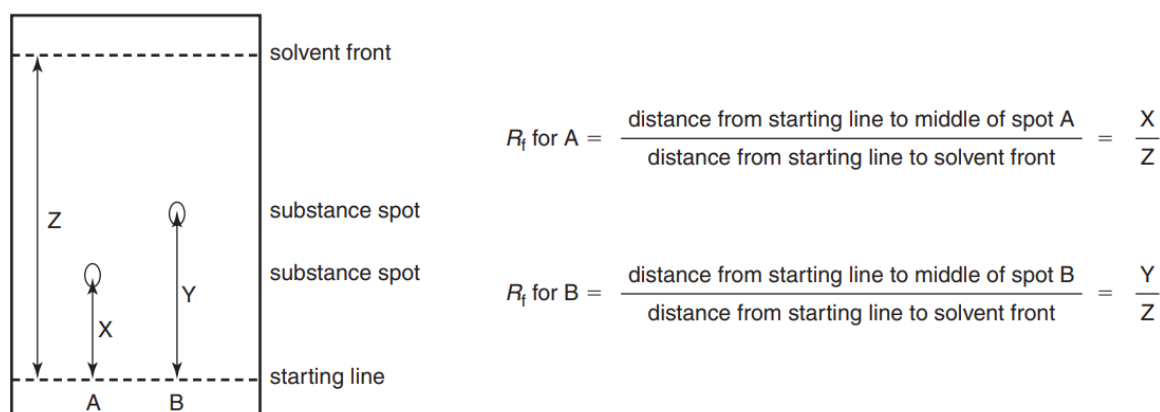
Existe gran variedad de elementos que se usan como fase estacionaria, estos se utilizan según las características de la muestra que se va a analizar, el recubrimiento de sílice estándar es el adsorbente más usado para CCF (Cai, 2014), en la **Tabla 2** se muestra algunos tipos de fase estacionaria para CCF según su polaridad.

Tabla 2. Polaridades de la fase estacionaria para CCF

Polaridad Creciente ↑	Aluminum oxide (acidic, basic, or neutral)
	Magnesium oxide
	Florisil (magnesium silicate)
	Silica gel
	Cellulose
	Paper
	Reversed phase (hydrocarbon-coated silica, e.g., C-18)

Fuente: Cai, (2014)

Cuando se tienen las manchas en la placa, se realiza la medición de la distancia de corrido de estas para obtener el factor de retención (Rf) y poder determinar cualitativamente el tipo de compuesto, sin embargo, los valores de Rf idénticos no significa necesariamente que se trate del mismo compuesto; es por este motivo que se realiza la lectura de las muestras y patrones con las mismas condiciones (Cai, 2014; Striegel y Hill, 1996). En la **Figura 3** se muestra la representación gráfica de la obtención de un Rf.



Fuente: Cai, (2014)

Figura 3. Esquema de la placa cromatográfica CCF, para poder determinar el valor R_f .

2.2. Estado del arte

El estudio de la quina se ha realizado en diferentes lugares del Perú y el mundo, aplicando diferentes técnicas para identificar y cuantificar los alcaloides presentes en dicha planta, sin embargo, estos estudios tienen diferentes resultados que puede deberse a muchos factores, en esta sección se hará mención de alguno de estos estudios para tener una referencia con respecto a la cuantificación de estos metabolitos en el árbol de la quina.

Remuzgo et al. (2021) realizaron la caracterización taxonómica y fitoquímica de dos especies de quina: *L. oblongifolia* y *C. pubescens*, de ambas especies solamente usaron las hojas, el método utilizado para cuantificar fue de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Performance (HPLC), en su obra mencionan que en las muestras de hojas de ambas quininas se identificaron los alcaloides quinina, quinidina y cinconidina, además, resaltan la ausencia del alcaloide cinconina. Mediante la cuantificación de alcaloides de las muestras de hojas de ambas especies realizaron una comparación, por un lado, la especie de *L. oblongifolia* posee un total de 0,99 μg de alcaloides totales en 1 gr hojas secas y pulverizadas, de los cuales, 0,24 μg son de cinconidina, 0,35 μg de quinina y 0,40 μg de quinidina; con respecto a la segunda especie, *C. pubescens*, detectaron un total de 0.64 μg de alcaloides totales en un gr de hojas secas y pulverizadas, de los cuales 0.06 μg son de quinina, 0,18 μg de cinconidina y 0.40 de quinidina.

Por otro lado, López et al. (2020) realizó la cuantificación de alcaloides en hojas y tallos(corteza) de *L. oblongifolia*, obtuvo resultados estadísticos de la cuantificación, los cuales indican la presencia de $0,0997 \pm 0,0026$ mmol de alcaloides por cada g de materia seca en la corteza fresca; $0,1111 \pm 0,0024$ mmol de alcaloides por cada g de materia seca en la corteza seca

y por último determinaron la presencia de $0,1039 \pm 0,0064$ mmol de alcaloides por cada g de materia seca en las hojas. Resaltaron la superioridad del contenido de alcaloides en las hojas de la especie *L. oblongifolia*.

Varios autores señalan la existencia de familiaridad entre los géneros *Ladenbergia* y *Cinchona*, por lo cual, se incluye el estudio realizado por Haro (2022), en este trabajo el autor realizó la identificación de quinina mediante CCF, además, cuantificó alcaloides totales y quinina presentes en extractos de corteza de las especies *C. micrantha* y *Cinchona sp.* mediante UHPLC; en la identificación de quinina mediante TLC obtuvo buenos resultados con tres diferentes extractos: acuoso acidulado, hidroalcohólico acidulado y etanólico, el tiempo de retención (R_f) fue de 0,83. Con respecto a la cuantificación de alcaloides totales y de quinina, obtuvo mayor presencia de alcaloides en el extracto hidroalcohólico acidulado, en este extracto la especie de *Cinchona sp.* tuvo 8.6257% de alcaloides totales y 0.0442 g%/100 g de corteza, superando a *C. micrantha* que tuvo 4.0475% de alcaloides totales y 0.0404 g%/100 g de corteza; el autor concluyó que la especie *Cinchona sp.* contiene mayor porcentaje de alcaloides totales y de quinina que la especie *C. micrantha*.

La cuantificación de alcaloides se puede realizar utilizando diferentes métodos, Murauer y Ganzera (2018) realizaron la cuantificación de alcaloides de la corteza de *Cinchona* utilizando el método de Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC); determinaron que el alcaloide dominante fue la cinconina: 1,87% – 2,30%, seguido por la quinina: 1,59% – 1,89% y como alcaloide menos abundante estuvo la cinconidina: 0,90% – 1,26%; los valores reflejan el porcentaje (mg de alcaloide/100 mg de fármaco crudo).

Las investigaciones antes mencionadas lograron cuantificar la presencia de alcaloides en el árbol de la quina usando un solo compuesto; Mesa et al. (2013) cuantifica la presencia de la quinina usando diferentes extractos; dicho autor obtuvo los siguientes resultados: hubo un alto contenido de quinina en el extracto de alcaloides totales con $[21,3 \pm 0,0247 \text{ ppm}]$, seguido de los extractos de metanol $[2,21 \pm 0,0485 \text{ ppm}]$, acetato de etilo $[2,11 \pm 0,0766 \text{ ppm}]$ y diclorometano $[1,58 \pm 0,0323 \text{ ppm}]$. La menor concentración de quinina $[0,640 \pm 0,00127 \text{ ppm}]$ se determinó en el extracto de más baja polaridad (hexano).

Loayza et al. (2010) realizaron un estudio químico de los tallos de *C. pubescens*, reportaron una presencia abundante de alcaloides, esta presencia es superior a la de los demás

metabolitos presentes en los tallos, además, lograron aislar la quinina mediante Cromatografía en capa delgada centrifugada (CCDC).

Mccalley (1990) realizó un análisis cuantitativo de los alcaloides de la corteza de la quina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para procesar la muestra tomó en cuenta el método estándar de Bruselas el cual indica que el secado de la muestra es a 110 °C (no hay reportes de pérdida de alcaloides), posterior al secado, se tritura y se tamiza; para la extracción usó el equipo Soxhlet y benceno. Para realizar la validación del método adicionó alcaloide puro (quinina, quinidina, cinconina y cinconidina) a una muestra de 100 g de quina (*Cinchona calisaya* Wedd.), las soluciones se prepararon usando cantidades iguales de cada sólido y disolviéndolos en metanol. La muestra de quina sin la adición de compuestos puros tuvo la siguiente cantidad de cada alcaloide: 1,20% de quinina, 0,34% de quinidina, 1,23% cinconidina y 0,25% de cinconina; la recuperación media para cada alcaloide: quinina, quinidina, cinconina y cinconidina fue de 100, 103, 101 y 101% respectivamente.

Mccalley (2002) menciona que la corteza “promedio” de la quina tiene alrededor de 7% y 12% del total de alcaloides, de este porcentaje la quinina representa un 70% a 90%, la cinconidina entre 1% a 3% y la quinidina hasta un 1%; este autor realizó el análisis con respecto al uso y efectividad de los diferentes métodos de separación y cuantificación que se usan en muestras de quina, menciona que la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en el modo de fase invertida mediante detección UV sigue siendo el método de preferencia para el análisis de muestras de cinchona, esto se debe a que las fase móviles típicas tienen bajo costo, la reproductibilidad de los tiempos de retención, compatibilidad con muestras acuosas y alta eficiencia de la columna; otro método empleado es la separación de Fase Normal (FN) existen diversos estudios que brindan resultados aceptables usando este método, se utiliza principalmente columnas de sílice desnudas; otro método es la HPLC con detección espectrométrica de masas, la cual ofrece buena identificación de picos; la Cromatografía de Gases es un método poco usado para análisis de quina, sin embargo tiene ventajas sobre los otros métodos por lo cual el autor recomienda seguir investigando con este método; finalmente, la Cromatografía en Capa Fina (CCF) es un método siempre útil para la identificación de alcaloides y a comparación de los otros métodos este es menos costoso.

Suszko-Purzycka y Trzebny (1964) realizaron el análisis cualitativo de cinchona mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF), usaron como solvente cloroformo, metano y dietilamina (80 : 20 : 1) y como fase estacionaria usaron gel de sílice; lograron determinar los

Rf de algunos de los alcaloides de la quina: quinina (0,45 – 0,47), quinidina (0,46 – 0,48), cinchonina (0,38 – 0,41), cinconidina (0,39 – 0,41) y de otros cuatro alcaloides.

Canales et al. (2020) realizaron el análisis de 67 muestras de cinchona recolectadas entre 1850 y 1904, realizaron el estudio mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC); entre todos los alcaloides cuantificados, la quinina fue el más abundante, seguida de la cinchonina y la cinconidina, mientras que la quinidina fue la menos abundante en ambos conjuntos de datos; el conjunto de datos históricos tuvo mayor abundancia de alcaloides con respecto a los datos del día actual, la quinina tuvo 2,2% y 1,3% respectivamente, la quinidina tuvo 0,5% y 0,1% respectivamente, la cinchonina tuvo 0,8% en ambos conjuntos de datos y la la cinconidina tuvo 0,8% y 0,6%.

Maldonado et al. (2017) realizaron la cuantificación de la quina amarilla (*C. calisaya*) tomando en cuenta la filogenia, realizaron la investigación usando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia – Ultravioleta (HPLC – UV), lograron detectar dos clados (A y B), los individuos del clado A se encuentran a una altitud de 1100 msnm a 1300 msnm, mientras que los individuos del clado B se encuentran a una altitud de 1900 – 2300 msnm; la evaluación lo realizaron tomando tres partes del fuste de los árboles, luego de los análisis estadísticos se comprobó que la cantidad de alcaloides para cada parte del árbol no tiene diferencia estadística significativa, por lo cual, los datos de cuantificación son el promedio de los tres valores; el clado A tuvo alto contenido de alcaloides (13,6 a 21,7 mg/g), el clado B tuvo menor presencia de alcaloides (0,3 a 12,5 mg/g).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

3.1.1. Ubicación política

El trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Fitoquímica Forestal de la EPIF de la FRNR, este laboratorio está ubicado en la Universidad Nacional Agraria de la Selva – UNAS, políticamente está ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco. Las muestras proceden de la plantación perteneciente al Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP). (**Figura 4**)

3.1.2. Ubicación geográfica

Las coordenadas UTM del lugar de ejecución son las siguientes:

Tabla 3. Coordenadas UTM de la Universidad Nacional Agraria de la Selva

Lugar	coordenadas UTM	
	Este	Norte
UNAS	390312	8970774
IIAP	388015	8990930

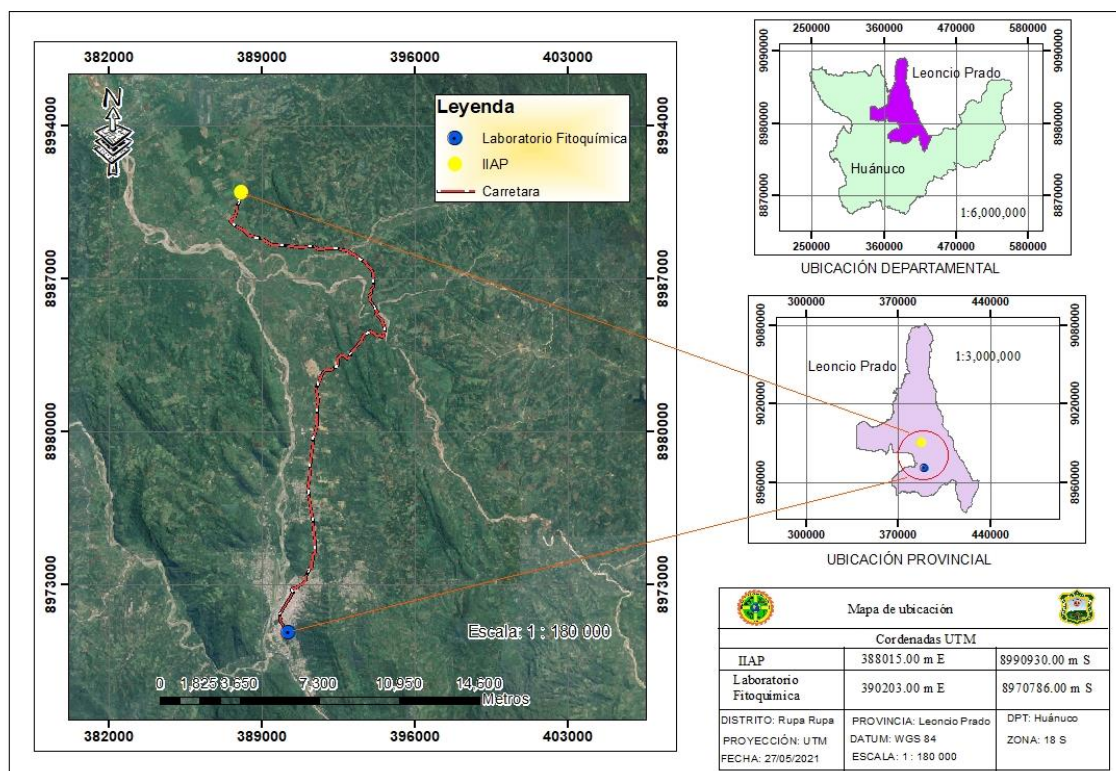


Figura 4. Mapa de ubicación de la zona de trabajo.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Material de uso común de laboratorio

Probetas (10 y 50 ml), embudos de decantación, embudos, pipetas, vasos de precipitado (100 ml), matraz aforado (50 ml), papel filtro, algodón, lunas de reloj, papel aluminio, pera de succión, envases de plástico (10 ml), capilar de vidrio, mortero y pilón de porcelana, pinzas, micropipetas (10-100 μ L y 100-1000 μ L), frasco de vidrio (cámara de corrido de CCF).

3.2.2. Reactivos

Metanol grado GC, agua desionizada, gas helio, gas argón, cromatofolio F254, tolueno, éter dietílico, diclorometano grado GC, dietilamina, ácido sulfúrico 96 %, ácido clorhídrico fumante 37%, hidróxido de amonio, reactivo Mayer, sulfato de sodio.

3.2.3. Equipos

Estufa, balanza analítica, cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas GC/MS, sonicador/ baño de ultrasonido, pH-metro, lampara UV.

3.2.4. Material vegetal

Las muestras de hojas, corteza y raíces de la especie *L. oblongifolia* fueron colectados de 8 árboles de la plantación perteneciente al Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP) (**Figura 14**) el día 28 de octubre del 2022 a las 6 am, se realizaron los análisis usando una muestra representativa para cada parte del árbol, es decir, se realizó una mezcla del material vegetal colectado de los individuos seleccionados, de esta manera solo se trabajó con una muestra para cada parte del árbol.

La plantación de *L. oblongifolia* al momento de la recolección de la muestra tenía una edad de 8 años, fue instalada en un sistema de asociación con pino chuncho (*Shizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) y en un terreno considerado como degradado o pobre (**Anexo D**); dicha plantación está ubicada en el caserío de Saipai, distrito de Pueblo Nuevo, provincia de Leoncio Prado.

El clima de acuerdo con la Estación Meteorológica Tulumayo de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) es característico de las zonas del trópico

húmedo; la temperatura anual medio es de 24 °C; mientras que las precipitaciones están por encima de los 2630 mm/año.

3.3. Métodos

3.3.1. Secado y triturado de las muestras

Para llevar a cabo los análisis de cromatografía se requiere preparar “soluciones problema” para cada parte de la planta a analizar, las cuales se realizan con material vegetal previamente procesado, para ello se tiene que secar y posteriormente triturar las muestras de hojas, corteza y raíces; entonces, las muestras luego de ser colectadas se lavaron con agua destilada y se desinfectó con alcohol al 75%, posteriormente se cortaron y se colocaron en la estufa a una temperatura de 40° por 7 días, pasado este tiempo, las muestras fueron pulverizadas en un mortero, posteriormente fueron almacenadas en recipientes herméticos y limpios para ser usados en los análisis propuestos en esta investigación (Suau et al., 2002).

- Cálculo del porcentaje (%) de humedad de las muestras

Las muestras secadas y trituradas aun contienen un determinado porcentaje de agua, por ello se realiza el cálculo del porcentaje de contenido de humedad (%CH) para poder descontar esta humedad en las muestra usadas para los análisis; se procedió a pesar 2 g de las muestras trituradas (peso inicial) sobre lunas de reloj y luego se colocaron a la estufa a una temperatura de 103°C por 48 horas y luego se pesó (peso anhidro), usando los datos se calculó el %CH (**Tabla 4**) usando la siguiente ecuación:

$$\%CH = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso anhidro}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Donde: %CH = porcentaje de contenido de Humedad

Tabla 4. Datos de peso inicial, peso anhidro y %CH de las muestras de hojas, corteza y raíz de *L. oblongifolia*

Muestra	Peso inicial (g)	Peso anhidro (g)	% CH
Hojas	2,0178	1,8348	9,0693
Corteza	2,0063	1,8230	9,1362
Raíz	2,0181	1,8231	9,6626

Donde: %CH = Porcentaje de contenido de humedad

3.3.2. Identificación de alcaloides por CCF

Para la primera parte de la investigación se realizó la adaptación de la metodología descrita por la Cuarta directiva de la comisión (CEE) 58/490; la identificación de alcaloides mediante este método se realizó en varias fases:

- Preparación de la solución problema

Se pesó con precisión ($\pm 0,0100$ g) 3 g de muestra seca y pulverizada, seguidamente se colocó la muestra pesada en un matraz aforado de 50 ml, luego se aforó el recipiente con metanol, se tapó y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente en el baño de ultrasonido; pasado este tiempo se procedió a filtrar, el filtrado se usó directamente sobre la placa de gel de sílice mediante un apilar de vidrio. Este proceso se realizó con cada una de las muestras (hojas, corteza y raíz).

- Preparación de las soluciones patrón (estándares)

Usando los alcaloides puros (quinina, quinidina, cinconina y cinconidina) se preparó las soluciones diluyendo estos alcaloides en metanol, en la **Tabla 5** se detalla los pesos, volúmenes y concentración para cada uno:

Tabla 5. Concentraciones en ppm de los estándares para CCF

Alcaloide	Peso (g)	Volumen (ml)	Concentración (ppm)
Quinina	0,0004	1,5	266,6667
Quinidina	0,0006	1,5	400
Cinconina	0,0004	1,5	266,6667
Cinconidina	0,0005	1,5	333,3333

- Cromatografía en capa fina (CCF)

Se usó cromatofolios F254, se realizó tres ensayos, uno por muestra, por lo tanto se cortó el cromatofolio a una medida de 6*20 cm; se procedió colocando sobre la placa de gel de sílice aproximadamente 1,0 μ l de la solución problema y de las soluciones patrón (separados 1 cm entre soluciones); luego se desarrolló el cromatograma hasta una altura de 15 cm en una cubeta previamente saturada con los vapores del disolvente: tolueno/éter dietílico/diclorometano/dietilamina: 20/20/20/08 (v/v/v/v).

- Revelado

Cuando el corrido alcanzó la altura de 15 cm se retiró la placa de la cubeta y se dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente, luego, se agregó el reactivo revelador (5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 95 ml de éter dietílico) sobre la placa seca, este proceso se realizó usando un pulverizador y sobre un recipiente refrigerado; se dejó secar por una hora para posteriormente observar la placa bajo la luz ultravioleta a 365 nm. Se marcaron y se midieron las manchas observadas para realizar el cálculo de los factores de retención (Rf) de los compuestos; la metodología empleada nos brinda los Rf de los compuestos, los cuales se usaron de manera comparativa, en la **Tabla 6** se muestra estos datos:

Tabla 6. Rf de los alcaloides de interés calculados por la Cuarta directiva de la comisión (CEE)

58/490

Alcaloide	Rf
Quinina	0,20
Quinidina	0,29
Cinconina	0,33
Cinconidina	0,27

3.3.3. Preparación de estándares de los cuatro alcaloides de interés de *L. oblongifolia* para GC/MS

Para realizar la cuantificación de los alcaloides (quinina, quinidina, cinconina y cinconidina) de *L. oblongifolia* se emplea el método de la curva de calibración. Para este paso se pesó el alcaloide en viales ámbar y se diluyó en diclorometano grado GC, las cantidades, volúmenes y concentraciones se detallan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Preparación inicial de las soluciones de alcaloides puros

Alcaloide	Peso (g)	Volumen de diclorometano (ml)	Concentración (ppm)
Quinina	0,0009	1,5	600
Quinidina	0,0009	1,5	600
Cinconina	0,0008	1,5	533,3333
Cinconidina	0,0007	1,5	466,6667

Se realizó una dilución en serie a partir de los datos anteriores utilizando la siguiente expresión matemática:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Con la ecuación se uniformizó a 100 ppm las concentraciones de los cuatro alcaloides. Partiendo de este punto se realizó los siete estándares de los alcaloides de la quina (**Tabla 8**).

Tabla 8. Datos numéricos de la composición de los 7 estándares de los alcaloides de la quina

ESTÁNDAR	Quinina (100ppm)	Quinidina (100ppm)	Cinconina (100ppm)	Cinconidin a (100ppm)	Dicloro- metano	Vial STD
Std 1 (1ppm)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	960 µl	1 ml
Std 2 (2ppm)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	920 µl	1 ml
Std 3 (3ppm)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	880 µl	1 ml
Std 4 (5ppm)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	800 µl	1 ml
Std 5 (7ppm)	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	720 µl	1 ml
Std 6 (9ppm)	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl	640 µl	1 ml
Std 7 (10ppm)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	600 µl	1 ml

Terminada la preparación de los estándares se procedió a realizar la lectura en el equipo GC/MS, con esto también se determinaron los Tiempos de Retención (TR) de cada compuesto de interés (**Tabla 9** y **Anexo A**).

Tabla 9. TR promedio de los estándares calculados en el GC/MS

Alcaloide	TR promedio
Quinina	14,628
Quinidina	14,511
Cinconina	10,282
Cinconidina	10,501

3.3.4. Extracción de alcaloides para análisis con GC-MS

Para el proceso de extracción de los alcaloides de las muestras de hojas, corteza y raíz, se realizó la adaptación de la metodología empleada por Suau et al. (2002). El proceso de extracción se realizó mediante un equipo Soxhlet (**Figura 5**), cuya capacidad de la

cámara de extracción es de 80 ml; se inició el proceso pesando $3 \pm 0,0100$ g de muestra seca y pulverizada (peso inicial) sobre un papel filtro, en la **Tabla 10** se muestra los datos y cálculo final del peso anhidro de las muestras; se envolvió la muestra en el papel filtro y se colocó en la cámara de extracción; se procedió a agregar 75 ml de metanol grado GC en un matraz aforado de 100 ml para su posterior acople al equipo Soxhlet.

Tabla 10. Peso anhidro calculado al descotar la humedad a cada peso inicial de las muestras de *L. oblongifolia*

Muestra	Peso inicial	%CH (Tabla 4)	Peso anhidro
Hojas	3,0071	9,0693	2,7344
Corteza	3,0053	9,1362	2,7307
Raíz	3,0069	9,6626	2,7164

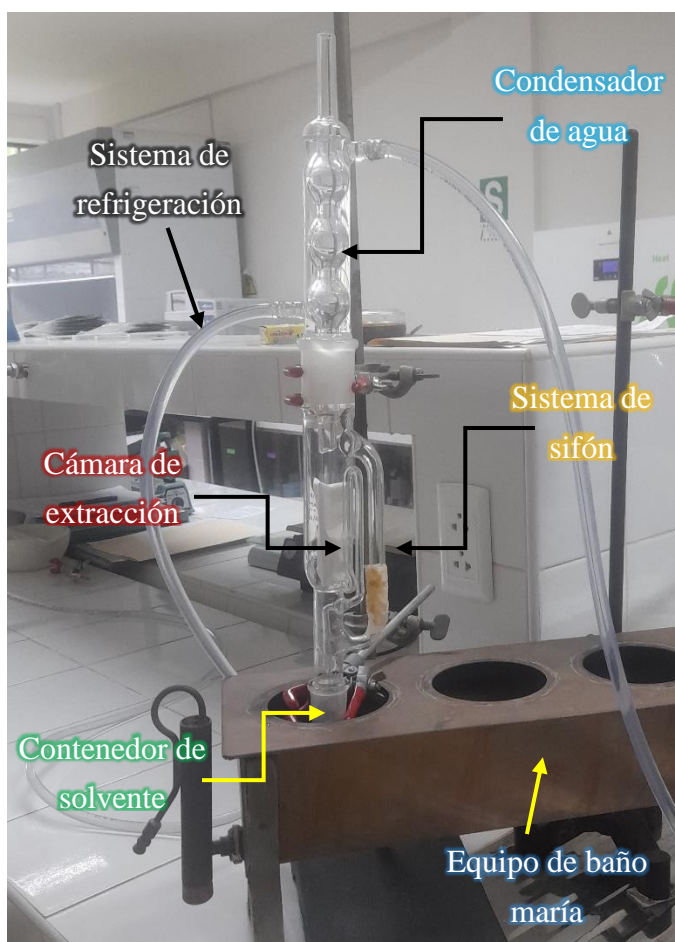


Figura 5. Componentes del equipo Soxhlet.

Terminada la instalación del equipo Soxhlet se inició el proceso de extracción, para controlar el final del proceso se utilizó la prueba de Mayer, esta prueba resultó

negativa aproximadamente 7 horas de iniciado el proceso. Al finalizar la extracción se evaporó el solvente al aire libre hasta un volumen aproximado de 1 ml, este residuo se diluyó con 8 ml de ácido clorhídrico al 2,5 %, luego se filtró y el filtrado ácido acuosa se llevó a un pH de 8 con hidróxido de amonio concentrado; para concretar el proceso se agrega la solución a un embudo de decantación y luego se extrae con 3 ml de diclorometano en tres repeticiones; finalmente la solución de diclorometano se seca con sulfato de magnesio y se filtra dentro de un recipiente milimetrado, de esta manera se recupera un determinado volumen de diclorometano, en la **Tabla 11** se detalla el volumen recuperado para cada extracto.

Tabla 11. Volumen de diclorometano recuperado para cada extracto

Extracto	Diclorometano usado	Diclorometano recuperado
Hojas	9 ml	3,25
Corteza	9 ml	3,12
Raíz	9 ml	3,35

3.3.5. Análisis GC-MS

Realizada la extracción de los alcaloides se procede con el análisis en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas CG-MS, para esto se realizará la adaptación de la metodología empleada por Suau et al. (2002).

Se comenzó por agregar 1 ml de la solución de alcaloides en un vial ámbar de 1,5 ml de capacidad y luego se colocó el vial en la barra del equipo; se procede con la creación de la metodología, la cual se programó para la inyección directa de alícuotas de 0,5 a 1,5 μ l.

Los análisis se llevaron a cabo con un Espectrómetro de masas MS TSQ 9000 acoplado a un cromatógrafo de gases GC Trace 1310 equipado con una columna capilar de sílice fundida ligeramente polar TG-5SILMS (5% fenil y 95 metilpolisiloxano) de 30 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de película fina. Las lecturas se realizaron en modo SIM, sin embargo, en la **Figura 13** se observa el cromatograma del corrido en modo scan de la muestra de hojas. La temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 200°C durante 0,8 min, luego fue aumentando 10°C por minuto hasta llegar a 250°C, y luego se mantuvo a 250°C durante 24 minutos; el caudal de helio fue de 1,5 ml/min. La fuente de iones del espectrómetro de masas se operó a 250°C y la línea de transferencia en 280°C. La ionización por impacto de electrones (EI) se llevó a cabo a 70 eV, y la determinación cuantitativa se basó

en la corriente iónica total corregida para la respuesta del detector de cada alcaloide individual. El rango de masas fue de 50 a 450 uma (unidad de masa atómica), se escaneó a una velocidad de 2,6 escaneos/s. Los alcaloides se identificaron por comparación directa de su MS y tiempos de retención (Rt) con los de muestras auténticas y con datos de la biblioteca NIST.

- **Cálculo de la cantidad final o real de alcaloides en µg/g**

Los resultados calculados en el equipo serán en las mismas unidades que el de los estándares, por tanto, se tendrá cantidades en ppm, para poder calcular la cantidad real de alcaloides presentes en nuestra muestra se tiene que tomar en cuenta el volumen obtenido y el peso de muestra con el que se trabajó, para ello se usó la siguiente expresión matemática:

$$\text{Cantidad final o real } (\mu\text{g/g}) = \text{Concentración observada}(\text{mg/L}) * \text{Volumen final (ml)} / \text{Peso anhidro}$$

Donde:

Concentración observada (mg/g) es la concentración proporcionada por el equipo GC/MS

Volumen Final (ml) es el volumen del extracto final de alcaloides (diclorometano) (**Tabla 11**)

Peso anhidro (g) es el peso sin contenido de humedad (**Tabla10**)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de los alcaloides mediante CCF

La cromatografía en capa fina permitió identificar los alcaloides de interés (quinina, quinidina, cinconina, cinconidina) presentes en la muestra de hojas, corteza y raíz; en la **Tabla 12** observamos los Rf calculados usando los patrones de los alcaloides, se nota diferencias con respecto a los Rf calculados por la Cuarta directiva de la comisión (CEE) 58/490 (**Tabla 6**), aunque los ensayos se hayan realizado con la misma metodología hubo variación en la distancia de corrido de los patrones, Quiroga (2013) menciona varios factores que afecta la reproducibilidad de los Rf, tales como la calidad y pureza de los solventes, saturación de la cámara de desarrollo, temperatura, entre otros. Suszko-Purzycka y Trzebny (1964) también lograron detectar los alcaloides de Cinchona mediante CCF, usaron como solvente cloroformo, metano y dietilamina (80 : 20 : 1) y como fase estacionaria usaron gel de sílice; obtuvieron los siguientes Rf: quinina (0,45 – 0,47), quinidina (0,46 – 0,48), cinconina (0,38 – 0,41), cinconidina (0,39 – 0,41) y de otros cuatro alcaloides.

Tabla 12. Cálculo del Rf para los cuatro alcaloides de interés de la especie *L. oblongifolia* usando los patrones puros

Alcaloide	Cálculo del Rf para cada componente		
	X (corrido de la muestra cm)	Y (frente del Solvente cm)	Rf
Quinina	3,4	15	0,226
Quinidina	6,4	15	0,426
Cinconina	8	15	0,533
Cinconidina	5,8	15	0,386

Rf = corrido de la muestra / frente del Solvente

Con los Rf de los estándares ya calculados, se procedió a medir las manchas del corrido de la solución de hojas, corteza y raíz (**Tabla 13**); se pudo identificar en la muestra de hojas la presencia de quinina y quinidina en la muestra de hojas; este resultado tiene cierta coincidencia con lo encontrado por Remuzgo et al. (2021), en dicha investigación, en el extracto de hojas encontraron quinina, quinidina y cinconidina, mientras que la cinconina está ausente en esa investigación y en la presente investigación.

En el extracto de corteza se logró identificar solo la cinconidina, mientras que en el extracto de raíz hubo una ausencia total de manchas, lo cual indica ausencia de los alcaloides.

Haro (2022) logró identificar el alcaloide quinina mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) usando varios extractos; al igual que en este trabajo, logró identificar la mancha perteneciente a la quinina en un extracto etanólico, pero usando reactivos y solventes diferentes, obteniendo de esta manera un Rf mayor a la que se obtuvo en la presente investigación.

Tabla 13. Identificación de los alcaloides de interés de *L. oblongifolia* en corteza, hojas y raíz

Identificación de los alcaloides de interés de <i>L. oblongifolia</i>				
Muestras	Alcaloides / patrones			
	Quinina	Quinidina	Cinconina	Cinconidina
Hojas	SI	SI	ND	ND
Corteza	ND	ND	ND	SI
Raíz	ND	ND	ND	ND

ND = no detectado, SI = hay presencia del alcaloide

En la placa cromatográfica perteneciente al extracto de hojas (**Figura 6**) notamos cinco manchas en el punto de partida, en la columna perteneciente al extracto (Extc.) notamos cuatro manchas, pero, solo dos de ellas coinciden con el de los patrones.

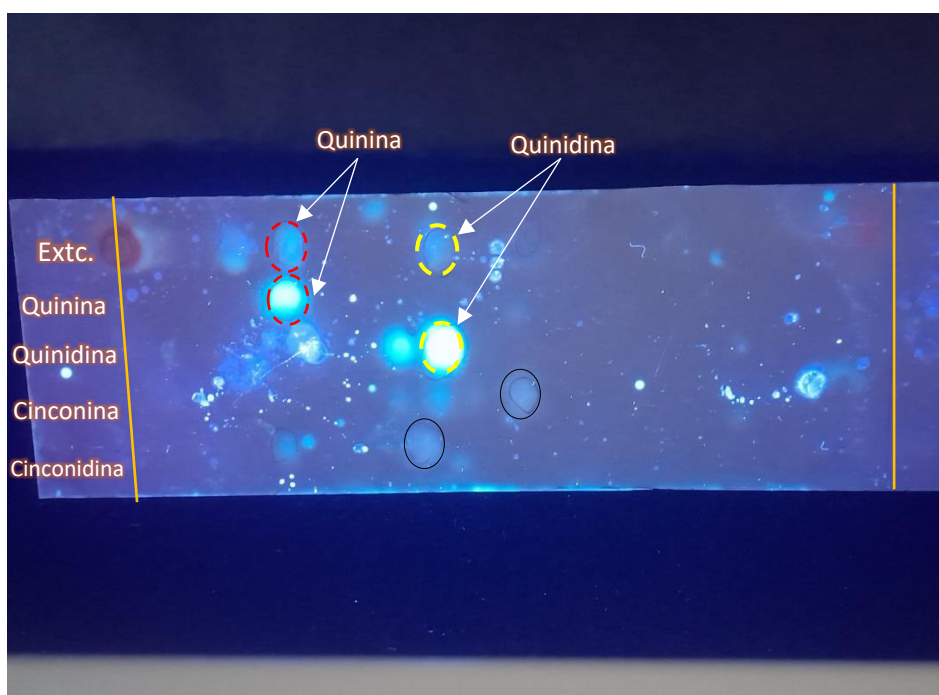


Figura 6. Placa cromatográfica del extracto de hojas y los cuatro patrones.

En la placa cromatográfica perteneciente al extracto de corteza (**Figura 7**), al igual que en la anterior, son cinco manchas en el punto inicial, en la columna del extracto (extr.) solo se observa una mancha la cual coincide con el patrón de la cinconidina. En la **Figura 8** se observa la placa correspondiente al extracto de raíz, en la columna de la solución problema no se observa ninguna mancha.



Figura 7. Placa Cromatográfica del extracto de corteza y los cuatro patrones.



Figura 8. Placa cromatográfica del extracto de raíz y los cuatro patrones.

Se pudo notar que los alcaloides de cinconina y cinconidina son menos visibles en la placa cromatográfica, esto se deduce gracias a las concentraciones en ppm de los estándares (**Tabla 5**), los cuatro tenían una concentración ligeramente variable entre ellos, sin embargo, se nota claramente que los estándares de quinina y quinidina tienen una intensidad mucho mayor a la de los estándares de cinconina y cinconidina; es por ello que quizá no logramos observar estas manchas para las soluciones problema.

4.2. Identificación y cuantificación de los alcaloides de *L. oblongifolia* mediante CG/MS

Los resultados obtenidos mediante Cromatografía de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas tienen cierta coincidencia con los obtenidos en los ensayos de cromatografía en capa fina, entonces, en la **Tabla 14** se muestra la identificación y cuantificación de alcaloides en hojas de *L. oblongifolia*.

Tabla 14. Cuantificación de los alcaloides presentes en hojas de *L. oblongifolia*

ALCALOIDE	Tiempo de retención (TR)	Recuento de área * min	Cantidad (µg/g)
Cinconina	10,27	1954,246	2,1222
Quinina	14,63	60820,860	12,6614
Quinidina	14,64	5066,232	3,7019
Cinconidina	ND	ND	ND
TOTAL		67841,34	18,4854

ND = no detectado

Mccalley (2002) menciona que la corteza “promedio” de la quina tiene alrededor de 7% y 12% del total de alcaloides, de este porcentaje la quinina representa un 70% a 90%, la cinconidina entre 1% a 3% y la quinidina hasta un 1%; realizando el cálculo de porcentajes de los alcaloides encontrados en el extracto de hojas se obtuvo que la quinina representa un 68,49% del total, la quinidina representó un 20,03% del total y la cinconina tuvo 11,48% del total; si bien la comparación se está realizando con datos de corteza, se esperaría que la proporción de alcaloides sea similar en las hojas de quina.

En la **Figura 9** se muestra el cromatograma del análisis de la muestra de hojas, destaca el pico perteneciente a la quinina, esto se debe a que la presencia de este alcaloide es mucho

mayor a los otros alcaloides; el pico perteneciente a la cinchonidina está representada por una línea debido a que no se logró identificar este alcaloide.

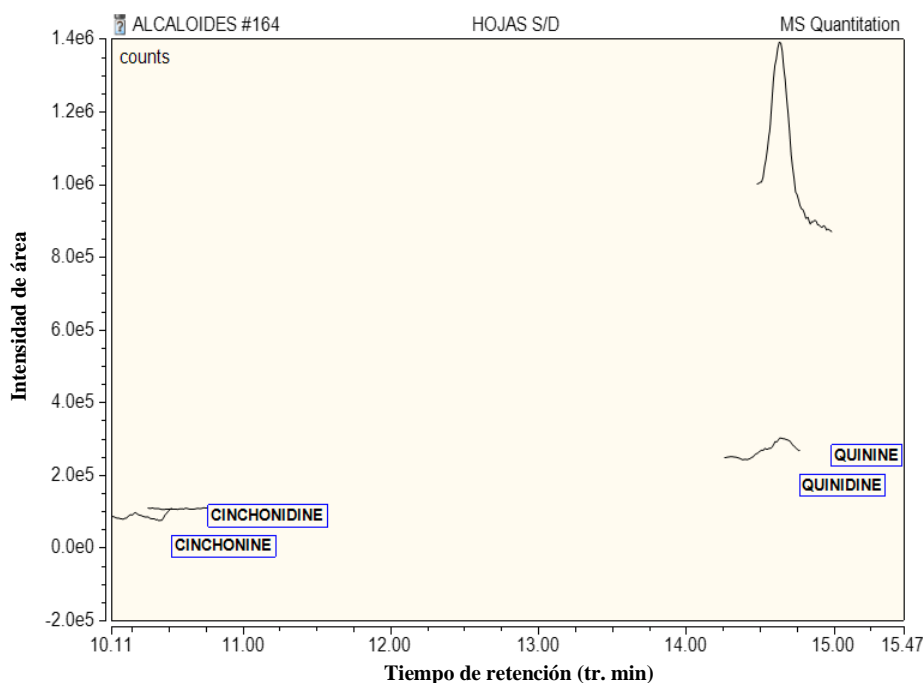


Figura 9. Cromatograma del extracto de hojas de *L. oblongifolia* en el GC/MS.

El árbol de la quina al ser una especie medicinal de mucha importancia es objeto de múltiples estudios con finalidades variables, una de estas investigaciones es el análisis cuantitativo realizado por Hoet et al. (1980), este autor realizó un análisis cuantitativo mediante el método de Bruselas – 1948, en esa investigación obtuvo un resultado del 0,02% y 0,08% de alcaloides totales en dos muestras de *C. pubescens*, colectadas en la Convención (Cusco) y en San Ignacio (Cajamarca).

Las hojas de *L. Oblongifolia* y *C. pubescens* han sido objeto de estudio por parte de Remuzgo et al. (2021), en su investigación han obtenido una concentración total de 0.99 μg de alcaloide por cada gramo de muestra de *L. oblongifolia*; mientras que en esta investigación se obtuvo un total de 18.4854 μg de alcaloide por cada gramo de muestra, siendo la mayor cantidad de quinina; además, determinaron la cantidad para cada alcaloide: 0,24 μg son de cinchonidina, 0,40 μg de quinidina y 0,35 μg de quinina; cabe recalcar que el resultado obtenido por los investigadores fue mediante la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Performance (HPLC) y con muestras de un individuo proveniente de un bosque reservado (edad desconocida), estos aspectos son importantes debido a que los resultados pueden variar por el equipo usado y también por la edad de las muestras con las que se trabaja.

El sustento de evaluar la cantidad de alcaloides en las diferentes partes del árbol está en poder aprovechar al máximo a un individuo de *L. oblongifolia* y de esta manera reducir la presión del aprovechamiento neto de la corteza de esta especie, sobre esto López et al. (2020) realizó el análisis cuantitativo de alcaloides de la especie *L. oblongifolia* usando tres muestras del árbol (edad desconocida): Corteza seca, corteza fresca y hojas; la menor cantidad se detectó en la corteza fresca: $0,0997 \pm 0,0026$ mmol de alcaloide/g, seguido por la muestra de hojas secas con una cantidad de $0,1039 \pm 0,0064$ mmol de alcaloide/g, mientras que la mayor cantidad de alcaloides se detectó en la muestra de corteza seca con una cantidad de $0,1111 \pm 0,0024$ mmol de alcaloide/g; estos resultados difieren a los obtenidos en la presente investigación, en la cual el extracto de hojas tiene mayor cantidad de alcaloides totales.

Los resultados obtenidos en la corteza revelan que esta tiene menor cantidad de alcaloides a comparación con el extracto de hojas, esto se le puede atribuir a diferentes factores, pero para la presente investigación se tiene la teoría de que la aun ausencia de alcaloides y la baja cantidad de los que están presentes es debido a la edad de los individuos con los que se trabajó, así lo menciona Mckey (1974), además, el trabajo se realizó con individuos provenientes de un sistema de asociación de especies forestales que fue instalada con intención de mejorar la calidad del área. En la **Tabla 15** se muestra la cuantificación de alcaloides en corteza de *L. oblongifolia*.

Tabla 15. Identificación y cuantificación de alcaloides en corteza de *L. oblongifolia*

ALCALOIDE	Tiempo de retención (TR)	Recuento de área * min	Cantidad (µg/g)
Cinconina	10,34	1885,829	2,0364
Cinconidina	10,50	2898,665	3,0220
Quinidina	N/D	N/D	N/D
Quinina	N/D	N/D	N/D
TOTAL		4784,49	5,0584

ND = no detectado

En la **Figura 10** se muestra el cromatograma de los extractos de corteza, podemos observar que los picos son más pequeños y su formación no tan clara a comparación del cromatograma de los extractos de hojas.

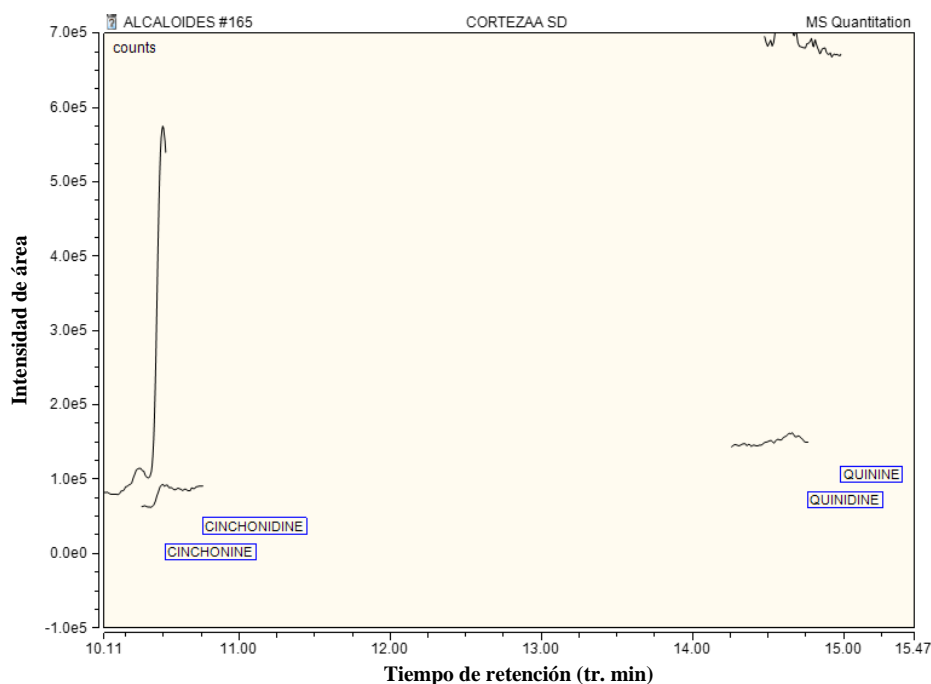


Figura 10. Cromatograma del extracto de corteza de *L. oblongifolia* en el GC/MS.

Manns y Bremer (2010) y Andersson (1997) consideran que los géneros Cinchona, remijia y ladenbergia tienen descendientes en común, por lo cual se deduce que algunas especies de estos géneros presentan alcaloides, este es el caso de *L. oblongifolia*; entonces, tomando esta información, compararemos los resultados de nuestra investigación con los obtenidos por Haro (2022) quien cuantificó los alcaloides de la corteza de *C. micranta* mediante UHPLC usando una muestra de 100g, obtuvo que la corteza en un extracto etanólico 70% tiene la cantidad de quinina de 37667 ppm/100g de muestra.

En las muestras anteriores fue posible identificar y cuantificar los alcaloides presentes, sin embargo, en el extracto de raíz no fue posible identificar ninguno de los cuatro alcaloides de interés (**Figura 11**), no se encontró referencias específicas con respecto a la existencia de estos alcaloides en la raíz de la especie *L. oblongifolia*; sobre esto, De Luca y St Pierre (2000) mencionan que en las raíces se elaboran gran variedad de metabolitos secundarios, aquí se incluye la formación de alcaloides; entonces se podría suponer que los individuos de los cuales se obtuvo la muestra están en proceso de desarrollo y maduración y por ende aun no forman esos alcaloides.

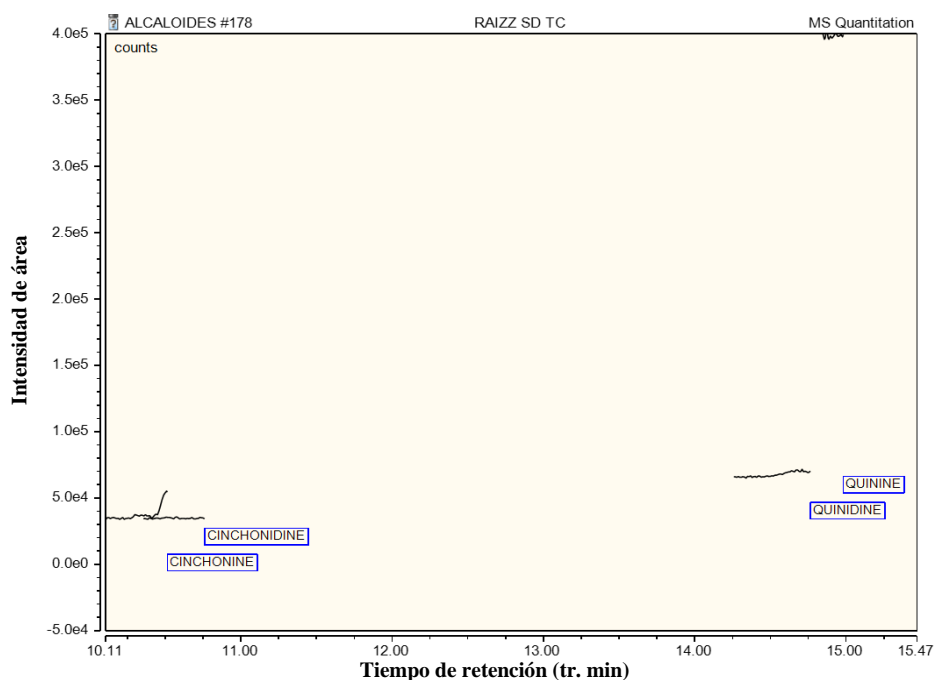


Figura 11. Cromatograma del extracto de raíz de *L. oblongifolia* en el GC/MS.

Cuvi (2018) menciona que se consideran como “quina” a todas las plantas del género cinchona y algunas especies de los géneros Remijia y Ladenbergia cuyas cortezas tienen la capacidad de combatir la malaria, básicamente hace referencia a especies que contengan los alcaloides: quinina, quinidina, cinchonina y cinconidina; además, resalta que la concentración de estos alcaloides varía entre especies e incluso entre individuos de la misma especie según la localidad, altitud, tipo de suelo, época de cosecha y edad del árbol; estos factores son determinantes en nuestra investigación debido a que se ha trabajado con muestras de individuos provenientes de una plantación con edad conocida y de características de suelo pobre.

Podemos observar una disminución en la cantidad de alcaloides presentes entre las hojas, corteza y raíz, con respecto a esto Mckey (1974) menciona que el contenido de alcaloides cambia durante el crecimiento de las plantas, por lo cual las plantas jóvenes tienen menor concentración de alcaloides que las plantas maduras, esto sugiere que a partir de la aparición de alcaloides en la planta estos comienzan a aumentar hasta llegar a un tope en la maduración. Además, aclara que, en cualquier etapa de crecimiento de una planta, las hojas jóvenes suelen tener mayor concentración de alcaloides que las hojas viejas; en algunas especies, los individuos jóvenes y las partes jóvenes de las plantas más viejas contienen alcaloides diferentes que los que predominan cuando la planta es madura; entonces, se espera que la cantidad de alcaloides de los individuos de *L. oblongifolia* de la plantación del IIAP aumente en los próximos años.

V. CONCLUSIONES

- Se logró identificar mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) los alcaloides quinina y quinidina en el extracto de hojas, mientras que en el extracto de corteza solo se identificó la cinconina y en el extracto de raíz no se identificó ningún alcaloide.
- Se cuantificó los alcaloides del extracto de hojas los cuales son los siguientes: la quinina tiene 12,6614 $\mu\text{g/g}$ de muestra, quinidina tiene 3,7019 $\mu\text{g/g}$ y la cinconina tiene 2,7330 $\mu\text{g/g}$, no se logró identificar ni cuantificar el alcaloide de la cinconidina; en el extracto de corteza se determinó: 2,0364 $\mu\text{g/g}$ de cinconina y 3,0220 $\mu\text{g/g}$ de cinconidina, el alcaloide de la quinina y quinidina están ausentes en este extracto; finalmente en el extracto de raíz no se logró identificar ningún alcaloide.

VI. PROPUESTAS A FUTURO

- Realizar el control cualitativo de alcaloides de *L. oblongifolia* perteneciente a la plantación instalada por el IIAP mediante Cromatografía en Capa Fina de manera anual, esto con la finalidad de poder ir identificando el momento en el que el resultado muestre la presencia de todos los alcaloides de interés.
- De igual manera, se propone realizar la cuantificación de alcaloides de *L. oblongifolia* perteneciente a la plantación instalada por el IIAP mediante CG/MS de manera anual, esto con la intención de poder observar el aumento o disminución en la cantidad de alcaloides de los individuos de la plantación.
- Complementar este estudio realizando la cuantificación mediante otras metodologías y usando equipos diferentes como, por ejemplo: Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS) o La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

VII. REFERENCIAS

- Al-Rubaye, A. F., Hameed, I. H., y Kadhim, M. J. (2017). A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *International Journal Of Toxicological And Pharmacological Research*, 9(01). <https://doi.org/10.25258/ijtp.r.v9i01.9042>
- Andersson, L. (1995). Tribes and Genera of the Cinchoneae Complex (Rubiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(3), 409–427. <https://doi.org/10.2307/2399891>
- Andersson, L. (1997). Synopsis of the genus Ladenbergia (Rubiaceae). *Nordic Journal of Botany*, 17(1), 255–299. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1997.tb00316.x>
- Andersson, L., y Antonelli, A. (2005). Phylogeny of the Tribe Cinchoneae (Rubiaceae), Its Position in Cinchonoideae, and Description of a New. *Taxon*, 54(1), 17–28. <https://doi.org/10.2307/25065299>
- Arango, G. J. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Universidad de Antioquia. <https://library.co/document/y43wer5z-alcaloides-y-compuestos-nitrogenados-universidad-de-antioquia.html>
- Ávalos, A., y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Cai, L. (2014). Thin layer chromatography. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 8(1), 6.3.1-6.3.18. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0603s08>
- Campos-Ruíz, J., Cerna-Rebaza, L., y Chico-Ruíz, J. (2014). Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, *Cinchona pubescens*. *Rebiolest*, 2(1). <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/637>
- Canales, N., Gress Hansen, T., Cornett, C., Walker, K., Driver, F., Antonelli, A., Maldonado, C., Nesbitt, M., Barnes, C., y Rønsted, N. (2020). Historical chemical annotations of Cinchona bark collections are comparable to results from current day high-pressure liquid chromatography technologies. *Journal of Ethnopharmacology*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112375>

- Cuarta directiva de la comisión (CEE) 58/490, de 11 de octubre de 1985, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L295/30, de 07 de noviembre de 1985. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31985L0490&from=RO>
- Cuvi, N. (2018). Tecnociencia y colonialismo en la historia de las Cinchona. *Asclepio*, 70(1). <https://doi.org/10.3989/asclepio.2018.08>
- De Luca, V., y St Pierre, B. (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5(4), 168–173. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01575-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01575-2)
- Epperson, M., Hadden, C., y Waddell, T. (1995). Mechanistic Basis for Rate Enhancements in the Methanolysis of Aliphatic Esters of Quinine. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(24), 8113 – 8114. <https://doi.org/10.1021/jo00129a067>
- Eras, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., y Cueva, C. (2021). Inducción in vitro de raíces de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas. *Bosques Latitud Cero*, 11(2), 43–52. <https://doi.org/10.54753/blc.v11i2.1006>
- Fried, B., y Sherma, J. (1999). *Thin-layer chromatography* (Vol. 81). Marcel Dekker.
- Gentry, A. (1993). A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru), with supplementary notes on herbaceous taxa. Conservation International.
- Gutiérrez, M., y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Gutiérrez, MC; Droguet, M." La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". Boletín Intexter, juliol 2002, núm. 122, p. 35-41.
- Haro, K. (2022). *Perfiles cromatográficos y cuantificación de alcaloides totales y quinina de dos especies de Cinchona procedentes de la región Cajamarca*. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Trujillo.

- Henning, C. (2013). Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). *Productos naturales vegetales* (pp. 18-61). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/155455>
- Hoet, P., Gomez, A., y Kanamori, C. (1980). Estudio cuantitativo de los alcaloides en *Cinchona* (Rubiaceae) del Perú. *Boletín Soc. Quím, (Perú)* 1980;46: 298-309.
- Jerez, A. (2017). *Propagación sexual y asexual de la cascarilla (Cinchona officinalis L.), con fines de potencial reproductivo en el vivero Catiglata del consejo provincial de Tungurahua*. [Tesis de grado]. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.
- Larreátegui, D., y Lafuente, L. (2013). REVISIÓN HISTÓRICA MÉDICA: El árbol de quina, 400 años de su descubrimiento en el Ecuador. *Metro Cienc*, 21(1), 1–8. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/equ-7518>
- Lima, N., Moreno, J., Eras, V., Minchala, J., González, D., Yaguana, M., y Valarezo, C. (2018). Propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 20(2), 169–178. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.361>
- Loayza, K., De Oliveira, B., Córdor, E., y Reyna, V. (2010). Estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens*. *ECIPerú*, 7(1). <http://repebis.upch.edu.pe/articulos/eciperu/v7n1/a1.pdf>
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia Universidad Católica Del Perú. <https://doi.org/10.18800/9788483909522>
- López, S., Mostacero, J., Costilla-Sánchez, N., Gil, A., De La Cruz-Castillo, A., y Villena, L. (2020). QUANTIFICATION OF ALKALOIDS OF *Ladenbergia oblongifolia* (HUMB. EX MUTIS) L. ANDERSSON “QUINA TREE.” *REBIOL*, 40(2), 170–176. <https://doi.org/10.17268/rebiol.2020.40.02.05>
- Lovestead, T., y Urness, K. (2019). *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*. ASM International Handbook, vol. 10. https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=926655

- Maldonado, C., Barnes, C., Cornett, C., Holmfred, E., Hansen, S., Persson, C., Antonelli, A., y Rønsted, N. (2017). Phylogeny predicts the quantity of antimalarial alkaloids within the iconic yellow Cinchona bark (Rubiaceae: *Cinchona calisaya*). *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00391>
- Manns, U., y Bremer, B. (2010). Towards a better understanding of intertribal relationships and stable tribal delimitations within Cinchonoideae s.s. (Rubiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 21–39. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.002>
- Martínez, A. (2020). *Química de Productos Naturales*. Universidad de Antioquia. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/16148/1/MartinezAlejandro_2020_QuimicaProductosNaturales.pdf
- Mccalley, D. (1990). Quantitative Analysis of Alkaloids From Cinchona Bark by High-performance Liquid Chromatography. *The Analyst*, 115(10). 1355 – 1358. <https://doi.org/10.1039/AN9901501355>
- Mccalley, D. (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)
- Mckey, D. (1974). Adaptive Patterns in Alkaloid Physiology. *The American Naturalist*, 108(961), 305–320. <https://doi.org/doi:10.1086/282909>
- Meléndez-Gómez, C., y Kouznetsov, V. (2005). Alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. *Universitas Scientiarum*, 10(2), 5–18. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49910201>
- Mesa, A., Quinto, A., y Blair, S. (2013). Cuantificación de quinina en extractos de *Cinchona pubescens* y evaluación de la actividad antiplasmodial y citotóxica. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(6), 592–602. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85629226004.pdf>
- Murauer, A., y Ganzera, M. (2018). Quantitative determination of major alkaloids in Cinchona bark by Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1554, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.038>

- Pucha-Cofrep, D., Rodríguez, J., Rey, Y., Macas, M., Aguinosa, F., y Chocho, A. (2020). El consumo de *Cinchona officinalis* L. durante la emergencia sanitaria COVID-19 en la provincia de Loja, Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 161–174. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/851>
- Quiroga, P. (2013). Cromatografía en capa fina (TLC). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), *Análisis farmacéutico* (pp. 56-77). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/150635>
- Remuzgo, J., Alvarez, J., Sales, F., y Valdivieso, G. (2021). Caracterización taxonómica y fitoquímica de *Cinchona pubescens* y *Ladenbergia oblongifolia* en el ámbito del Valle Alto Huallaga – Región Huánuco. *Rebiol*, 40(2), 242–255. <https://doi.org/10.17268/rebiol.2020.40.02.11>
- Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., y Muñoz, J. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-2>
- Sleeman, R., y Carter, J. F. (2005). MASS SPECTROMETRY/Selected Ion Monitoring. *Encyclopedia of Analytical Science*, 423–430. doi:10.1016/b0-12-369397-7/00355-1
- Striegel, M., y Hill, J. (1996). *Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis*. The Getty Conservation Institute.
- Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Nájera, F., y López-Romero, J. (2002). Direct determination of alkaloid contents in fumaria species by GC-MS. *Phytochemical Analysis*, 13(6), 363–367. <https://doi.org/10.1002/pca.669>
- Suszko-Purzycka, A., y Trzebny, W. (1964). Thin-layer chromatography of cinchona alkaloids I. Separation and identification of vinyl-bases and their dihydro-derivatives. *Journal Chromatography*, 16, 239–242. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)82471-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)82471-7)
- Thermo Fisher Scientific (2018). Unstoppable GC-MS/MS analysis. <https://paperu.com/wp-content/uploads/2019/02/ps-10596-tsq-9000-gc-ms-ps10596-en-1.pdf>

- Vásquez, J., Lápiz, E., Barboza, M., Vásquez, S., y Quispe, L. (2019). Comparación de sustratos en la propagación sexual y asexual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis*). *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 2(3), 77. <https://doi.org/10.25127/aps.20183.407>
- Warhurst, D. (1981). Cinchona Alkaloids and Malaria. *The Lancet*, 1346. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)91364-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)91364-7)
- Zevallos, P. (1989). *Taxonomía, distribución geográfica y status del género Cinchona en el Perú*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

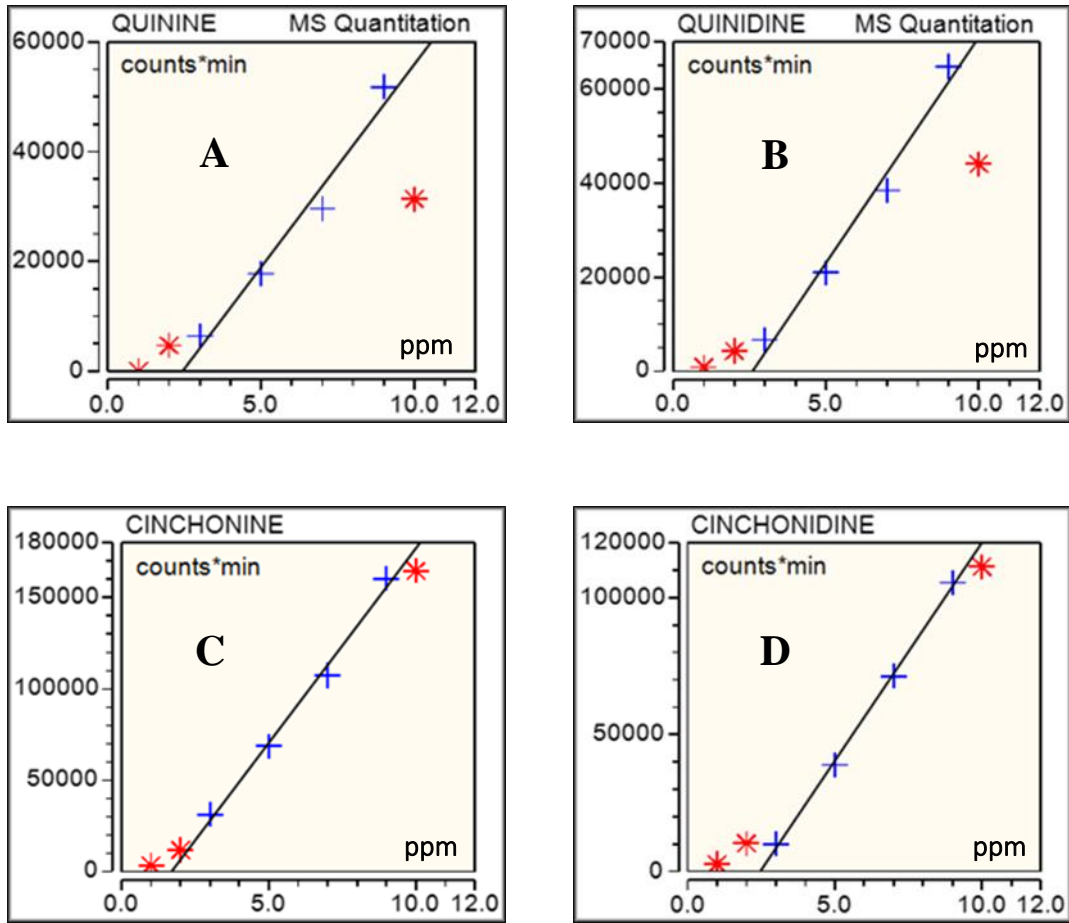
ANEXOS

Anexo A. Calibración de estándares de quinina, quinidina, cinconina y cinconidina.

Tabla 16. Datos de los estándares de quinina, quinidina, cinconina y cinconidina

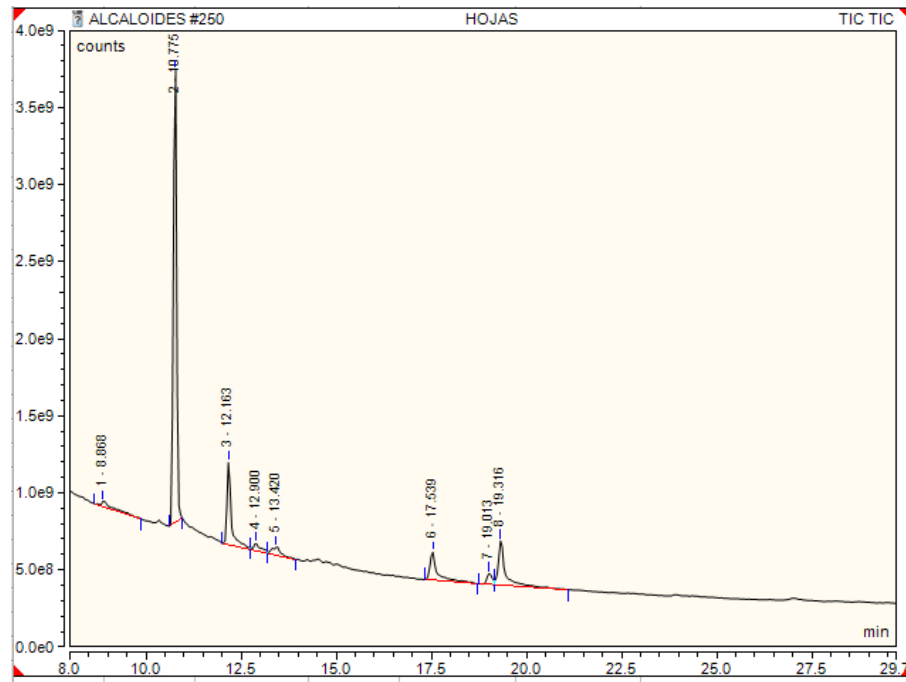
Nombre de inyección	Tiempo de retención (min)	Recuento de área*min	Recuento de altura	Cantidad	
MS Quantitation Peak					
	QUININA	QUININA	QUININA	QUININA	
STD1 PPM1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
STD2 PPM2	14.636	4693.1319	20967.253	3.065	
STD3 PPM3	14.671	6413.0366	26663.367	3.297	
STD4 PPM5	14.612	17796.8443	85841.911	4.836	A
STD5 PPM7	14.602	29625.6653	150205.549	6.435	
STD6 PPM9	14.632	51783.2762	273018.429	9.431	
STD7 PPM10	14.617	31384.1307	179113.074	6.673	
Promedio	14.628				
Dev. Std.Rel.	0.168 %				
	QUINIDINA	QUINIDINA	QUINIDINA	QUINIDINA	
STD1 PPM1	14.539	874.6300	16804.947	2.677	
STD2 PPM2	14.539	4285.4680	59613.036	3.033	
STD3 PPM3	14.534	6694.3887	83188.161	3.284	
STD4 PPM5	14.514	20984.4367	220788.139	4.776	B
STD5 PPM7	14.455	38422.4611	436156.323	6.595	
STD6 PPM9	14.525	64768.0757	641897.960	9.345	
STD7 PPM10	14.469	44076.7312	457747.241	7.185	
Promedio	14.511				
Dev. Std.Rel.	0.239 %				
	CINCONINA	CINCONINA	CINCONINA	CINCONINA	
STD1 PPM1	10.319	3338.9285	36717.982	1.850	
STD2 PPM2	10.304	11684.4479	120958.988	2.242	
STD3 PPM3	10.294	31092.4263	286737.121	3.151	
STD4 PPM5	10.259	68658.8478	775567.975	4.912	C
STD5 PPM7	10.254	107298.3145	1257513.254	6.723	
STD6 PPM9	10.279	160455.2634	1612388.763	9.214	
STD7 PPM10	10.264	164702.8361	1827969.458	9.413	
Promedio	10.282				
Dev. Std.Rel.	0.240 %				
	CINCONIDINA	CINCONIDINA	CINCONIDINA	CINCONIDINA	
STD1 PPM1	10.511	2673.2664	18703.425	2.631	
STD2 PPM2	10.516	10213.2156	67299.105	3.104	
STD3 PPM3	10.511	10012.3259	61942.741	3.091	
STD4 PPM5	10.491	38793.8824	309594.590	4.896	D
STD5 PPM7	10.481	71319.4006	573596.071	6.935	
STD6 PPM9	10.501	105484.7425	788448.722	9.078	
STD7 PPM10	10.496	111311.1815	955861.497	9.443	
Promedio	10.501				
Dev. Std.Rel.	0.120 %				

Donde: A=Quinina, B=Quinidina, C=Cinconina, D=Cinconidina

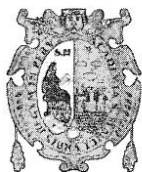


Donde: A=Quinina, B=Quinidina, C=Cinconina, D=Cinconidina

Figura 12. Figuras de los estándares de quinina, quinidina, cinconina y cinconidina.

Anexo B. Cromatograma del corrido de la muestra de hojas en modo scan**Figura 13.** Cromatograma del corrido de la muestra de hojas en modo scan.

Anexo C. Constancia de identificación muestras botánicas de *L. oblongifolia*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
 MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA

EL JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ETNOBOTANICA Y BOTANICA ECONOMICA DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DEJA CONSTANCIA QUE:

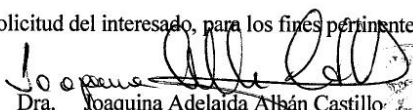
La muestra vegetal recibida del Sr. Glauco Valdiviezo, procedente de la provincia de Leoncio Prado (Tingo María) ha sido determinada según el Sistema APG IV (2016) como sigue:

CLASE: EQUISETOPSIDA C. AGARDH
 SUBCLASE: MAGNOLIIDAE NOVÁK EX TAKHT.
 SUPER ORDEN: ASTERANAE TAKHT.
 ORDEN: GENTIANALES JUSS. EX BERCHT. & J. PRESL
 FAMILIA: RUBIACEAE JUSS.
 GENERO: *LADENBERGIA* KLOTZSCH
 ESPECIE: *Ladenbergia oblongifolia* (Humb. ex Mutis) L. Andersson

PROCEDENCIA: LEONCIO PRADO (TINGO MARÍA)

NOMBRE VERNACULAR : CASCARILLA

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines pertinentes.

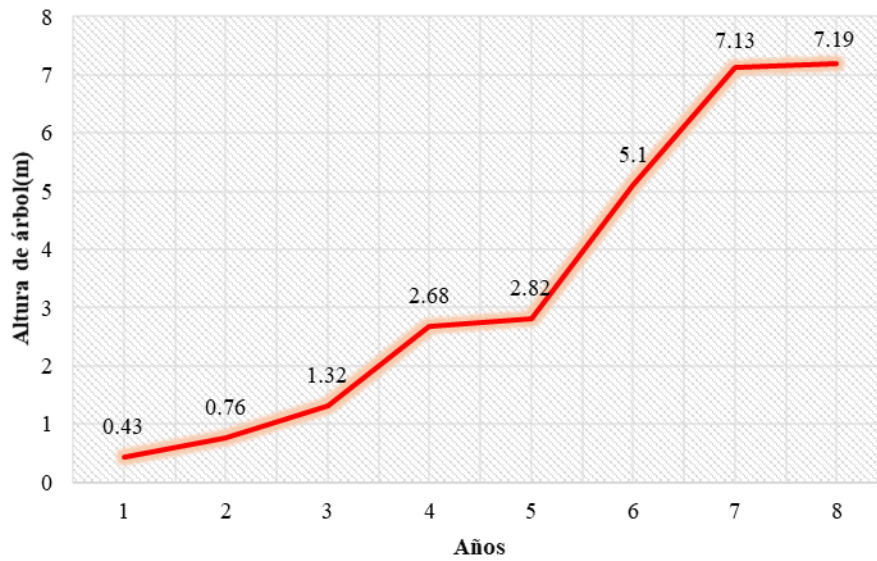

 Dra. Joaquina Adelaida Albán Castillo
 JEFE
 Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica
 Museo de Historia Natural. U.N.M.S.M.

Lima 19 de setiembre 2016

Figura 14. Constancia de identificación de muestras botánicas de *L. oblongifolia*.

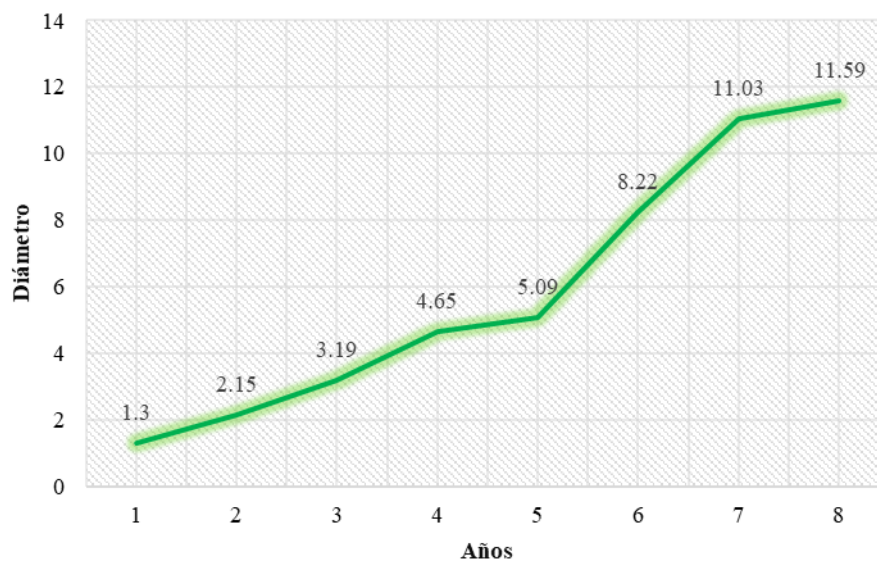
Anexo D. Datos de clase textural, la cantidad de materia orgánica y nitrógeno del suelo de la plantación de quina y evaluación de diámetro y altura de la plantación de quina durante los 8 años, datos del IIAP - Tingo María.

En el año 0 (2015) se registró un suelo con una clase textural franco arcilloso, la cantidad de materia orgánica y el nitrógeno total del suelo, se registraron valores bajos que se encontraron entre 1,34 – 2,69% y 0,06 – 0,12 % respectivamente, la capacidad de intercambio catiónico efectivo del suelo presentó valores que variaron entre 5,73 – 9,73 cmol(+)/kg.



Fuente: IIAP

Figura 15. Desarrollo anual de altura de la plantación de quina con 8 años de instalación.



Fuente: IIAP

Figura 16. Desarrollo anual de diámetro de la plantación de quina (*L. oblongifolia*) con 8 años de instalación.

Anexo E. Panel Fotográfico

Figura 17. Extracción de muestra de corteza de un individuo de *L. oblongifolia*.



Figura 18. Muestra de hojas de *L. oblongifolia*.



Figura 19. Extracción de muestra de corteza de *L. oblongifolia* de un segundo individuo.



Figura 20. Muestra de raíz de *L. oblongifolia*.



Figura 21. Corte transversal de la muestra de raíz de *L. oblongifolia*.



Figura 22. Secado en estufa de las muestras de *L. oblongifolia*.



Figura 23. Triturado de muestras de corteza de *L. oblongifolia*.



Figura 24. Alcaloides puros de quinina, quinidina, cinconina y cinchonidina.

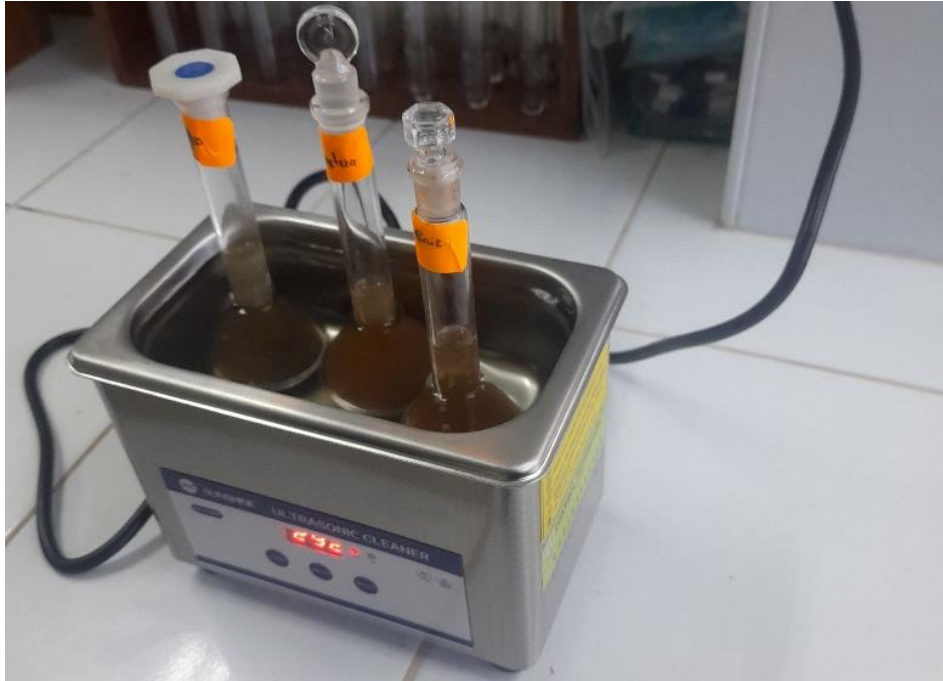


Figura 25. Inicio del proceso de extracción de alcaloides en el baño de ultrasonido para análisis de CCF.

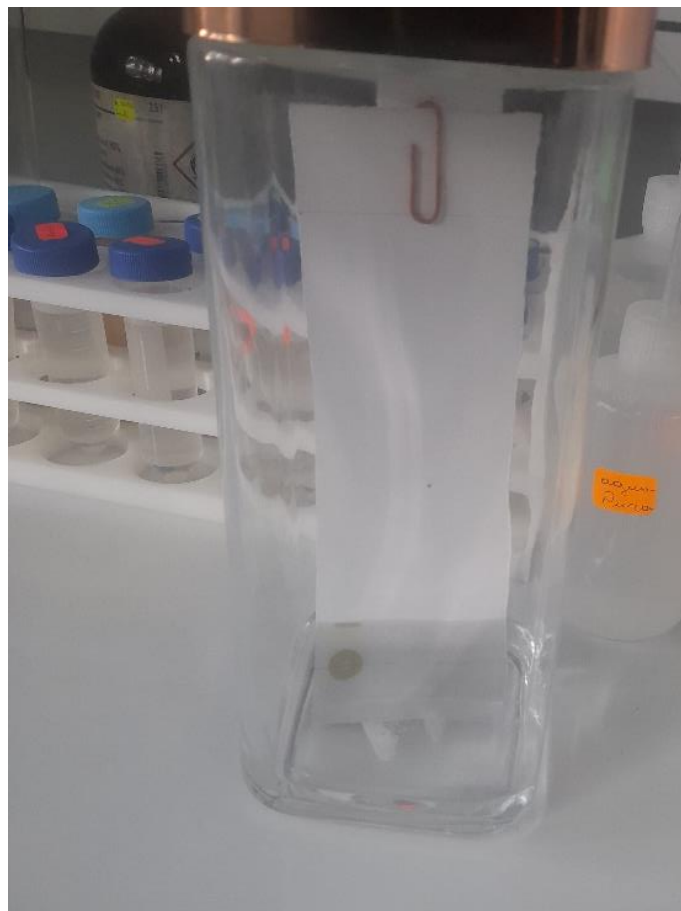


Figura 26. Placa cromatográfica dentro de la cámara corrido.



Figura 27. Pesado de la muestra de corteza para la extracción en el equipo Soxhlet.

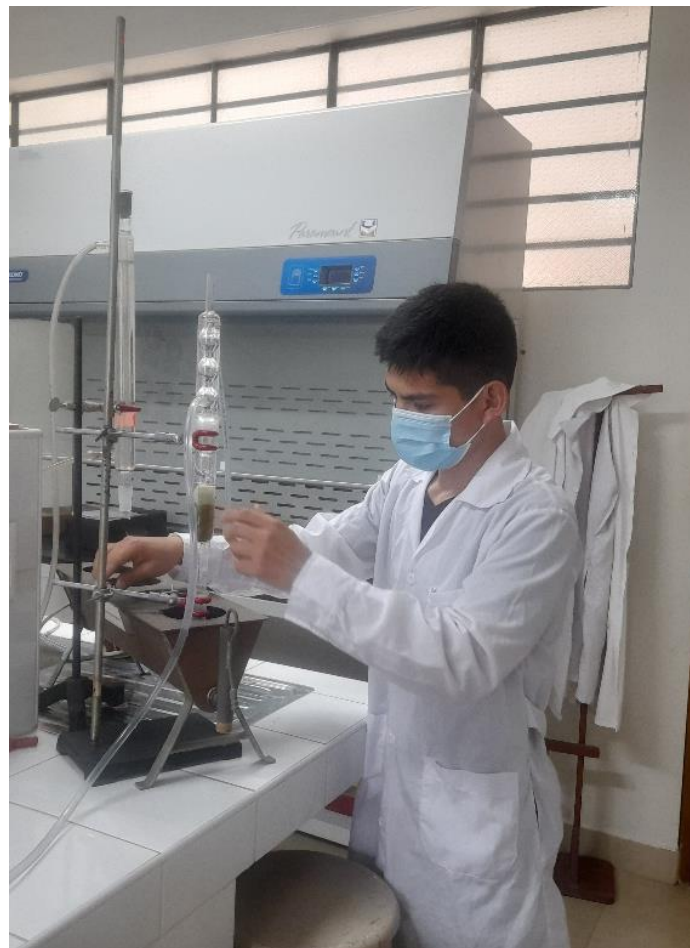


Figura 28. Instalación del equipo Soxhlet.



Figura 29. Pesado de alcaloide puro (quinidina) en la balanza analítica.



Figura 30. Medición del pH luego de haber agregado hidróxido de amonio a la solución ácida.

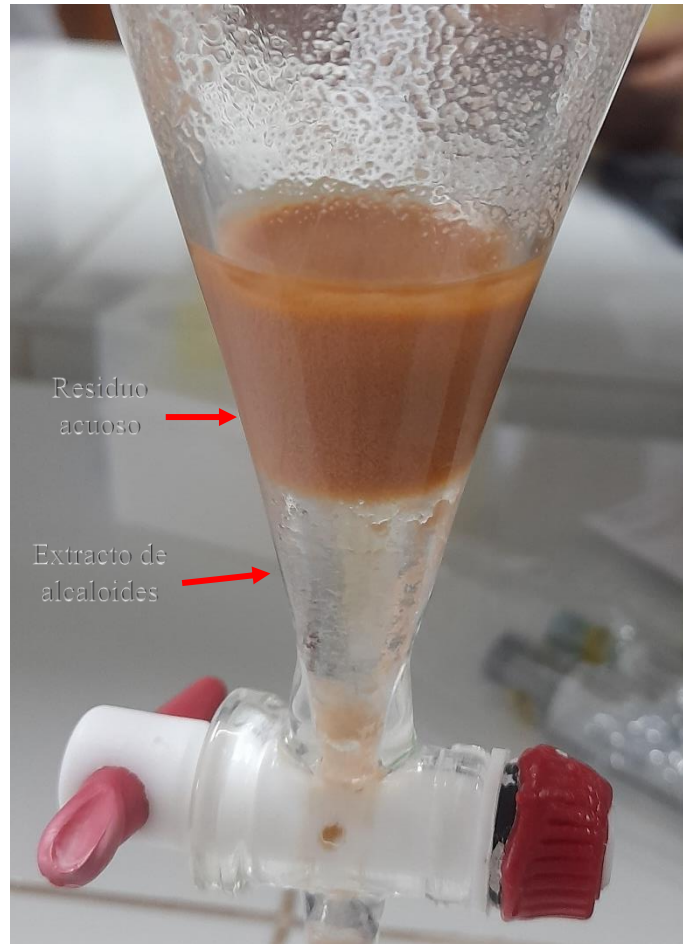


Figura 31. Separación del extracto de alcaloides (diclorometano) y el residuo acuoso.



Figura 32. Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrometría de masas GC/MS.