



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Karin Jürgens Sch.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Victor Fajardo M.
INSTITUCION: Universidad de Magallanes

QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Berberis rotundifolia*.

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

KARLA IVONNE MEZA VAN DER MOLEN

VALDIVIA-CHILE

2008

A mis padres
Rosa y Víctor.

Agradecimientos

Agradecer a los proyectos e instituciones que aportaron en el financiamiento de esta tesis:

- DID UACH, S-200640 “Evaluación del efecto de la raíz de *Berberis buxifolia* en ratones diabéticos inducidos con aloxano”.
- Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Magallanes.

En forma muy especial quiero agradecer a la profesora Karin Jürgens y al Dr. Victor Fajardo, quienes confiaron en mí y en mi trabajo, me guiaron y aportaron con sus conocimientos al desarrollo de mi tesis de grado.

A mi familia y en forma especial a mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente en toda mi etapa de formación personal y profesional, ellos han sido siempre un pilar importante para llegar hasta donde hoy estoy.

A Rodrigo, quien ha sido una persona fundamental en mi vida universitaria, gracias por el apoyo, amistad, complicidad, cariño y amor entregado durante todos estos años. Agradecer también a su familia que me acogieron y entregaron cariño, especialmente durante mi estadía en Pta. Arenas.

A mis amigos y compañeros que me ayudaron con consejos e ideas cuando lo he necesitado, por sus palabras de apoyo y ánimo en mis momentos de cansancio y debilidad.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Magallanes, Amalia, Marisel, Jorge y Antonio, por su cariñosa acogida, conocimientos, confianza y amistad que me entregaron durante mi estadía en el laboratorio. Agradecer en forma especial a Alejandra Oyarzún por su aporte a este trabajo.

Índice de contenidos

Índice de Figuras	7
Índice de Tablas	8
Índice de Gráficos	9
Índice de Anexos	10
Índice de Esquemas	11
1. Resumen	12
1.1. Abstract	13
2. Introducción	14
2.1. Descripción Botánica	17
2.1.1. Familia Berberidaceae	17
2.1.2. Género <i>Berberis</i>	17
2.1.3. <i>Berberis rotundifolia</i>	20
2.2. Química del género <i>Berberis</i>	22
2.3. Actividad biológica del género <i>Berberis</i>	26
2.4. Hipótesis de trabajo	28
2.5. Objetivos	29
2.5.1. Objetivo general	29
2.5.2. Objetivos específicos	29
3. Materiales y Métodos	30
3.1. Materiales	30
3.1.1. Material vegetal	30
3.1.2. Instrumentos	30
3.1.3. Reactivos	31
3.1.4. Material de laboratorio	32
3.1.5. Organismos vivos	32
3.1.6. Lugar de desarrollo	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Recolección del material vegetal	34
3.2.2. Extracción	34
3.2.3. Extracción Ácido-Base	35
3.2.4. Separación Cromatográfica	38

3.2.5. Elucidación Estructural	41
3.2.6. Identificación de compuestos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	42
3.2.7. Determinación de la actividad atrapadora del radical DPPH	43
3.2.8. Bioensayos	45
4. Resultados	48
4.1. Análisis Químico	48
4.1.1. Compuesto CBR5	48
4.1.2. Compuesto CBR46	53
4.1.3. Compuesto CBR99	58
4.2. Evaluación de la capacidad antioxidante	60
4.3. Bioensayos	63
4.3.1. Ensayo de toxicidad general frente a <i>Artemia salina</i>	63
4.3.2. Ensayo de citotoxicidad por inhibición de división celular en huevos fecundados de <i>Loxechinus albus</i>	65
5. Discusión	66
6. Conclusiones	71
7. Referencias bibliográficas	73
8. Anexos	79

Índice de Figuras

Figura 1.	Hojas de algunas especies de <i>Berberis</i> .	18
Figura 2.	Espinas de varias especies de <i>Berberis</i> .	19
Figura 3.	Hojas y espinas de <i>Berberis rotundifolia</i> .	21
Figura 4.	Frutos de <i>Berberis rotundifolia</i> .	21
Figura 5.	Distribución geográfica en Chile de <i>Berberis rotundifolia</i> .	21
Figura 6.	Sistema de Extracción por maceración.	36
Figura 7.	Evaporación a presión reducida en evaporador rotatorio.	36
Figura 8.	Extracción ácido-base.	36
Figura 9.	Cromatografía en columna.	40
Figura 10.	Cromatografía en capa de fracciones BR16 a BR28	39
Figura 11.	Estructura química de la molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.	43
Figura 12.	Espectrofotómetro UV Visible Unicam modelo Helios	45
Figura 13.	Reacción de decoloración, por neutralización del radical DPPH	44
Figura 14.	Principales desplazamientos químicos RMN- ¹³ C para CBR5.	50
Figura 15.	Principales desplazamientos químicos RMN- ¹ H para CBR5.	52
Figura 16.	Desplazamientos químicos RMN- ¹³ C para CBR46	55
Figura 17.	Principales desplazamientos químicos RMN- ¹ H para CBR46.	57
Figura 18.	Principales desplazamientos químicos RMN- ¹ H para CBR99.	59

Índice de Tablas

Tabla 1.	Alcaloides aislados del género <i>Berberis</i> .	25
Tabla 2.	Sistemas de solventes utilizados en la separación cromatográfica.	39
Tabla 3.	Desplazamientos químicos RMN- ¹³ C para CBR5.	49
Tabla 4.	Comparación de desplazamientos químicos RMN- ¹³ C experimentales con datos bibliográficos.	51
Tabla 5.	Desplazamientos químicos RMN- ¹³ C para CBR46.	54
Tabla 6.	Comparación de desplazamientos químicos RMN- ¹³ C experimentales con datos bibliográficos.	56
Tabla 7.	Tiempo de retención para BR46 y muestra patrón.	57
Tabla 8.	Tiempo de retención para BR99 y muestra patrón.	59
Tabla 9.	Actividad antioxidante de <i>Berberis rotundifolia</i> .	60
Tabla 10.	Porcentaje de mortalidad de los individuos de <i>Artemia salina</i> en el ensayo de toxicidad.	63
Tabla 11.	LC ₅₀ obtenidos en el análisis Probit para el ensayo de toxicidad frente a <i>Artemia salina</i> .	64
Tabla 12.	IC ₅₀ obtenido en el análisis Probit para el ensayo de inhibición de la división celular frente a <i>Loxechinus albus</i> , con un intervalo de confianza de 95%.	65

Índice de Gráficos

- Gráfico 1.** Actividad antioxidante frente al radical DPPH de extracto alcaloidal, pronuciferina y berberina en el tiempo. 61
- Gráfico 2.** Actividad antioxidante frente al radical DPPH del extracto alcaloidal, pronuciferina y berberina en el tiempo inicial y final. 62

Índice de Anexos

Anexo 1.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN- ¹ H de la fracción BR5.	79
Anexo 2.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN- ¹³ C de la fracción BR5.	80
Anexo 3.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN- ¹ H correspondiente a la fracción BR46.	81
Anexo 4.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN- ¹³ C correspondiente a la fracción BR46.	82
Anexo 5.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN- ¹ H de la fracción BR99.	83
Anexo 6.	Cromatograma HPLC de la fracción BR46.	84
Anexo 7.	Cromatograma HPLC de Pronuciferina (patrón).	85
Anexo 8.	Cromatograma HPLC de la fracción BR99.	86
Anexo 9.	Cromatograma HPLC de Berberina (patrón).	87
Anexo 10.	Evaluación de la Actividad Antioxidante.	88
Anexo 11.	Evaluación de la Actividad Antioxidante.	89

Índice de Esquemas**Esquema 1.** Esquema de extracción ácido-base

37

1. Resumen

Michay es el nombre común con que se conoce *Berberis rotundifolia*, arbusto perteneciente a la familia Berberidaceae, endémico del sur de Chile que crece entre la VII y IX región. El estudio químico de la familia Berberidaceae ha sido de gran interés al haberse demostrado que estas plantas son fuente importantes de alcaloides bencilisoquinolínicos, compuestos que han presentado importantes actividades farmacológicas. Este trabajo se basó en la determinación de la composición alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y la respuesta de extractos y fracciones frente a bioensayos.

Los compuestos fueron aislados mediante la aplicación de técnicas cromatográficas y se identificaron utilizando diversos experimentos espectroscópicos: RMN-¹H, RMN-¹³C. Del estudio químico se puede informar la presencia de tres alcaloides del tipo bencilisoquinolínicos: pronuciferina, lambertina y berberina.

Con el fin de evaluar la actividad biológica de extractos y metabolitos secundarios mayoritarios, se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH y bioensayos de toxicidad general sobre *Artemia salina* y citotoxicidad en huevos fecundados de *Loxechinus albus*, observándose una notable actividad tanto para el extracto, como para los metabolitos secundarios mayoritarios.

Las características químicas de los alcaloides aislados, junto con las respuestas exhibidas frente a bioensayos, nos permiten definir a estos compuestos como sustancias químicas con actividad biológica, incitando a la realización de nuevos estudios con el fin de esclarecer posibles actividades farmacológicas que estas moléculas pudieran presentar.

1.1. **Abstract**

This study was based on the determination of the alkaloidal composition of *Berberis rotundifolia* and the activity of extracts and fractions in response to bioassays.

Michay is the common name for *Berberis rotundifolia*, a bush belonging to the family Berberidaceae, which is endemic to southern Chile. It grows between the region Maule and Araucania. The chemical study of the family Berberidaceae is of has been of great interest on having demonstrated that as these plants are important sources of benzyloquinoline alkaloids, compounds that have demonstrated important pharmacological activities.

The compounds were isolated by chromatography and identified by NMR-¹H and NMR-¹³C spectroscopy. This chemical study shows the presence of three benzyloquinoline alkaloids: pronuciferine, lambertine and berberine in this species.

In order to evaluate biological activity of extracts and major secondary metabolites majority, was evaluated the antioxidant activity in vitro bioassays were used against the radical DPPH. General toxicity using embryos of *Artemia salina* and citotoxicity in fertilized eggs of *Loxechinus albus*, showed a remarkable activity so much both for the extracts and the major secondary metabolites majority.

The chemical characteristics of the isolated alkaloids, as well as the results obtained from the bioassays, allowed us to define these compounds as evaluate the chemical substances with biological activity of these compounds. Further studies clarifying the activities of these molecules could provide promising new pharmacological applications.

2. Introducción

Las plantas han evolucionado por más de 400 millones de años constituyendo una importante fuente de recursos biológicos, siendo ampliamente usadas en farmacología, medicina y agroquímica (Oyarzún, 2006). El aprovechamiento de especies vegetales con fines alimenticios y medicinales, entre otros, está directamente relacionado con la historia de los pueblos y las civilizaciones que se han sucedido en el planeta. Los egipcios fueron los primeros en utilizar hierbas y flores sagradas para el culto y ritos cotidianos (Bown 1996, Muñoz, 1987); más tarde, en la Edad Media, los árabes perfeccionaron las técnicas de destilación de plantas aromáticas, favoreciendo el desarrollo de la naciente y rudimentaria farmacia.

A partir del siglo XV y con la síntesis de los principios activos obtenidos a partir de especies vegetales, nace en Europa la medicina tradicional, que durante su desarrollo y consolidación en el siglo XIX, se ha convertido en la encargada de liberar al ser humano de sus enfermedades y dolencias (Potocnjak, 2003).

El uso de las plantas medicinales perdió importancia en la terapéutica con la aparición de los productos de síntesis, sin embargo, desde algunos años las especies vegetales han vuelto a recobrar importancia, traduciéndose esto en un mayor desarrollo y divulgación de la fitoterapia (Hoffmann et al, 1992).

Actualmente, el estudio de plantas medicinales es de interés universal, donde la búsqueda de nuevas sustancias útiles como agentes farmacológicos que puedan ser usados directamente como medicamento o bien como modelo para el desarrollo de nuevas drogas, ha llevado a los químicos de productos naturales a trabajar con

productos del metabolismo secundario de plantas y microorganismos (San Martín, 2005, San Feliciano et al, 2005).

Las plantas biosintetizan una gran cantidad de sustancias químicas, por lo que se les considera la fuente de compuestos químicos más importantes que existe. El metabolismo primario da origen a compuestos esenciales y de presencia universal en todas las especies vegetales; estos compuestos son principalmente ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos. Los productos finales del metabolismo secundario, en cambio, no son esenciales, pero poseen diversas funciones como por ejemplo de defensa contra insectos, coloración de flores y frutos, estructuras de membranas y protección frente a la radiación solar. Los metabolitos secundarios son principalmente alcaloides, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos y terpenos (Oyarzún, 2006); siendo los alcaloides uno de los grupos de sustancias naturales de mayor importancia, por la actividad terapéutica que ellos presentan.

Los alcaloides se definen como compuestos orgánicos de origen natural, generalmente vegetal, nitrogenados, derivados generalmente de aminoácidos, de carácter básico más o menos pronunciado, distribución restringida y con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas.

Habitualmente los alcaloides se han clasificado en función de su estructura, sin embargo existen varias formas de clasificarlos: de acuerdo a sus propiedades farmacológicas, distribución botánica u origen biosintético. Esta última forma de clasificación permite agrupar todos los alcaloides naturales conocidos, ya que se originan de un restringido número de aminoácidos o precursores biogénicos.

Los alcaloides al estado natural se encuentran presentes en las angiospermas, predominando en algunas familias como Lauraceae, Magnoliaceae, Renunculaceae, Annonaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Fumariaceae, Rutaceae, Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Berberidaceae; excepcionalmente se encuentran en bacterias, como es el caso de la piocianina presente en *Pseudomona aeruginosa* y en hongos, donde tenemos como ejemplo la presencia de psilocina en hongos alucinógenos mexicanos (Arango, 2002).

2.1. Descripción Botánica

2.1.1. Familia Berberidaceae

La familia Berberidaceae, está constituida por alrededor de 15 géneros y 650 especies, las que se encuentran distribuidas en ambos hemisferios.

Las Berberidaceae son plantas herbáceas, arbustivas o leñosas de 0,3 a 6 metros de altura, en general espinosas. De flores habitualmente hermafroditas, actinomorfas, dímeras o trímeras, con sépalos, pétalos y estambres colocados en verticilos alternantes, pétalos dispuestos en varias series, a menudo de tres piezas cada uno. Hojas persistentes o caedizas, alternas, simples o compuestas, enteras o espinoso-dentadas, pecioladas (Araya, 2006).

Los nectarios son de origen estaminal en 1-2 verticilos (Navas, 1976). Contienen pocos óvulos, ascendentes o numerosos en el lado ventral, anátropos. El fruto es una baya generalmente pruinosa que posee semillas con endosperma abundante y embrión pequeño o largo; cotiledones cortos (Podesta, 1982).

2.1.2. Género *Berberis*

La familia Berberidaceae esta representada en Chile exclusivamente por el género *Berberis*, el que comprende unas 500 especies, encontrándose en nuestro país alrededor de 50 (Fajardo, 1992, Fajardo et al, 2005).

Según la descripción botánica dada por Landrum (1999), las especies del género *Berberis* son arbustos perennes o de hoja caduca, que crecen entre 1 y 5 metros de altura. Presentan hojas que varían en forma y tamaño, dependiendo de la especie (Figura 1).

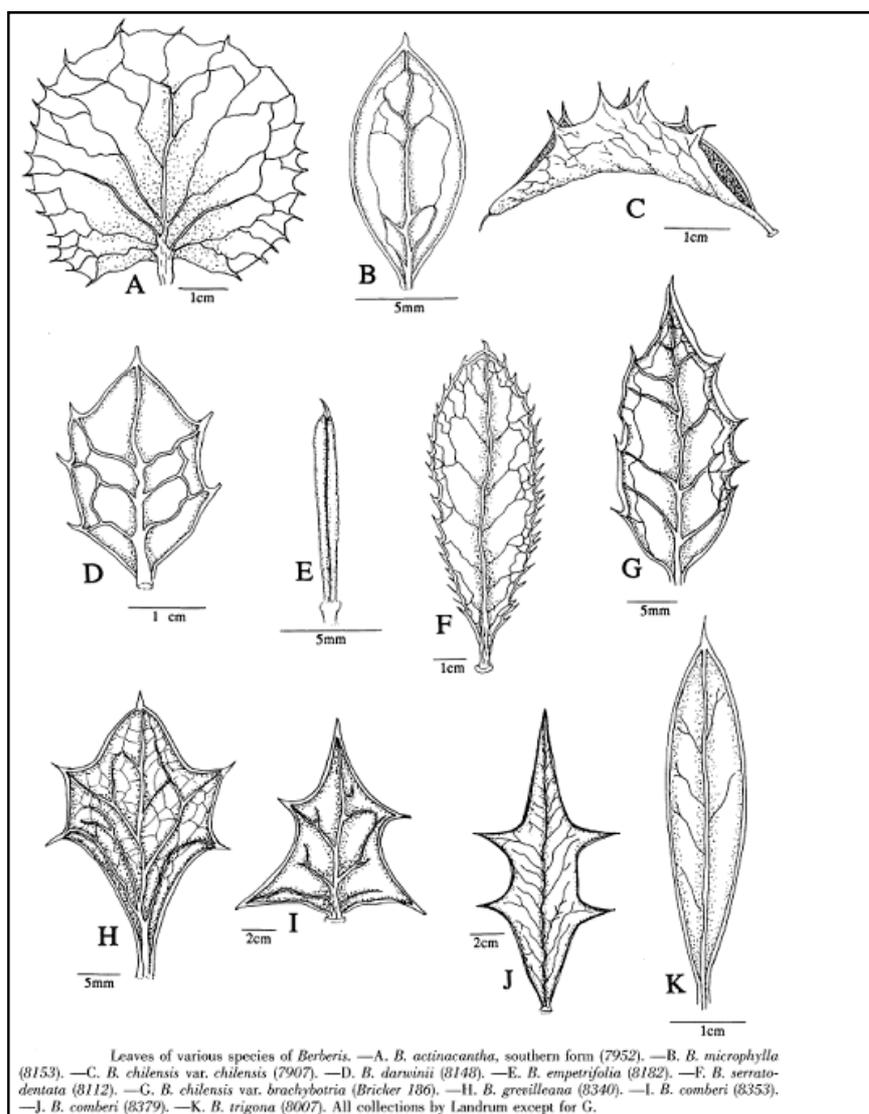


Figura 1. Hojas de algunas especies de *Berberis*.
(Landrum, 1999)

Una de las características botánicas importantes es la presencia de espinas en las hojas o tallos de los arbustos, las cuales varían en su morfología (Figura 2). Las flores y frutos se pueden encontrar solos o en agrupaciones de racimos o umbelas.

Las flores usualmente son de color amarillo, naranja o rojo anaranjado. El perianto típicamente presenta 5 a 6 verticilos de 3 tépalos, los dos verticilos internos presentan dos glándulas nectaríferas en la superficie interna más baja, él o los verticilos restantes se encuentran hacia el exterior y son algo más grandes. Los frutos son de color púrpura oscuro, azulados o negros y a veces están cubiertos de una capa cerosa (Landrum, 1999).

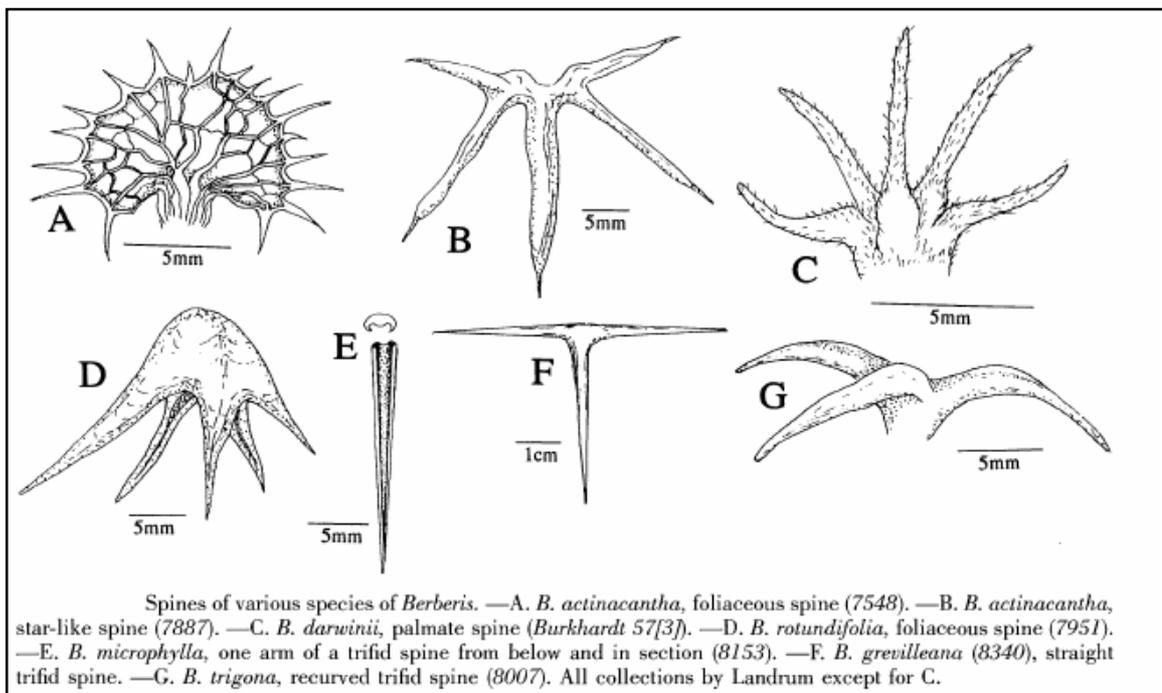


Figura 2. Espinas de varias especies de *Berberis*.
(Landrum, 1999).

2.1.3. *Berberis rotundifolia*

Es un arbusto glabro, que puede alcanzar hasta 1,5 metros de altura. Presenta espinas en forma de estrella, con brazos de 2 a 15 mm de largo. Las hojas son lisas, suborbiculares, elípticas u ovaladas de 1,5 a 5 cm de largo y 0,6 a 4 cm de ancho. Éstas al secarse adquieren un color café claro a verde grisáceo. Las flores se presentan como inflorescencia en forma de umbela o racimo con 7 a 12 flores, el raquis se presenta corto y en conjunto con el pedúnculo alcanza entre 1 y 4 cm de largo, pedicelo de 4 a 12 mm, sustentado por brácteas triangulares de 1 a 2 mm. Las flores miden alrededor de 4 mm y presentan entre 11 a 14 tépalos. Los frutos son subglobosos de 6 a 7 mm de largo, azul-púrpura y usualmente con 5 semillas.

Berberis rotundifolia es endémico de la zona centro y sur de Chile, lo encontramos desde Curicó (VII región) hasta Temuco (IX región).

Este arbusto florece entre los meses de noviembre y enero y es posible encontrarlo con frutos entre enero y marzo (Landrum, 1999).



Figura 3. Hojas y espinas de *Berberis rotundifolia*.
Fuente: www.chileflora.com



Figura 4. Frutos de *Berberis rotundifolia*.
Fuente: www.chileflora.com

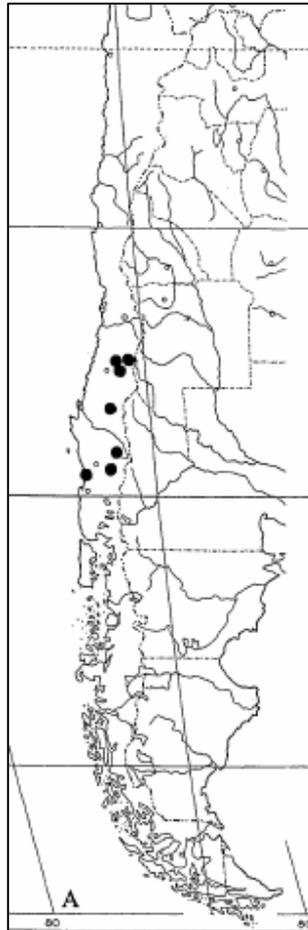


Figura 5. Distribución geográfica en Chile de *Berberis rotundifolia*.
(Landrum, 1999).

2.2. Química del género *Berberis*

El género *Berberis* posee una posición única dentro de la familia Berberidaceae, debido al gran número de especies que lo componen, siendo muchas de ellas estudiadas por sus propiedades medicinales.

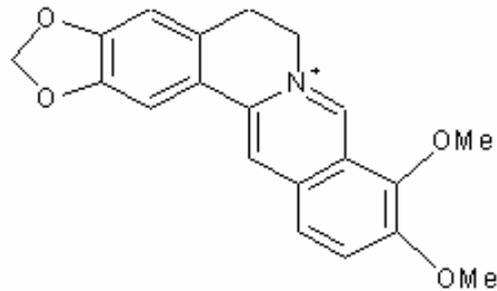
El género *Berberis* se caracteriza por la presencia de alcaloides, a los que se les atribuyen muchas de las propiedades medicinales que presentan estas especies (Araya, 2006).

Los alcaloides son sustancias químicas de origen vegetal de carácter alcalino, esto se atribuye a la presencia de nitrógeno amínico en su estructura (Robinson, 1981). La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica hacen de ellos, junto con los antibióticos, los grupos más importantes de sustancias naturales con interés terapéutico (Araya, 2006).

Las especies del género *Berberis* producen un ordenamiento muy especial de alcaloides, los que en su mayoría constan de una estructura base isoquinolínica y derivan biogénicamente del aminoácido tirosina. Los ordenamientos que se mencionan se pueden clasificar en protoberberinas, aporfinas, bencilisoquinolinas, proaporfinas, protopinas, pavinas, (bis)benciltetrahidroisoquinolinas y dímeros (bis)bencilisoquinolínicos (BBI), entre otros (Fajardo, 1992).

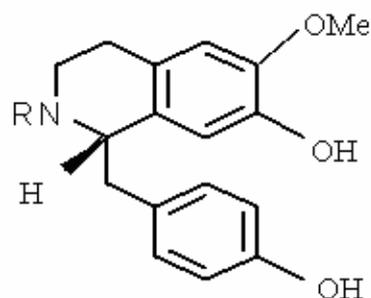
Los alcaloides pertenecientes a los grupos BBI y protoberberinas permanecen como los constituyentes predominantes en las *Berberis*.

Los alcaloides protoberberínicos existen en el género *Berberis* como sales cuaternarias o como tetrahidroprotoberberinas, siendo berberina el principal representante de este grupo de alcaloides y el constituyente común de todas las especies de *Berberis*.



Berberina

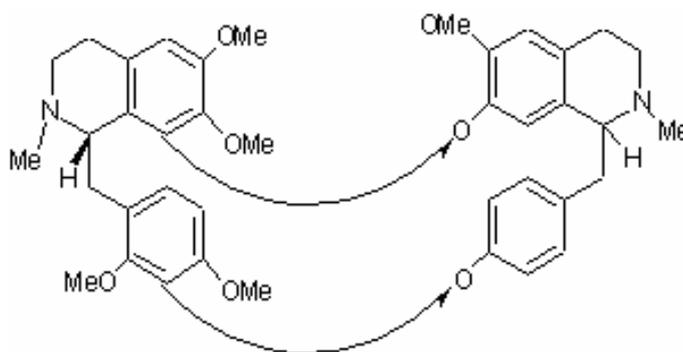
Por otro lado, los alcaloides BBI constituyen el mayor grupo de alcaloides del reino vegetal, conociéndose aproximadamente 250 dímeros de este tipo. La mayoría de los alcaloides BBI están formados por la condensación de dos unidades de N-metilcoclaurina (coclaurina), mientras que un número menor se origina por la condensación de una unidad de N-metilcoclaurina con una unidad de reticulina (Valencia, 1990).



R = H, coclaurina.

R = Me, N-metilcoclaurina.

Una de las moléculas representantes de los alcaloides BBI es calafatina, la que posee un ordenamiento único y especial.



Calafatina

En total se han aislado un poco más de 200 alcaloides de la familia Berberidaceae, de los cuales alrededor de 50 han sido aislados de especies chilenas (Fajardo, 1992).

En la tabla I se muestra una lista de las especies de *Berberis* investigadas en el mundo y los alcaloides identificados en cada una de ellas (Araya, 2006).

Planta	Alcaloides
<i>B. actinacantha</i> Mart. Ex Shult	aconcaguina, andesina, chilena, magnoflorina, pakistanamina.
<i>B. aristata</i> DC	berberina, palmatina.
<i>B. buxifolia</i> Lam	berberina, berbamina, oxiacantina, argemonina, norargemonina, calafatina.
<i>B. chilensis</i> Gillies ex Hook	berbamina, 7-O-Desmetilisotalicberina.
<i>B. darwinii</i> Hook	berberina, berlambina, oxiacantina.
<i>B. empetrifolia</i> Lam	chilena, natalina, natalamina.
<i>B. hakeoides</i> Hook	patagonina, valdiviana, valdiberina.
<i>B. heterophylla</i> Juss	berberina, berbamina, oxiacantina.
<i>B. ilicifolia</i> Forst	berberina, berbamina, oxiacantina, ilicifolina.
<i>B. linearifolia</i> Phil	berberina, jatrorricina, palmatina.
<i>B. lycium</i> Royle	berberina, berbamina, berbericina, berbericina, palmatina.
<i>B. microphylla</i> Forst	papaverina, berbamina, norargemonina, berberina.
<i>B. morrisonensis</i> Hayadata.	berbamina, berberina, isotetrandrina, jatrorricina, magnoflorina, palmatina.
<i>B. nepalensis</i> Spreng	jatrorricina.
<i>B. nervosa</i> Pursh	berberina.
<i>B. montana</i> Gay	berberina, jatrorricina, palmatina.
<i>B. serrata</i> Koehne	berberina, berberrubina, berbamina, columbamina, jatrorricina, oxiacantina, palmatina.
<i>B. trifoliata</i> Moric	berberina.
<i>B. valdiviana</i> Phil	berberina, berbamina, chitalina, natalina, natalina, patagonina.
<i>B. virscens</i> Hook	berbamina, berberina, berberrubina, oxiacantina, palmatina.
<i>B. zebiliana</i> Schneider	berbamina, berlambina (oxiberberina).

Tabla 1. Alcaloides aislados del género *Berberis*.

2.3. Actividad biológica del género *Berberis*

Muchas de las especies del género *Berberis* han jugado un rol importante dentro de la medicina por sus propiedades medicinales. Un ejemplo de esto, es *Berberis vulgaris*, especie que ha sido utilizada por más de 2500 años como alternativa medicinal para el tratamiento de dolencias como diarrea, inflamaciones, úlceras, hemorragias digestivas y enfermedades del tracto urinario (Arayne et al, 2007). Este hecho ha llevado al estudio no sólo de los constituyentes químicos de estas especies, sino que también a la evaluación de las propiedades farmacológicas, que tanto extractos como compuestos aislados de *Berberis* presentarían. Las propiedades otorgadas a las distintas especies son en su mayoría responsabilidad de la presencia de una gran diversidad de compuestos de naturaleza alcaloidal (Fatehi et al, 2005).

A berberina se le atribuyen variadas actividades farmacológicas, lo que ha llevado a realizar diversos estudios que revelan que esta molécula posee una serie de propiedades, tales como antidiarreica, antiarrítmica, antiinflamatoria, efectos antipirético, analgésicos (Kupeli et al, 2002, Yesilada and Kupeli, 2002) y actividad antitumoral al inhibir el complejo DNA-Topoisomerasa II (Takase et al, 1993, Huang et al, 1989, Fukuda, 1999). Además berberina posee características antimicrobianas inhibiendo el crecimiento de muchos microorganismos, incluidos hongos, protozoos y bacterias (Hahn and Ciak, 1976; Lesnau et al, 1990 and Amin et al, 1969).

En el trabajo realizado por Enriz y Fraile (2006), se evaluó la actividad antifúngica de berberina y otros alcaloides estructuralmente relacionados, mostrándose que berberina presenta una interesante respuesta antifúngica en ensayos *in vitro* realizados frente a

varias especies de candidas, sin embargo otros compuestos como canadina y oxiberberina fueron inactivos o presentaron escasa actividad antifúngica.

Otros alcaloides, aislados de distintas especies de *Berberis*, como berbamina, palmatina, oxicantina, magnoflorina y columbamina han sido objeto de estudios in vivo usando varios modelos de ratones, mostrando todos ellos una importante actividad antiinflamatoria (Kupeli et al, 2002). El alcaloide berberrubina, ha exhibido una actividad antitumoral en diversos estudios (Hoshi et al, 1976 y Jeon et al, 2002).

Por todo lo expuesto anteriormente, resulta de sumo interés ampliar el estudio químico, biológico y farmacológico de especies de *Berberis*, ya que estas plantas han mostrado ser importantes fuentes de moléculas biológicamente activas. *Berberis vulgaris* ha sido ampliamente utilizada con el fin de aliviar síntomas o curar enfermedades, llevando a los científicos a realizar diversos estudios biológicos y farmacológicos para esclarecer sus propiedades terapéuticas. *Berberis rotundifolia* se encuentra dentro de las más de 30 especies de *Berberis* chilenas que carecen de estudios que permitan conocer tanto su composición química, como propiedades biológicas. La realización del estudio químico y biológico de *Berberis rotundifolia* pretende aportar al conocimiento actual que se tiene sobre la composición química de las *Berberis* y de esta especie en particular, ampliando así el número de especies chilenas estudiadas. Esta investigación permitirá además establecer por primera vez conocimientos sobre la actividad biológica que esta especie pudiera presentar, información que entregaría una base para apuntar a posibles potencialidades farmacológicas.

2.4. Hipótesis de trabajo

El extracto metanólico de *Berberis rotundifolia* contiene metabolitos secundarios de naturaleza alcaloidal.

Berberis rotundifolia contiene compuestos con actividad antioxidante.

Berberis rotundifolia presenta actividad biológica frente a los bioensayos de toxicidad con *Artemia salina* y citotoxicidad por inhibición de división celular en huevos fecundados de *Loxechinus albus*.

2.5. Objetivos

2.5.1. Objetivo general

Aislar e identificar metabolitos secundarios mayoritarios contenidos en la fracción alcaloidal del extracto metanólico de *Berberis rotundifolia* y evaluar las respuestas de la fracción alcaloidal y de compuestos aislados de ella, frente a los ensayos de toxicidad general, citotoxicidad y capacidad antioxidante.

2.5.2. Objetivos específicos

1. Obtener un extracto metanólico de *Berberis rotundifolia*.
2. Fraccionar el extracto metanólico para obtener una fracción rica en alcaloides y otra enriquecida con metabolitos no alcaloideos.
3. Aislar, purificar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la fracción alcaloidal del extracto metanólico de *Berberis rotundifolia*, utilizando diversas técnicas cromatográficas y de análisis espectroscópico.
4. Evaluar la actividad antioxidante de extractos y compuestos aislados de la fracción alcaloidal frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).
5. Evaluar la respuestas de extractos y compuestos aislados a partir de la fracción alcaloidal del extracto metanólico de *Berberis rotundifolia* frente a los bioensayos de toxicidad general frente a *Artemia salina* y citotoxicidad en huevos fecundados de *Loxechinus albus*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material vegetal

Raíz y partes aéreas de *Berberis rotundifolia*, excluyendo flores y frutos.

3.1.2. Instrumentos

- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Bruker de 80 MHz,
- Aparato de evaporación a presión reducida.

Rotavapor Heidolph tipo w-1.

Rotavapor Heidolph Laborota 4000 efficient.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters, detector 2996 tipo arreglo de diodo, columna C18 en fase reversa de 150 mm.
- Espectrofotómetro Unicam, UV visible.
- Lámpara luz ultravioleta (UV), modelo UVGL-58 de 260-360 nm.
- Molino de acero.
- Bomba de vacío.
- Baño de ultrasonido.

3.1.3. Reactivos

- Metanol p.a. (CH_3OH).
- Metanol p.a. grado HPLC, Merck.
- Metanol deuterado (CD_3OD) Merck.
- Diclorometano p.a. (CH_2Cl_2) Merck.
- Cloroformo p.a (CH_3Cl) Merk.
- Cloroformo deuterado (CD_3Cl) Merk.
- Reactivo de Dragendorff.
- Acetonitrilo p.a. grado HPLC, ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), Merck.
- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), Sigma.
- Agua desionizada p.a grado HPLC, Merk.
- Agua destilada.
- Agua desionizada.
- Ácido clorhídrico (HCl) 5% p/p.
- Amoniacó (NH_4OH).
- Éter de petróleo.
- Sulfato de sodio (Na_2SO_4)
- Tetrametilsilano (TMS)

3.1.4. Material de laboratorio

- Embudo de decantación
- Columnas cromatográficas.
- Cromatofolios de aluminio de gel de sílice F 254 (Merck).
- Gel de sílice tipo HF 254 para columna. (Merck).
- Cámaras cromatográficas.
- Matraces aforados de volúmenes variables.
- Placas Petri.
- Matraz Erlenmeyer de volúmenes variables.
- Balones de volúmenes variables.
- Probetas de volúmenes variables.
- Probetas para RMN.
- Papel filtro Advantec MFS de diámetros variables.
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro.

3.1.5. Organismos vivos

- Larvas de *Artemia salina*.
- Gametos de *Loxechinus albus*.

3.1.6. Lugar de desarrollo

- Instituto de la Patagonia, Laboratorio de Química de Productos Naturales, Universidad de Magallanes, Punta Arenas.

3.2. Métodos

3.2.1. Recolección del material vegetal

Las raíces, tallos y hojas de *Berberis rotundifolia* fueron recolectadas en las cercanías del Volcán Antuco, VIII región, durante el verano del año 1997. La identificación fue realizada por expertos botánicos pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Magallanes y una muestra fue archivada en el Herbario del Instituto de la Patagonia de la Universidad de Magallanes.

3.2.2. Extracción

El material vegetal recolectado se secó a temperatura ambiente y posteriormente se pulverizó en un molino de acero.

La droga pulverizada (11,5 kg) fue extraída por maceración en frío con metanol (3 x 20l) por 72 horas (Figura 6).

El extracto se concentró a presión reducida en un evaporador rotario (Figura 7) a temperatura inferior a 40°C, obteniéndose 531 g de un extracto metanólico seco de *Berberis rotundifolia*.



Figura 6. Sistema de Extracción por maceración.



Figura 7. Evaporación a presión reducida en evaporador rotatorio.

3.2.3. Extracción Ácido-Base

La propiedad más importante y común a la mayoría de los alcaloides es su basicidad, es por ello que su extracción y purificación suelen hacerse en base a esa propiedad. El método más común de extracción y purificación de alcaloides es la utilización de un sistema ácido-base, en el cual los alcaloides son extraídos con soluciones ácidas, para luego purificarse alcalinizando la solución y extrayendo el alcaloide con solvente orgánico. En este proceso, sustancias solubles en agua son separadas de los alcaloides. De esta manera pueden extraerse todos los alcaloides relacionados estructuralmente presentes en el vegetal (De Troiani, 1992, Morales, 1999).

La totalidad del extracto metanólico seco se acidificó con HCl 5% p/p hasta pH 2, luego este extracto ácido se agotó con éter de petróleo, obteniéndose una fase etérea y una fase acuosa. Esta última se trató posteriormente con NH_4OH hasta pH 10, realizándose

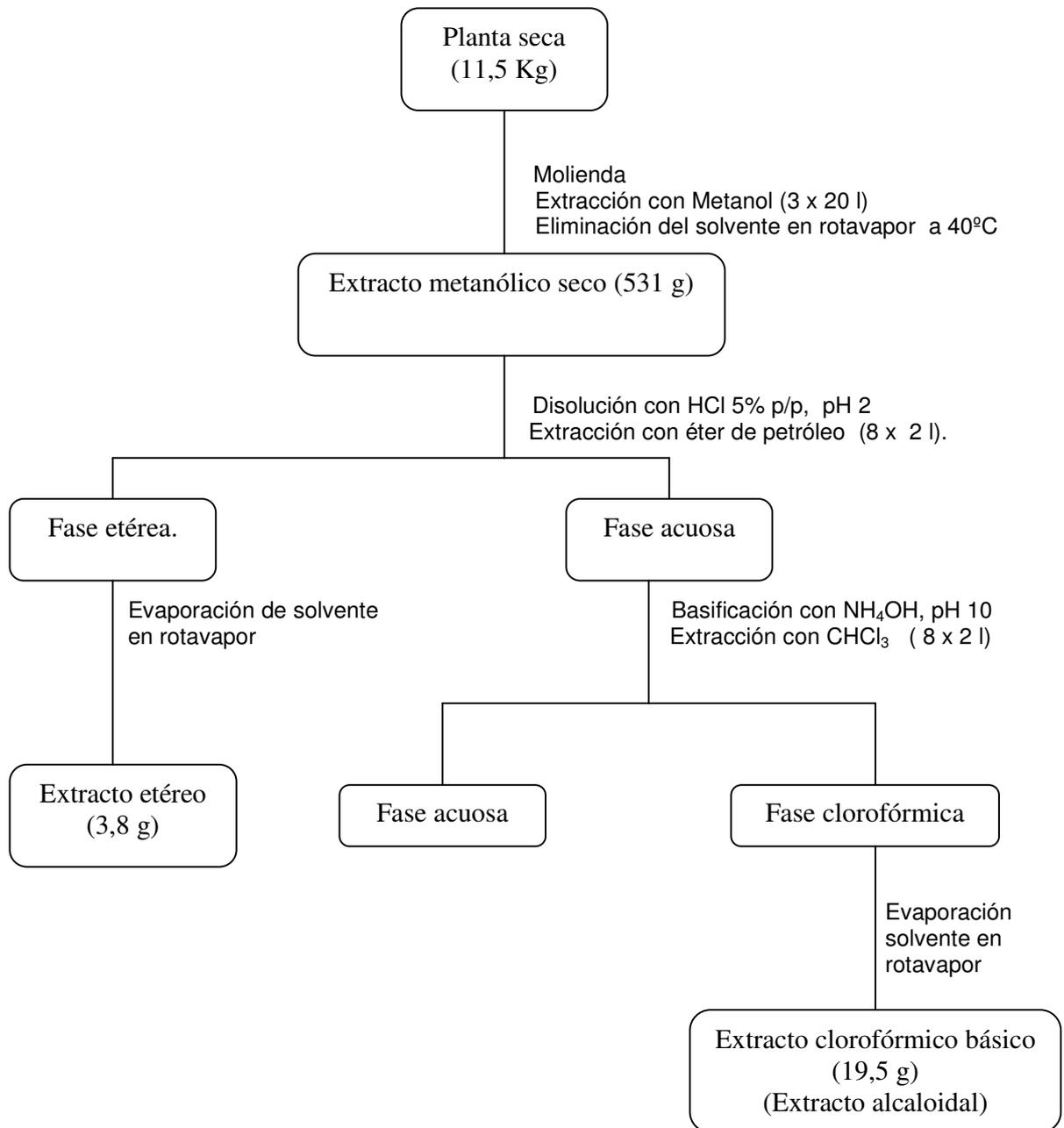
extracciones sucesivas con cloroformo (CHCl_3) hasta Dragendorff negativo (Figura 8).

Se obtuvo así un extracto clorofórmico básico y una fase acuosa.

El extracto clorofórmico básico se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), luego se filtró y se concentró en evaporador rotatorio a presión reducida, obteniéndose un extracto clorofórmico básico seco (19,5 g). Mediante cromatografía en capa fina y posterior revelado con reactivo de Dragendorff, se observó que este extracto contiene abundantes compuestos alcaloideos, por lo que desde ahora en adelante se denominará extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*. El procedimiento descrito se explica en el esquema 1.



Figura 8. Extracción ácido-base



Esquema 1. Esquema de extracción ácido-base

3.2.4. Separación Cromatográfica

La separación de compuestos a través de la cromatografía en columna, comprende el transporte de una especie a través de una columna empacada con una sustancia polar insoluble, adicionando continuamente una fase móvil o eluente. La utilización de gel de sílice (Si(OH)_4) como fase estacionaria, permite la separación de moléculas de acuerdo a su polaridad, de esta forma los componentes más polares son retenidos en la fase estacionaria, mientras que las moléculas de menor polaridad eluyen fácilmente con la adición de la fase móvil. Posteriormente los componentes polares eluyen en orden creciente a medida que la columna se va lavando con solventes orgánicos de creciente polaridad (Skoog, 2000).

El extracto alcaloidal (5 g) se comatografió por columna (4,5 cm de diámetro y empacada hasta 30 cm de altura), empleando sílica gel como adsorbente (Figura 9). La elusión se comenzó con CHCl_3 y se continuó con mezclas de solventes $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (Tabla 2) en distintas proporciones, hasta llegar a 100% CH_3OH .

Se recolectaron 150 fracciones de aproximadamente 25 ml cada una, las que se denominaron BR. Las fracciones se concentraron y luego fueron analizadas por cromatografía en capa fina analítica (CCF) (Figura 10), visualizadas bajo lámpara ultravioleta (UV) y reveladas con reactivo de Dragendorff.

I. CHCl_3	100 (v)
II. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	98:2 (v/v)
III. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	97:3 (v/v)
IV. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	95:5 (v/v)
V. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	93:7 (v/v)
VI. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	90:10 (v/v)
VII. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	80:20 (v/v)
VIII. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	85:15 (v/v)
IX. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	70:30 (v/v)
X. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	60:40 (v/v)
XI. $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	50:50 (v/v)
XII. CH_3OH	100 (v/v)

Tabla 2 . Sistemas de solventes utilizados en la separación cromatográfica.



Figura 9. Cromatografía en columna.

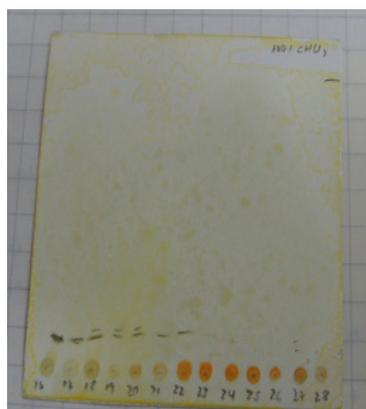


Figura 10. Cromatografía en capa de fracciones BR16 a BR28.

En las fracciones BR2 a BR11 fue posible observar, luego de ser concentradas en el evaporador rotatorio, un sólido amorfo de color amarillo, identificado como alcaloide a través de la reacción de precipitación con reactivo de Dragendorff. Se seleccionó la fracción BR5 para realizar posteriores análisis de identificación y elucidación estructural utilizando HPLC y RMN.

Luego de concentrar las fracciones BR40 a BR49 se obtuvo un sólido amorfo color violeta. La fracción BR46 se apartó para posteriores ensayos de identificación y elucidación estructural. En estas fracciones fue posible identificar la presencia de un compuesto de naturaleza alcaloidal con reactivo de Dragendorff.

En las fracciones BR90 a BR113 se observaron cristales en forma de aguja de color amarillo luego de concentrar las fracciones en el rotavapor. La fracción BR99 se separó para posteriores análisis de identificación y elucidación de la estructura del compuesto, el que previamente fue identificado como alcaloide por reacción positiva con reactivo de Dragendorff.

3.2.5. Elucidación Estructural

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de las técnicas más potente de las que disponen actualmente los químicos para la identificación y elucidación de las estructuras de las especies químicas (Skoog, 2000).

La espectroscopía de RMN permite examinar la estructura molecular en el entorno de núcleos individuales, particularmente hidrógeno y carbono, entregando información detallada respecto a la constitución de la molécula.

Los experimentos de RMN-¹H y RMN-¹³C unidimensionales proporcionan información sobre la naturaleza de los hidrógenos y de los carbonos, por medio de la integración de las señales y de los acoplamientos spin-spin, lo que se conoce como multiplicidad de la señal y magnitud de la constante de acoplamiento respectivamente.

Del espectro protónico, se deduce el número de hidrógenos y el modo en que éstos se distribuyen en la molécula. El número de señales presentes en el espectro de carbono indica el número de átomos de carbono presentes en la molécula (Domínguez, 2005).

Las estructuras de los compuestos aislados del extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* se establecieron de acuerdo a las características espectroscópicas de RMN-¹H y RMN-¹³C. Las muestras fueron analizadas utilizando cloroformo (CDCl₃) y metanol deuterado (CD₃OD) como solventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna del equipo.

Las fracciones sometidas a análisis espectroscópico de RMN fueron BR5, BR46 y BR99.

3.2.6. Identificación de compuestos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, debido a su versatilidad y amplio campo de aplicación. Los componentes de la muestra, previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil), son forzados a atravesar la columna cromatográfica gracias a la aplicación de altas presiones. El material interno de la columna, fase estacionaria, está constituido por un relleno capaz de retener de forma selectiva los componentes de la mezcla. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas de disolventes y distintos tipo de relleno. Como resultado final los componentes de la mezcla salen de la columna separados en función de sus tiempos de retención en lo que constituye el cromatograma. A través del cromatograma se puede realizar la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas (Skoog, 2000).

Para la identificación de compuestos obtenidos a partir del extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* se aplicó la técnica de HPLC. Se utilizaron patrones de los compuestos aislados y se compararon los tiempos de retención de éstos con los de los compuestos aislados.

Para la disolución de las muestras se utilizó metanol (CH₃OH) grado HPLC. El sistema de elusión empleado fue metanol:agua en proporción 80:20.

Las muestras se analizaron por quintuplicado, a temperatura de 20°C y condiciones atmosféricas de 1.010 milibares de presión y 60 % de humedad relativa.

Las fracciones analizadas fueron BR46 y BR99.

3.2.7. Determinación de la actividad atrapadora del radical DPPH

Este ensayo permite evaluar la actividad antioxidante de soluciones, mediante la capacidad atrapadora de radicales libres, utilizando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de color violeta y que absorbe a 517 nm. La reducción y estabilización de este radical por los antioxidantes da lugar a la decoloración de éste, produciendo una disminución de la absorbancia, la cual se puede medir a la longitud de onda antes mencionada (Tiap-Ling, 2004). El grado de decoloración de la solución de DPPH indicaría la eficiencia atrapadora de los productos agregados (Kukic et al, 2006).

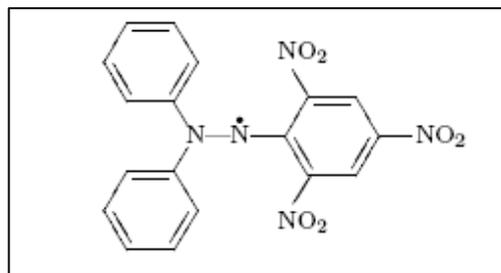


Figura 11. Estructura química de la molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. Fórmula molecular $C_{18}H_{12}N_5O_6$.

Para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos y fracciones de *Berberis rotundifolia*, se utilizó una solución metanólica de DPPH a una concentración de 20mg/L. Las soluciones de extractos y fracciones a evaluar se prepararon en concentración de 1mg/ml.

El protocolo seguido es el que se describe a continuación: a 1,5 ml de solución de DPPH (20 mg/L) se agrega 750 μ l de una solución de los extractos/fracciones (1 mg/ml). Una vez mezcladas las soluciones se mide la absorbancia a 517 nm (Figura

12) y hasta los 30 minutos con intervalos de 5 minutos, con el objetivo de ver la decoloración en el tiempo. Se realiza un blanco en las mismas condiciones, con 750 μ l de agua desionizada (Figura 13).

El porcentaje de inhibición se calculó empleando la siguiente fórmula:

% de inhibición= $[1 - (\text{Absorbancia de la muestra}/\text{Absorbancia del blanco})] \times 100$
(Somparn et al, 2007; Trusheva et al, 2006).

Los valores se expresan como el promedio \pm la desviación estándar de cinco determinaciones.



Figura 12. Espectrofotómetro UV Visible Unicam modelo Helios.



Figura 13. Reacción de decoloración, por neutralización del radical DPPH.

3.2.8. Bioensayos

En términos generales un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos o como cualquier método, por medio del cual, alguna propiedad de una sustancia o material es medida en términos de la respuesta biológica que produce.

El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa la respuesta del 50% de los individuos de una población en estudio, es conocido como dosis efectiva media. Cuando la respuesta esperada es la muerte, este parámetro se denomina dosis letal media (DL_{50}) (Silva, 2002). De esta forma se puede correlacionar la bioactividad mediante el valor de la DL_{50} y el grado de toxicidad que el material en estudio presenta.

Para la determinación de la actividad biológica se utilizaron los siguientes bioensayos:

- 1) Ensayo de toxicidad general frente a *Artemia salina*
- 2) Ensayo de citotoxicidad por inhibición de división celular en huevos fecundados de *Loxechinus albus*.

Los resultados fueron analizados a través del programa estadístico Probit.

3.2.8.1. Ensayo de toxicidad general frente a *Artemia salina*

Artemia salina es un crustáceo fácil de cultivar en los laboratorios. Los ensayos realizados con este organismo pueden ser considerados útiles y confiables para estudios de toxicidad de sustancias con distintos efectos biológicos (Osorio, 2005). El protocolo para este ensayo se describe a continuación: los huevos de *Artemia salina* son cultivados en agua de mar en un recipiente cerrado, siendo expuestos a luz artificial por un periodo de 48 horas, produciéndose así la eclosión de estos microcrustáceos, ya que estos organismos presentan fototactismo positivo. Para obtener una mayor viabilidad de los nauplius, estos se someten a condiciones de temperatura que varían entre los 25°C y 30°C y a una salinidad que varía entre 25 y 35%. Después de 48 horas estos organismos son colectados y expuestos a las muestras evaluadas.

En el ensayo de toxicidad se evaluaron el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y fracciones obtenidas a partir de él. Las muestras a ensayar se preparan a tres concentraciones conocidas: 10, 100 y 1000 ppm. Para cada una de las concentraciones se utilizaron 10 larvas de *Artemia salina*. El recuento de las larvas sobrevivientes se realizó después de las 24 horas de aplicado el ensayo. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Los resultados se expresaron como la concentración efectiva para matar el 50% de la población (CL₅₀).

3.2.8.2. Ensayo de citotoxicidad por inhibición de división celular en huevos de *Loxechinus albus*.

La utilización de la especie de *Loxechinus albus* se limita sólo a los meses de agosto, septiembre y octubre debido a que los meses restante las células se encuentran en periodo de crecimiento gonadal.

El protocolo para la realización del ensayo de citotoxicidad se describe a continuación: la inducción del desove se lleva a cabo inyectándole a los individuos adultos 10 ml de una solución de KCl 0,5 Molar a través de la membrana peristomal. Los gametos se colocan en matraces de 250 ml que contienen agua de mar filtrada a 0,45 y 0,2 μm . Si el ejemplar estimulado es hembra se liberan ovocitos de color naranja, si es macho se libera un fluido blanquecino. Las soluciones de gametos se mantienen a 11 °C hasta el momento de realizar la fecundación.

Para la evaluación de los porcentajes de inhibición, se utiliza 1 ml de huevos fecundados, los que son introducidos en las soluciones a evaluar. Los resultados se obtienen al cabo de 4 a 6 horas, después de completar la primera división celular (Oyarzún, 2006).

Las muestras evaluadas en este ensayo correspondieron al extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y las fracciones BR46 y BR99. Las muestras ensayadas se prepararon a tres concentraciones conocidas: 10, 100 y 1000 ppm.

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados como la concentración inhibitoria media (IC_{50}).

4. Resultados

4.1. Análisis Químico

Del fraccionamiento del extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*, mediante cromatografía en columna, se aislaron tres compuestos de naturaleza alcaloidal, previamente reconocidos como tales por su reacción frente al reactivo de Dragendorff, mostrando la típica coloración anaranjada de compuestos nitrogenados. La identificación y elucidación estructural se llevó a cabo utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN-¹H y RMN-¹³C monodimensional. La identidad se confirmó utilizando HPLC, mediante comparación con patrones.

4.1.1. Compuesto CBR5

El primer compuesto se identificó en la fracción BR5 y se denominó experimentalmente CBR5, el que se observó como un sólido amorfo de color amarillo.

El espectro de RMN-¹H de CBR5 se muestra en el Anexo 1 y presenta las siguientes señales:

- Dos singuletes δ 3,87 y 3,95 ppm, atribuidos a dos grupos metoxilos.
- Dos doble dobles a δ 6,85 (J= 8,47 Hz) y a δ 7,00 ppm (J= 8,43 Hz), característico de protones con acoplamiento orto.
- Un singulete a δ 5,94 ppm, integrada para dos protones perteneciente a un grupo metilendioxi.

- Tres singuletes correspondientes a protones aromáticos de desplazamientos químicos δ 5,66, 6,61 y 7,13 ppm.

En el espectro de RMN-¹³C (Anexo 2), se observó la presencia de 20 átomos de carbono con desplazamientos químicos que caracterizan a un alcaloide con dos grupos metoxilos a δ 56,37 y 60,93 ppm y un grupo metilendioxi a δ 101,05 ppm.

Los valores obtenidos en el espectro RMN-¹³C para cada una de las señales, se muestran en la siguiente tabla.

Número de señal	Señales ¹³ C-RMN Experimental (ppm)
1	30,46
2	51,63
3	56,37
4	60,93
5	73,59
6	97,04
7	101,06
8	104,19
9	105,52
10	108,11
11	114,73
12	118,62
13	125,03
14	128,79
15	129,30
16	137,95
17	146,76
18	147,56
19	149,69
20	151,17

Tabla 3. Desplazamientos químicos RMN-¹³C para CBR5.

De las características estructurales entregadas por los espectros de RMN y los datos bibliográficos, se puede postular que el compuesto presente en la fracción BR5 responde a un alcaloide protoberberínico. De acuerdo a los datos espectroscópicos La estructura química propuesta para CBR5 respondería al alcaloide Lambertina.

Los principales desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C para CBR5 se muestran en la figura 14.

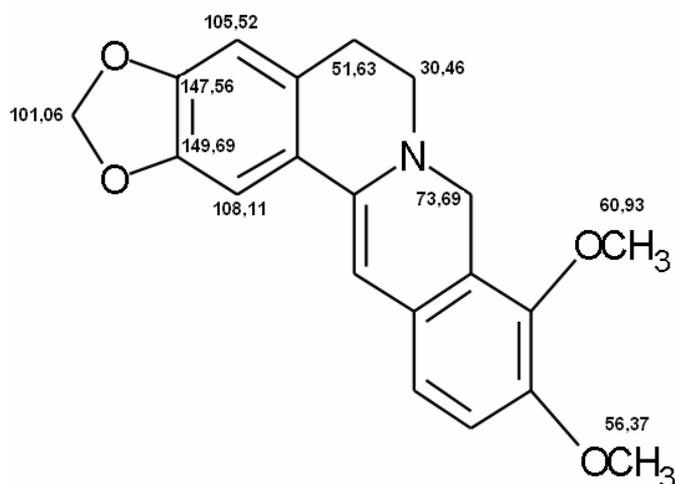


Figura 14. Principales desplazamientos químicos RMN- ^{13}C para CBR5.

La siguiente tabla muestra una comparación de los datos espectroscópicos de RMN- ^{13}C obtenidos experimentalmente para CBR5 con los datos hallados en la literatura.

Número de Carbono	Señales ^{13}C -RMN Experimental (ppm)	Señales ^{13}C -RMN Literatura (ppm)
6	30,46	26,44
5	51,63	57,26
- OCH ₃	56,37	55,29
- OCH ₃	60,93	61,92
8	73,59	-----
7 ^a	97,04	-----
-OCH ₂ O-	101,06	102,00
4 ^a	104,19	-----
4	105,52	105,46
1	108,11	108,34
12	114,73	-----
12 ^a	118,62	-----
11	125,03	123,42
12	128,79	127,13
8 ^a	129,30	-----
7	137,95	-----
10	146,76	-----
3	147,56	147,72
2	149,69	149,87
9	151,17	150,33

Tabla 4. Comparación de desplazamientos químicos RMN- ^{13}C experimentales con datos bibliográficos.

Los principales desplazamientos químicos RMN- ^1H para CBR5 se muestran en la figura 15.

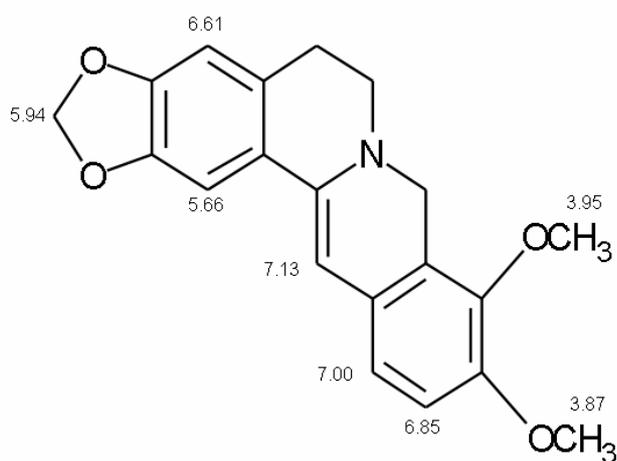


Figura 15. Principales desplazamientos químicos RMN- ^1H para CBR5.

4.1.2. Compuesto CBR46

El segundo compuesto se identificó en la fracción BR46 y se denominó experimentalmente CBR46. Se observó como un sólido amorfo de color violeta.

El espectro de RMN-¹H (Anexo 3) de este compuesto presenta las siguientes señales:

- Un sigulete a δ 2,33 ppm, atribuido a un grupo N-metilo.
- Dos singuletes a δ 3,55 y 3,75 ppm, correspondiente a dos grupos metoxilos.
- Cuatro doble dobletes a: δ 7,06; 6,78; 6,40; y 6,17, típicos de protones de un sistema dienónico.
- Un singulete a δ 6,59, asociado al anillo A en C-3.

El espectro de RMN-¹³C mostrado en el Anexo 4 da cuenta de 19 señales, cada una de ellas correspondiente a un carbono (Tabla 5). Una de ellas es característica del grupo carbonilo a δ 186,01 ppm, dos señales típicas de grupos metoxilos a δ 56,18 ppm y 60,82 ppm y una señal a δ 43,30 ppm correspondiente al grupo N-metilo.

La tabla 5 muestra los desplazamientos químicos obtenidos experimentalmente para CBR46.

Nº de señal	Señales ¹³C-RMN Experimental (ppm)
1	27,3
2	43,3
3	47,3
4	51,1
5	54,8
6	56,2
7	60,8
8	65,6
9	111,8
10	127,2
11	127,6
12	128,0
13	132,5
14	134,3
15	144,3
16	149,9
17	153,3
18	153,4
19	186

Tabla 5. Desplazamientos químicos RMN-¹³C para CBR46.

De acuerdo a los datos obtenidos mediante los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , se puede señalar que la estructura del compuesto identificado en la fracción BR46, responde a un alcaloide proaporfínico de nombre Pronuciferina.

Los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C se describen en la figura 16.

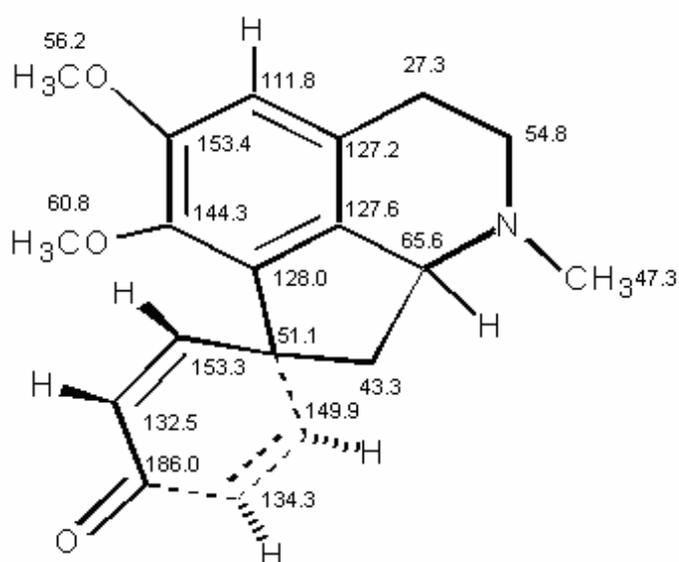


Figura 16. Desplazamientos químicos RMN- ^{13}C para CBR46

La tabla 6 muestra una comparación de los valores de desplazamientos químicos RMN- ^{13}C obtenidos experimentalmente para CBR46 con datos bibliográficos referentes al alcaloide pronuciferina.

Nº Carbono	Señales ¹³C-RMN Literatura (ppm)	Señales ¹³C-RMN Experimental (ppm)
1	144,6	144,3
2	154,2	153,4
3	111,6	111,8
3 a	125,6	127,2
3 b	127,5	127,6
3 c	128,3	128,0
4	25,0	27,3
5	53,9	54,8
6 a	64,5	65,6
7	40,6	43,3
8	148,4	149,9
9	132,4	134,3
10	185,4	186,0
11	128,5	132,5
12	152,0	153,3
13	50,4	51,1
N-CH ₃	43,6	47,3
CH ₃ O-1	60,6	60,8
CH ₃ O-2	56,0	56,2

Tabla 6. Comparación de desplazamientos químicos RMN-¹³C experimentales con datos bibliográficos.

Los principales desplazamientos químicos del espectro protónico se muestran en la figura 17.

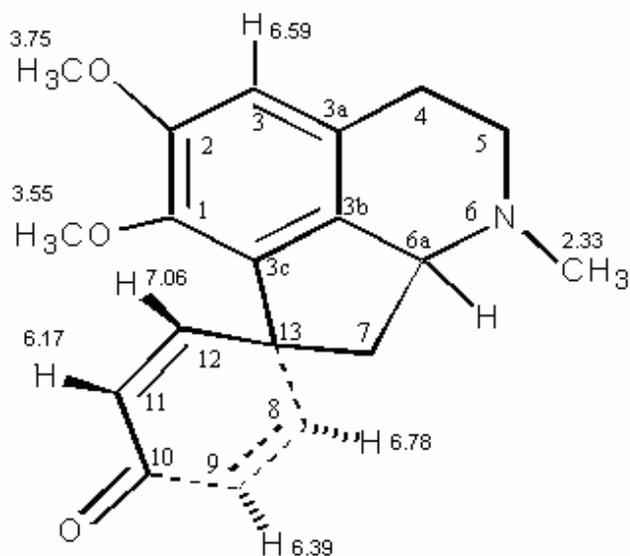


Figura 17. Principales desplazamientos químicos RMN-¹H para CBR46.

Se compararon los cromatogramas obtenidos por HPLC de la fracción BR46, con el de una muestra patrón de Pronuciferina, se observó que los tiempos de retención de ambos son similares (Tabla 7). Estos cromatogramas se encuentran en los anexos 6 y 7 respectivamente.

Fracción	Tiempo de retención (min)
BR46	1,500±0,001
Patrón	1,502±0,003

Tabla 7. Tiempo de retención para BR46 y muestra patrón.
Los valores se expresan como el promedio ± desviación estándar de 5 muestras.

4.1.3. Compuesto CBR99

El compuesto identificado en la fracción BR99 se observó como cristales en forma de aguja de color amarillo y se denominó experimentalmente CBR99

El espectro de RMN-¹H para CBR99 presenta las siguientes señales:

- Dos singuletes atribuidos a dos grupos metoxilos a δ 4,10 y 4,20 ppm
- Un singulete a δ 6,09 ppm correspondiente a un grupo metilendioxi.
- Un singulete a δ 7,65 ppm, asociado al anillo A en C-4.
- Dos doble dobles a δ 7,97 ppm ($J= 8,95$ Hz) y δ 8,12 ppm ($J= 9,17$ Hz), correspondientes a dos protones con acoplamiento orto.
- Dos singuletes a δ 8,69 ppm, asociado al anillo C en C-13 y a δ 9,74 ppm, asociado a C-8 del anillo C.

Según las características espectrocópicas de RMN y los datos obtenidos de la literatura, se puede postular que el compuesto mayoritario presente en la fracción BR99 (Figura 18) responde a un alcaloide de estructura base protoberberínica de nombre Berberina.

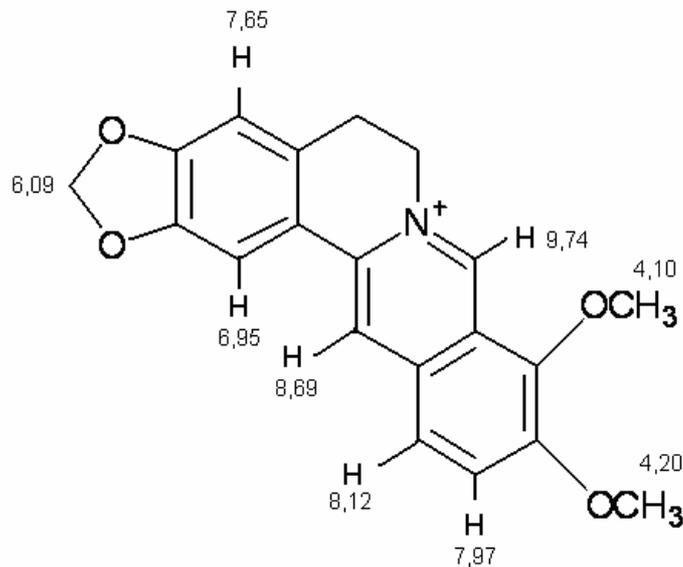


Figura 18. Principales desplazamientos químicos RMN-¹H para CBR99.

Para corroborar la identidad del compuesto presente en la fracción BR99, se compararon los cromatogramas de HPLC obtenidos de la fracción BR99 (Anexo 8) con los obtenidos de una muestra patrón de Berberina (Anexo 9), observándose que los valores en los tiempos de retención son similares para ambas muestras. Los valores de tiempos de retención se muestran en la tabla 8.

Fracción	Tiempo de retención (min)
BR99	1,015±0,011
Patrón	1,000±0,017

Tabla 8. Tiempo de retención para BR99 y muestra patrón.
Los valores se expresan como el promedio ± desviación estándar de 3 muestras.

4.2. Evaluación de la capacidad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y las fracciones donde se identificaron pronuciferina y berberina, a una concentración de 1mg/ml.

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de inhibición del radical DPPH de las muestras evaluadas en función del tiempo. Los valores obtenidos en cada medición se encuentran en los Anexos 10 y 11.

	Porcentaje de inhibición del radical DPPH				
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Extracto alcaloidal <i>B. rotundifolia</i>	58,50 ± 5,17	79,99 ± 0,06	80,14 ± 0,26	80,39 ± 0,16	80,20 ± 0,33
Pronuciferina	54,68 ± 1,25	70,83 ± 0,94	74,69 ± 0,91	76,9 ± 0,83	80,13 ± 0,70
Berberina	30,06 ± 0,45	50,66 ± 0,57	53,21 ± 0,67	54,99 ± 0,62	59,12 ± 0,67

Tabla 9. Actividad antioxidante de *Berberis rotundifolia*.

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar de 5 muestras.

Todas las fracciones evaluadas mostraron una importante actividad antioxidante, alcanzando valores superiores al 50% de inhibición. La mayor actividad la presentó el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*.

El siguiente gráfico muestra una comparación de la actividad antioxidante de las muestras a través del tiempo.

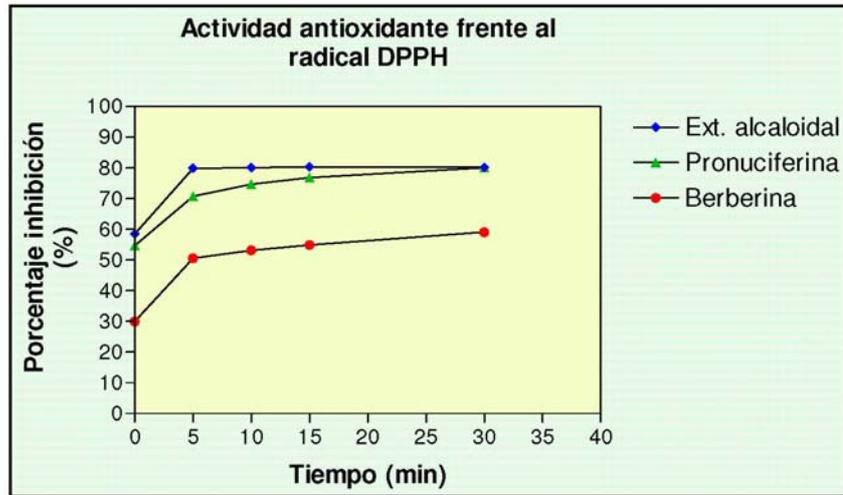


Gráfico 1. Actividad antioxidante frente al radical DPPH de extracto alcaloidal, pronuciferina y berberina en el tiempo.

En todas las muestras se observa que la inhibición del radical DPPH se produjo principalmente en los primeros cinco minutos, para luego mantener un discreto aumento hasta el término del ensayo. En el caso del extracto alcaloidal este aumento fue casi nulo, ya que a partir de los cinco minutos el porcentaje de inhibición mantiene prácticamente el mismo valor hasta los 30 minutos.

Cabe destacar que el extracto alcaloidal y pronuciferina alcanzan niveles de inhibición similares al término del ensayo, con valores cercanos al 80%. Distinto es lo que ocurre con berberina que no supera el 60% de inhibición, mostrando menor actividad antioxidante que el extracto alcaloidal y pronuciferina.

El gráfico 2 compara los porcentajes de inhibición de las muestras ensayadas a cero y treinta minutos.

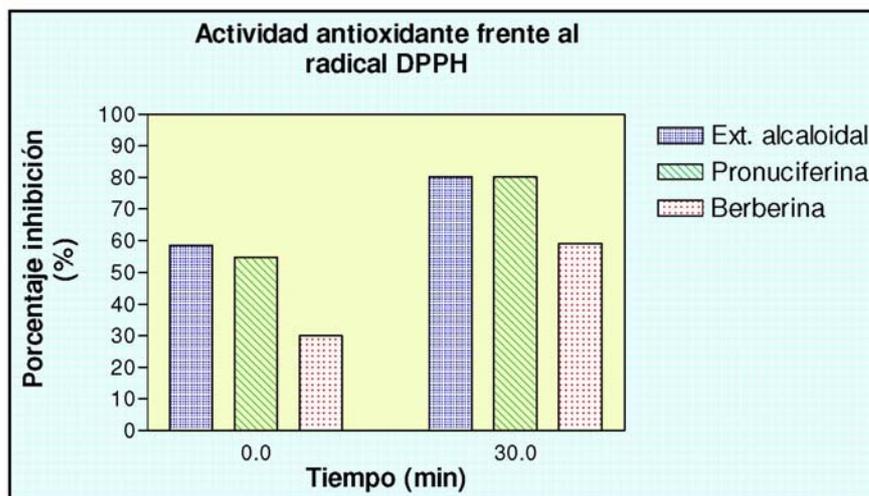


Gráfico 2. Actividad antioxidante frente al radical DPPH del extracto alcaloidal, pronuciferina y berberina en el tiempo inicial y final.

En el gráfico se puede observar que los porcentajes de inhibición en el tiempo cero son menor que al término del ensayo para las tres muestras.

Al comparar el comportamiento del extracto alcaloidal con pronuciferina, se observa que los porcentajes de inhibición de ambos son similares tanto al inicio, como después de transcurridos 30 minutos de iniciado el ensayo. Berberina muestra en ambos tiempos porcentajes de inhibición menores a los exhibidos pronuciferina y el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*.

4.3. Bioensayos

4.3.1. Ensayo de toxicidad general frente a *Artemia salina*.

El ensayo de toxicidad general se aplicó al extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y a las fracciones donde se identificaron lambertina, pronuciferina y berberina. El recuento de los organismos vivos se realizó después de 24 horas de aplicado el ensayo.

La tabla muestra el porcentaje de respuesta de los individuos frente al bioensayo de toxicidad. Se consideró como respuesta positiva la muerte de los individuos.

Extractos/ Fracciones	Concentración (ppm)	Nº de individuos expuestos	Nº de individuos con respuesta positiva	Porcentaje de respuesta (%)
Extracto alcaloidal <i>Berberis rotundifolia</i>	10	30	7	23,33
	100	28	13	46,43
	1000	30	28	93,33
	Control	32	14	43,75
Lambertina	10	30	13	43,33
	100	28	13	46,43
	1000	30	29	96,67
	Control	30	8	26,67
Pronuciferina	10	28	6	21,43
	100	30	15	50,00
	1000	30	29	96,67
	Control	30	8	26,67
Berberina	10	30	12	40,00
	100	28	15	53,57
	1000	30	29	96,67
	Control	30	8	26,67

Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de los individuos de *Artemia salina* en el ensayo de toxicidad.

La tabla 11 muestra los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el análisis estadístico Probit. Los valores están presentados en ppm y con intervalo de confianza de 95%.

Extracto/ Fracciones	Concentración letal media LC₅₀ (ppm)
Extracto alcaloidal <i>Berberis rotundifolia</i>	258,64
Lambertina	268,11
Pronuciferina	157,03
Berberina	98,54

Tabla 11. LC₅₀ obtenidos en el análisis Probit para el ensayo de toxicidad frente a *Artemia salina*.

4.3.2. Ensayo de citotoxicidad por inhibición de división celular en huevos de *Loxechinus albus*.

El ensayo de citotoxicidad se aplicó al extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y a las fracciones donde se identificaron pronuciferina y berberina.

A las 2 horas después de haber realizado la fecundación, se contabilizaron las células que no tuvieron división celular (células no segmentadas).

Las muestras se ensayaron por triplicado y los resultados se expresaron como concentración inhibitoria media (IC_{50}), considerando como respuesta positiva la inhibición de la división celular.

Los resultados del análisis estadístico Probit se muestran en la Tabla 12.

Extracto/ Fracciones	Concentración efectiva media IC_{50} (ppm)
Extracto alcaloidal <i>Berberis rotundifolia</i>	295,50
Pronuciferina	123,12
Berberina	97,61

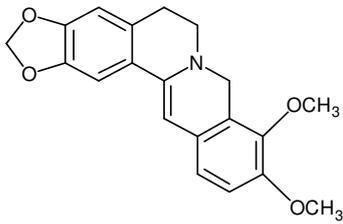
Tabla 12. IC_{50} obtenido en el análisis Probit para el ensayo de inhibición de la división celular frente a *Loxechinus albus*, con un intervalo de confianza de 95%.

5. Discusión

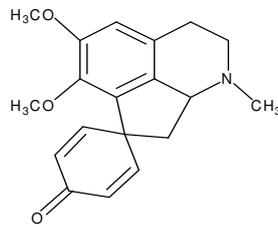
Las especies del género *Berberis* han sido de gran interés para la Química de Productos Naturales, por las importantes propiedades farmacológicas que han presentado compuestos aislados de estas especies. Ejemplo de lo anterior son los innumerables estudios que se han realizado para esclarecer las propiedades farmacológicas presentadas por Berberina, alcaloide principal de muchas especies de *Berberis*. Estudios realizados a diversas *Berberis* chilenas, arrojan que este género presenta una composición química principalmente alcaloidal.

Este trabajo de investigación estuvo orientado a conocer la composición química alcaloidal y la actividad biológica de *Berberis rotundifolia*, especie que hasta la actualidad carecía de estudios que permitieran tener información sobre dichas características, por lo que los datos obtenidos en esta investigación son inéditos y aportan al conocimiento de las *Berberis* chilenas.

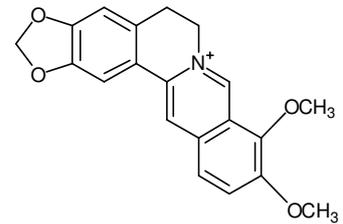
Mediante el estudio químico fue posible aislar tres compuestos de naturaleza alcaloidal. Estos alcaloides denominados experimentalmente CBR5, CBR46 y CBR99, han sido aislados por primera vez a partir de *Berberis rotundifolia* y se correspondieron estructuralmente con Lambertina, Pronuciferina y Berberina, los cuales provienen biogenéticamente de una base bencilisoquinolínica común. En el género *Berberis* ha sido frecuente encontrar alcaloides de base bencilisoquinolínica, por lo que su presencia en *Berberis rotundifolia* cabe dentro de la composición alcaloidal típica de las especies de *Berberis*.



Lambertina



Pronuciferina



Berberina

La utilización de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como metodología de análisis cualitativo, permitió reafirmar la presencia de los alcaloides señalados anteriormente en el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*. Si bien la identidad de los compuestos se estableció utilizando metodologías clásicas y validadas para tal fin, el empleo de técnicas más avanzadas de espectroscopia, como Resonancia Magnética Nuclear bidimensional y Espectroscopia de Masa, permitiría contar con datos más categóricos sobre la naturaleza estructural de dichos compuestos.

Durante la realización del estudio químico, se detectó la presencia de otros compuestos de naturaleza alcaloidal, que por cuestión de tiempo no fue factible identificar. Estos datos permitirían diseñar un nuevo estudio químico con la finalidad de ampliar los conocimientos sobre el contenido alcaloidal de *Berberis rotundifolia*.

La evaluación de la capacidad antioxidante de drogas vegetales, se ha hecho cada vez más valiosa e imprescindible en el estudio químico-biológico de plantas medicinales, esto porque la utilización de antioxidantes naturales en alimentos o como suplementos dietarios ha ido adquiriendo gran valor en la industria farmacéutica y alimentaria. Con el

fin de evaluar actividad antioxidante en extractos y compuestos, se han diseñado una serie de metodologías, siendo una de las más utilizadas la inhibición del radical DPPH.

En este trabajo se sometió a evaluación el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y las fracciones identificadas como pronuciferina y berberina. Todas las muestras analizadas demostraron tener un importante efecto inhibidor del radical DPPH, alcanzando valores sobre el 50% de inhibición. La determinación del efecto antioxidante a través del tiempo permitió observar que la inhibición del radical DPPH se produce mayoritariamente en los primeros cinco minutos, para luego aumentar discretamente hasta el término del ensayo. Es importante resaltar que el extracto alcaloidal y pronuciferina alcanzaron niveles de inhibición similares con valores cercanos a 80%, lo que nos lleva a pensar que el efecto antioxidante mostrado por el extracto alcaloidal podría deberse principalmente a la presencia del alcaloide pronuciferina y que éste estaría potenciado por la presencia de berberina y otros alcaloides presentes en el extracto. Estos resultados convierten a esta planta en una fuente natural de compuestos antioxidantes y en una alternativa válida para la búsqueda de antioxidantes de origen natural.

La evaluación de la actividad biológica de especies vegetales a través de la utilización de bioensayos, permite conocer en forma preliminar, eventuales acciones farmacológicas que compuestos contenidos en ellas podrían presentar. En este estudio la aplicación de bioensayos de toxicidad y citotoxicidad proporcionó información básica, tanto cualitativa como cuantitativa de dichas propiedades biológicas.

Los resultados obtenidos en el bioensayo de toxicidad muestran que bajo las condiciones en que se desarrolló el ensayo, el extracto alcaloidal y berberina presentaron toxicidad frente a *Artemia salina*. Los valores se muestran en la tabla 9, donde el extracto alcaloidal presentó un valor de LC_{50} de 258,64 ppm, mientras que berberina mostró una LC_{50} de 98,54 ppm. En base a estos resultados y considerado límites de toxicidad de 1000 ppm para extractos y 100 ppm para fracciones o compuestos puros (Mbwambo, 2007), se puede afirmar que tanto el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* como berberina presentaron actividad biológica.

En el bioensayo de citotoxicidad los resultados fueron similares a los exhibidos en el ensayo de toxicidad general, mostrando nuevamente actividad el extracto alcaloidal y berberina, con valores de IC_{50} de 295,50 ppm y 97,61 ppm respectivamente. Considerando límites de citotoxicidad de 1000 ppm para extracto y 100 ppm para compuestos y fracciones (Betancur-Galvis et al, 2002, Carballo et al, 2002), es posible señalar que bajo las condiciones de experimentación detalladas en materiales y métodos, el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* y berberina presentan propiedades citotóxicas, siendo capaz de inhibir la división celular en huevos fecundados de *Loxechinus albus*.

Es importante señalar que en ambos bioensayos las mejores respuestas fueron presentadas por el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*, por lo que pensamos que las propiedades exhibidas se deberían a un sinergismo producido por los componentes de dicho extracto. Esto porque en algunos casos, la coexistencia de moléculas con estructuras similares pueden aportar efectos aditivos a una determinada actividad.

Considerando el principio que farmacología es simplemente toxicología a concentraciones bajas (Osorio, 2005), los resultados obtenidos en los bioensayos, nos llevan a pensar que las propiedades exhibidas tanto por el extracto alcaloidal como por berberina, podrían ser la base de eventuales propiedades farmacológicas. Esto nos permite proyectar este trabajo a la realización de nuevos estudios con el objetivo de esclarecer probables actividades antifúngicas, antimicrobianas y antitumorales, de manera de aportar en la búsqueda de nuevas sustancias más efectivas y carentes de resistencia microbiana.

Finalmente, es posible decir que el mundo vegetal constituye una fuente importante de moléculas potencialmente terapéuticas, siendo por muchos años el origen de una gran cantidad de fármacos de utilización actual, realzando la importancia de conocer las plantas medicinales en cuanto a sus principios activos y actividades biológicas. En este ámbito, las bases curriculares del profesional Químico Farmacéutico, permiten un buen desempeño en el área, aportando así al aumento del arsenal farmacológico disponible para el tratamiento de las dolencias que afectan al mundo actual.

6. Conclusiones

Del estudio químico y biológico de *Berberis rotundifolia* realizado se puede concluir que:

- El extracto metanólico de *Berberis rotundifolia* posee un importante contenido de compuestos de carácter alcaloidal.
- El estudio químico del extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*, permitió aislar por primera vez de esta planta, los alcaloides lambertina, berberina y pronuciferina.
- Los alcaloides aislados de *Berberis rotundifolia* presentan un origen biosintético común, proviniendo del aminoácido tirosina. Berberina y lambertina corresponden a alcaloides protoberberínicos, mientras que pronuciferina presenta una estructura proaporfínica.
- El extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia* presentó actividad biológica en cada bioensayo realizado, exhibiendo importantes respuestas toxicológicas, citotóxicas y de actividad antioxidante.
- Tanto el extracto alcaloidal, como las fracciones en las cuales se identificaron los alcaloides pronuciferina y berberina poseen actividad antioxidante frente al radical DPPH. En este ensayo la mejor respuesta la presentó el extracto alcaloidal de *Berberis rotundifolia*.

- Frente a los bioensayos de toxicidad general y citotoxicidad, las fracciones analizadas presentaron actividades variables, berberina mostró una gran actividad toxicológica y citotóxica, mientras que lambertina no mostró actividad en el bioensayo de toxicidad y pronuciferina no mostró actividad en ninguno de los bioensayos realizados.
- El estudio químico y biológico realizado permitió establecer bases para la realización de estudios posteriores que permitan ampliar el conocimiento sobre la química de *Berberis rotundifolia* y posibles propiedades farmacológicas que podrían presentar compuestos aislados de dicha especie.

7. Bibliografía

1. Amin, AH., Subbaiah, TV. and Abbasi, KM. (1969) Berberine sulfate: Antibicrobial activity, bioassay and mode of action. *Can. J. Microbiol*, 15, 1067-1076.
2. Arango, G. (2002) Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. (Citado 24 de enero 2008). <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides2001.pdf>
3. Araya, M. (2006) Estudio químico de *Berberis coletiodes*. Tesis Facultad de Ingeniería. Universidad de Magallanes.
4. Arayne, M., Sultana, N. and Bahadur, S. (2007) Review. The Berberis store: *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 20(1), 83-92.
5. Betancur-Galvis, LA., Morales, GE., Forero, JE., Roldan, J. (2002) Cytotoxic and antiviral activities of colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(4), 541-546.
6. Bown, D. (1996) Enciclopedia de las hierbas y sus usos. Grijaldo Mondadori SA, Barcelona.
7. Carballo, JL., Hernández-Inda, ZL., Pérez, P. and García-Grávalos, MD. (2002) A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2 (17).

8. De Troiani, R. (1992) Metabolitos secundarios. Alcaloides. Facultad de Agronomía, Universidad de la Pampa. (Citado 2 de febrero 2008) <http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/ALCALOIDES.pdf>
9. Domínguez, D. (2005) Compuestos Bioactivos de Endemismos Canarios y Chilenos. Memoria para Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de la Laguna, España.
10. Enriz, RD., Freile, ML. (2006) Structure-Activity relationship of berberine and derivatives acting as antifungal compounds. *J. Argent. Chem. Soc.* 94(1-3), 113-119.
11. Fajardo, V. (1992) Alcaloides en las especies del genero *Berberis*. En: Muñoz, O. (ed) Química de la flora de Chile: 226-229. Santiago.
12. Fajardo, V., Salmerón, M., Cuadra, P., Herrera, R., Moreno, B.; y Villarroel, L. (2005) Estudio Químico de Plantas Australes. En Flora de Chile. Biología, Farmacología y Química. Editorial Universidad de Playa Ancha: 103-104.
13. Fatehi, M., Saleh, T., Fatehi-Hassanabad, Z., Farrokhfal, K., Jafarzadeh, M. and Davodi, S. (2005) A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. *J. of Ethnopharmacology* 102, 46-52 .
14. Fukuda, K., Hibiya, Y., Mutoh, M., Koshiji, M., Akao, S. and Fujiwarw, H. (1999) Inhibition of activator protein 1 activity by berberine in human hepatoma cells. *Planta Med*, 65, 381-183.
15. Hahn, FE. and Ciak, J. (1976) Berberine. *Antibiotics*, 3, 577-584.

16. Hoffmann, A., Farga, C., Lastra, J. y Veghazi, E. (1992) Plantas Medicinales de uso común en Chile. Segunda edición. Santiago de Chile.
17. Hoshi, A., Ikekana, T., Ikeda, Y., Shirakawa, S. and Iigo, M. (1976) Antitumor activity of berberrubina derivatives. *Gann*, 67(2), 321-325.
18. Huang, WM., Wu, ZD. and Gan, YQ. (1989) Effects of berberine on ischemic ventricular arrhythmia. *Zhonghua Xin Xue guan Bing Za*, 5, 300-301.
19. Jeon, YW., Jung, JW., Kang, M., Chung, IK. and Lee, W. (2002) NMR studies on antitumor drug candidates, berberine and berberrubine. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23(3), 391-394.
20. Kukic, J., Petrovic, S., Niketic, M. (2006) Antioxidant activity of four endemic *Stachys taxa*. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(4), 725-729.
21. Kupeli, E., Kosar, M., Yesilada, E., Husnu, K. and Baser, C. (2002) Comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sci*, 72, 645-657.
22. Landrum, L. (1999) Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and Adjacent Southern Argentina. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86(4), 793-834.
23. Lesnau, A., Hils, J., Phol, G., Beyer, G., Janka, M. and Hoa LT. (1990) Antiviral activity of berberine salts. *Pharmazie*, 45, 638-639.

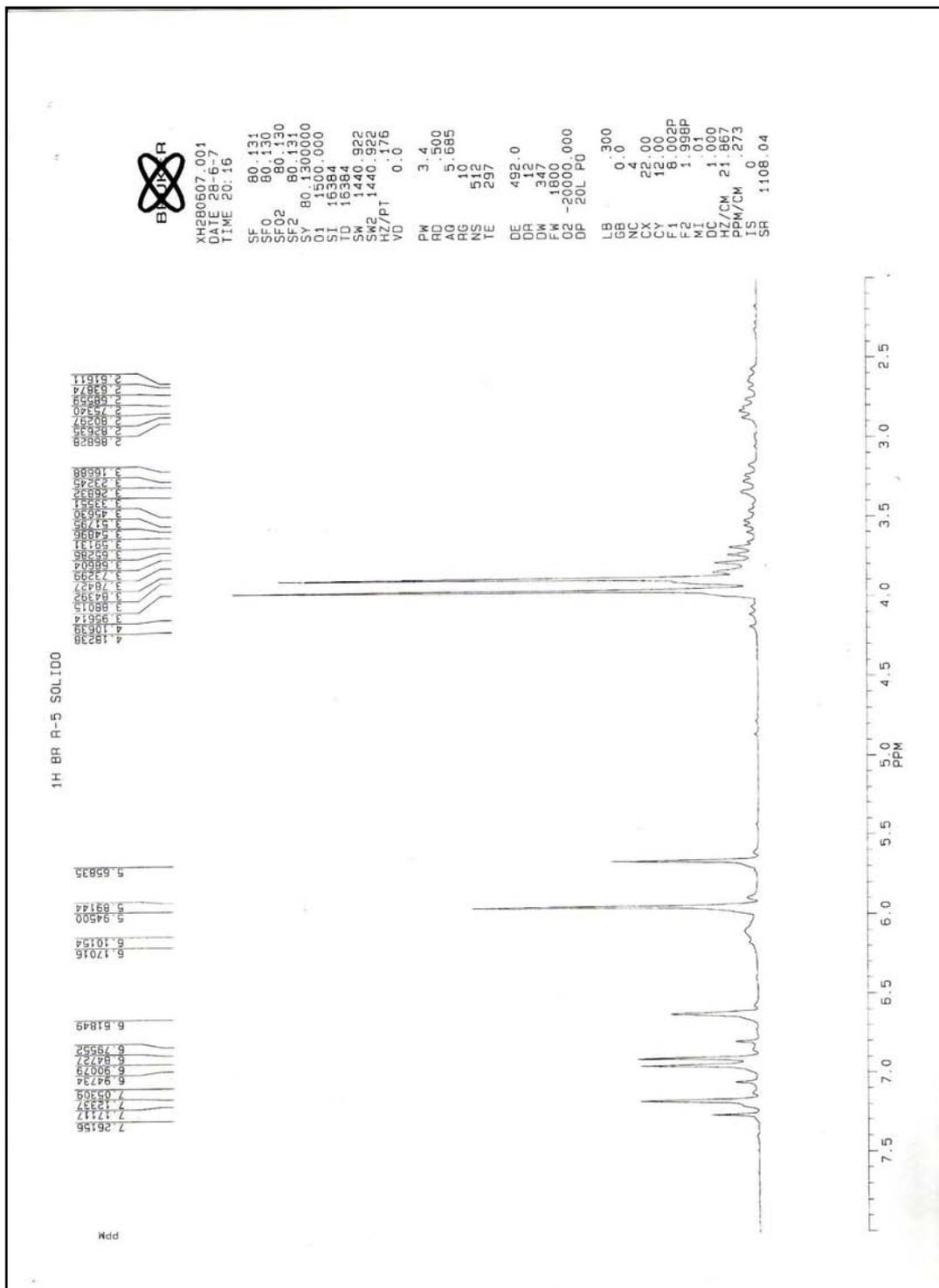
24. Mbwambo, ZH., Moshi, MJ., Masimba, PJ., Kapingu, MC. and Nondo, RS. (2007) Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7 (9).
25. Morales, C. (1999) Alcaloides. Universidad Técnica Federico Santa María. (Citado 24 de enero de 2008) <http://johan.jmc.utfsm.cl/pi/Alcaloidesdoc1.PDF>
26. Muñoz, F. (1987) Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado. Mundi-Prensa, Madrid.
27. Navas, L. (1976) Flora de la cuenca de Santiago de Chile. Vol. II. Universidad de Chile, Santiago de Chile.
28. Osorio, J. (2005) Análisis del procedimiento para la determinación de la DL₅₀ (dosis letal media) a través del método de Probit en un bioensayo. *Revista de investigaciones Universidad de Quindío*, 4 (12).
29. Oyarzún, A. (2006) Estudio químico y actividad biológica de *Junellia trindes*. Trabajo de titulación Facultad de Ciencias. Universidad de Magallanes.
30. Podesta, F. (1982) Determinación de bases cuaternarias en *Berberis ilicifolia* Forst. Trabajo de titulación, Facultad de Ingeniería. Universidad de Magallanes.
31. Potocnjak, D. (2003) Arquitectura y modelos de regeneración en plantas medicinales comercializadas en Chile. Tesis Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile.

32. Robinson, T. (1981) *The Biochemistry of alkaloids*. Springer - Verlag. New York.
33. San Feliciano, A., Del Olmo, E. (2005) Finalidad terapéutica de los productos naturales. En: Universidad de Playa Ancha (ed) *Flora de Chile. Biología, Farmacología y Química*: 103-104. Santiago de Chile.
34. San Martín, A. (2005) Metabolitos secundarios de algas de Chile. En: Universidad de Playa Ancha (ed) *Flora de Chile. Biología, Farmacología y Química*: 25-40. Santiago de Chile.
35. Silva, G. y Casals, P. (2002) Bioensayo. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. (Citado 10 de diciembre 2007). <http://www.multired.com/ciencia/gosilagu/analisi%20estadistico.htm>
36. Skoog, D., Holler, F. and Nieman, T. (2000) *Principios de análisis instrumental*. 5ª Ed. Mc Graw Hill. Madrid.
37. Somparn, P., Phisalaphong, Ch., Nakornchai, S., Unchern, S., Phumala, N. (2007) Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol. Pharm. bull.* 30(1) 74-78.
38. Takase, H., Yamamoto, K., Ito, K. and Yumioka, E. (1993) Pharmacological studies on antidiarrheal effects of berberine and geranin herb. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2, 101-112.

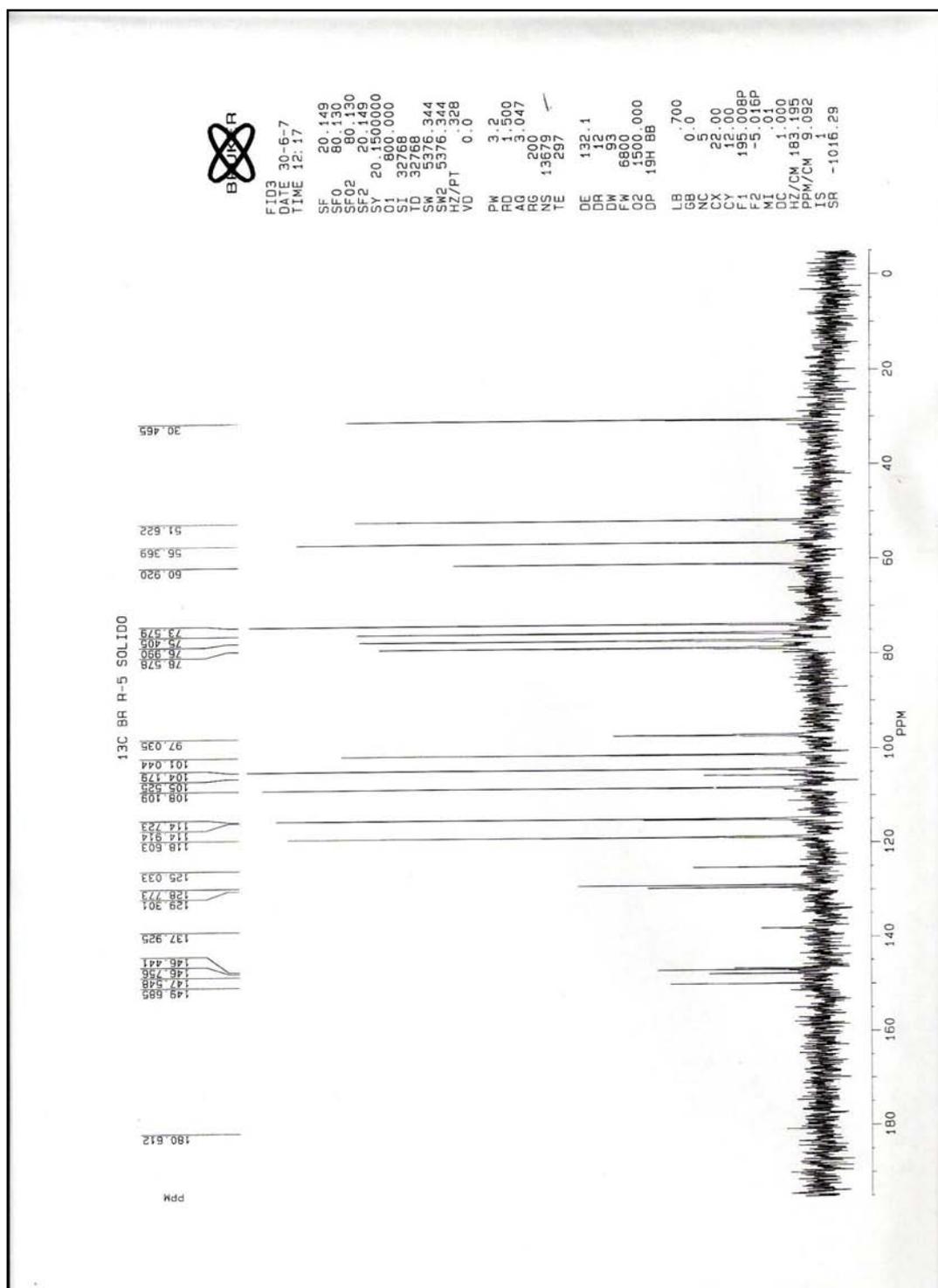
39. Tiap-Ling, A. (2004) Estudio químico bioguiado de los extractos con actividad analgésica y antiinflamatoria de *Adesmia atacamensis* Phil. Tesis Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
40. Trusheva, B., Popota, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M., Laguna, P., Da Rocha, F. and Tsvetkova, I. (2006) Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *eCAM*, 3(2), 249–254.
41. Valencia, E. (1990) Alcaloides de *Berberis microphylla*, *Aconitum napellus* y *Dalphinium montanum*. Tesis para el grado de Doctor en Química. Universidad de La Laguna.
42. Yesilada, E. and Kupeli, E. (2002) *Berberis crataegina* DC roots exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.*, 79, 237-248.

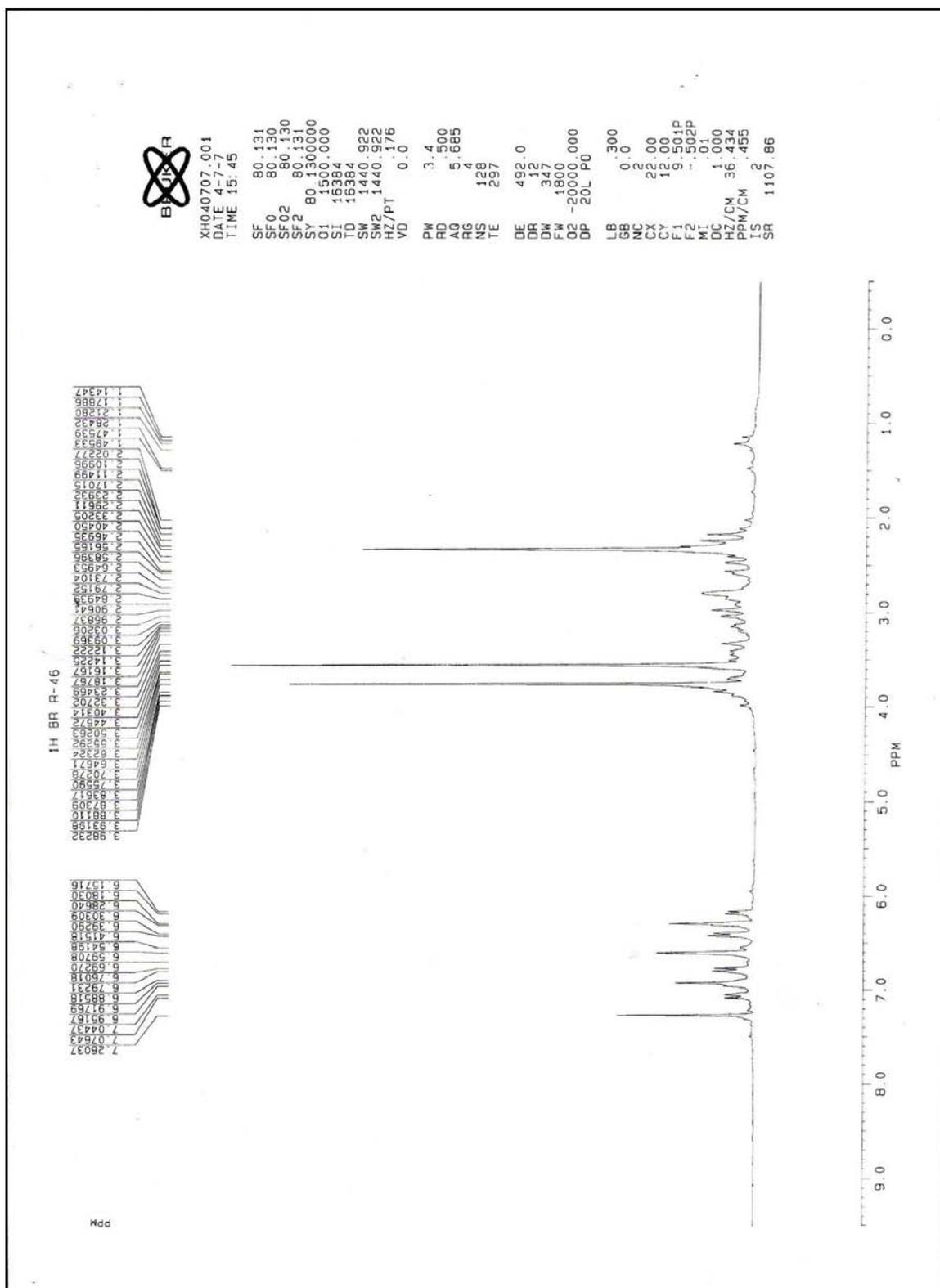
8. Anexos

Anexo 1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹H de la fracción BR5.

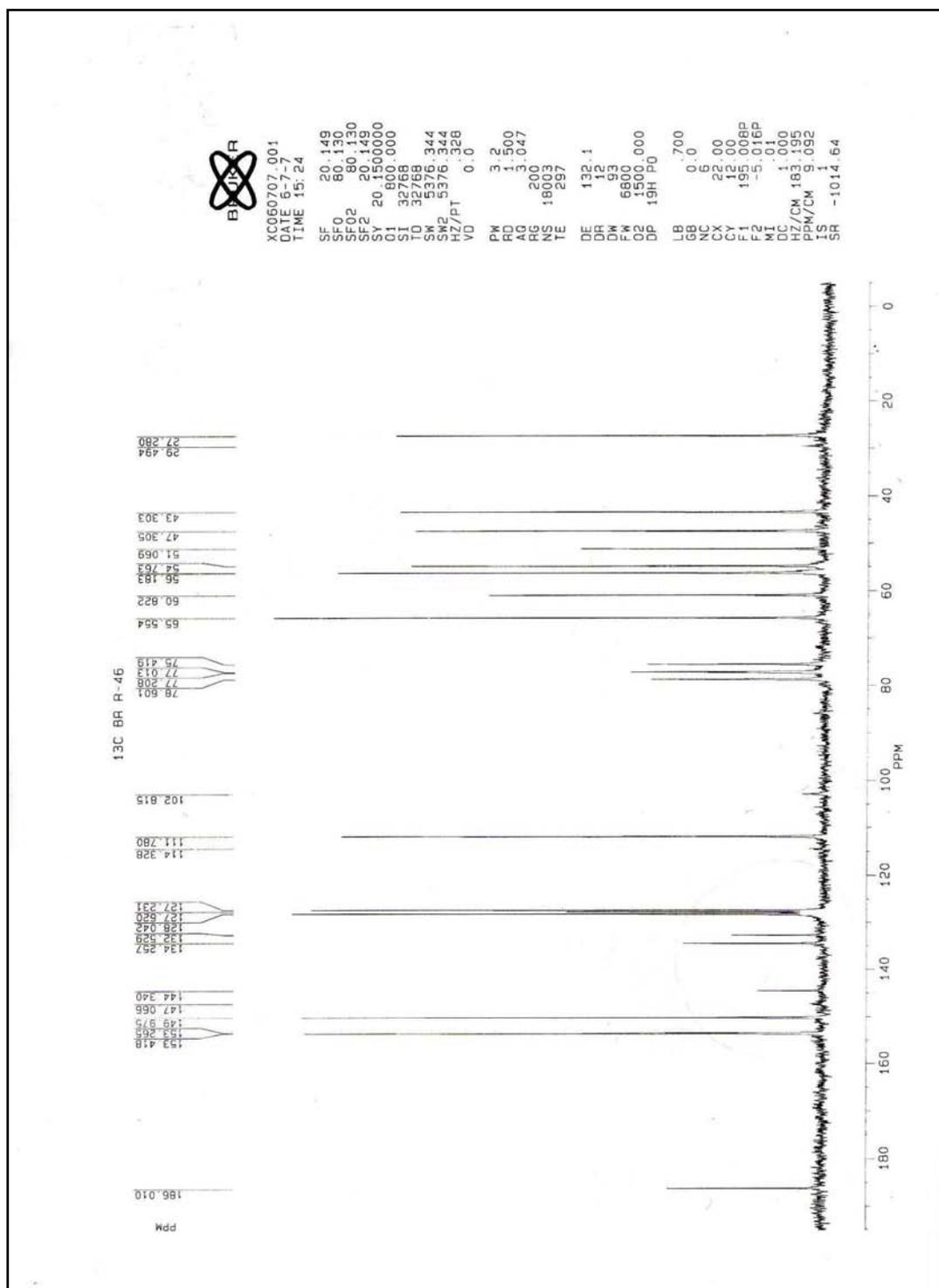


Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹³C de la fracción BR5.

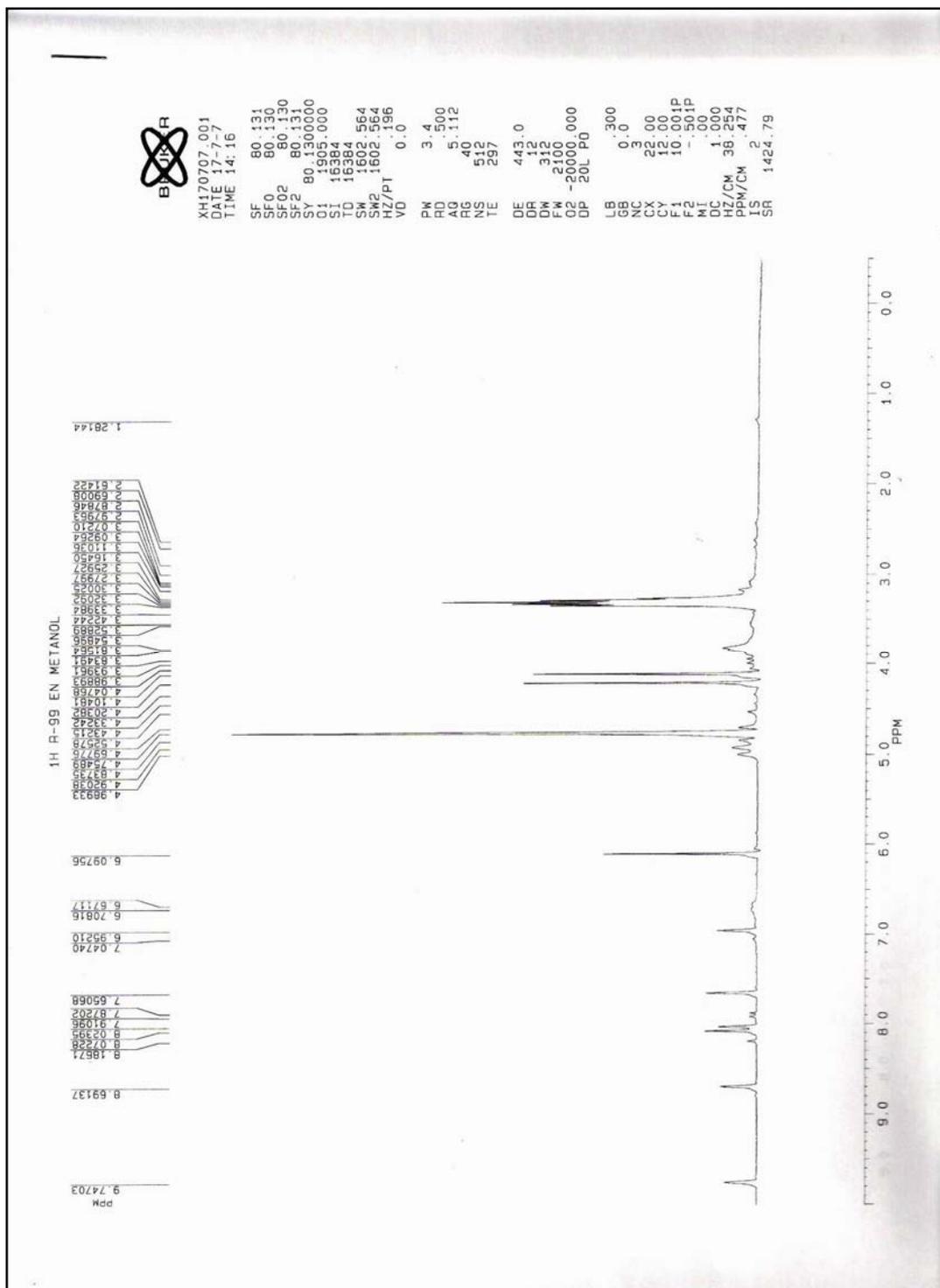


Anexo 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹H correspondiente a la fracción BR46.

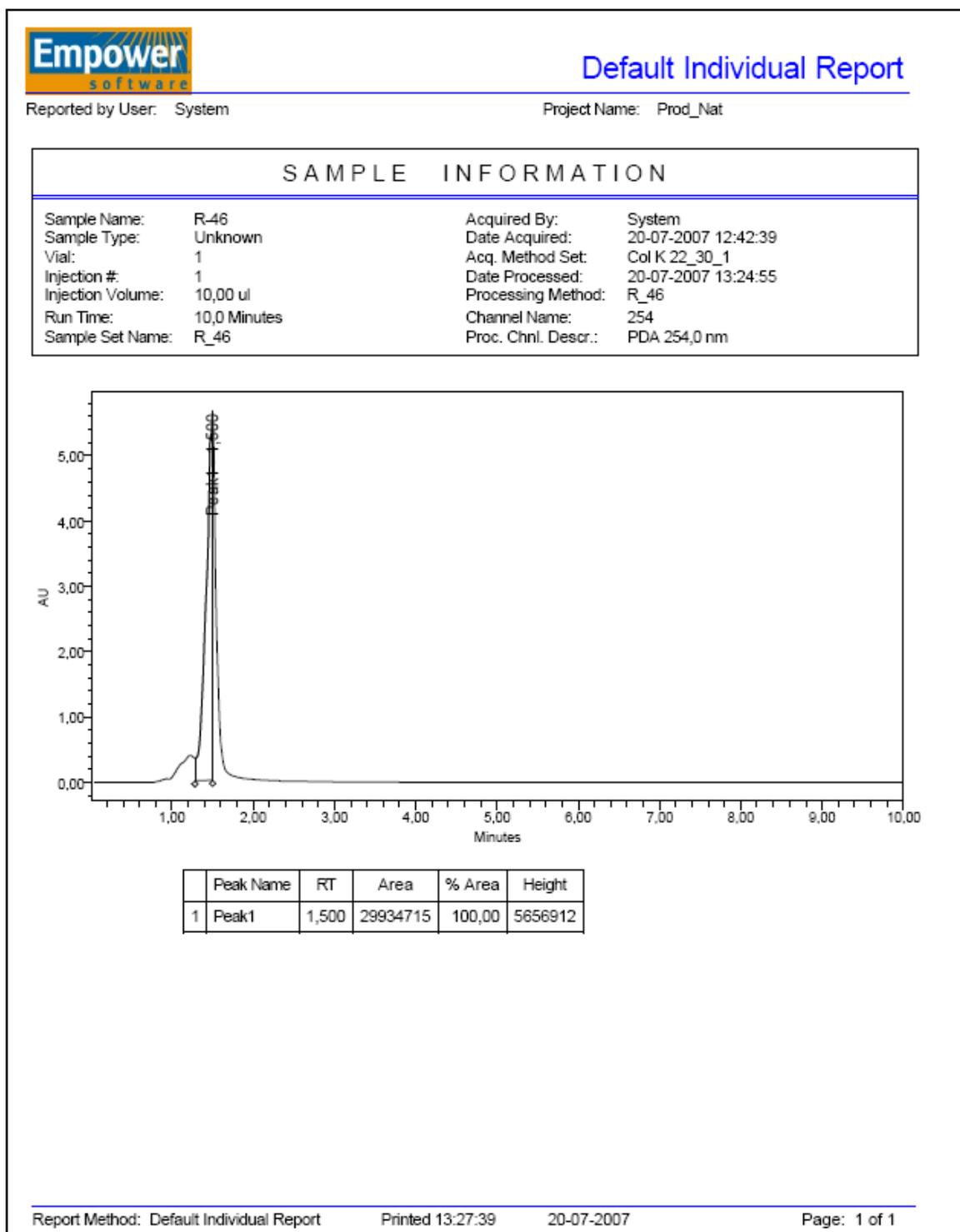
Anexo 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹³C correspondiente a la fracción BR46.



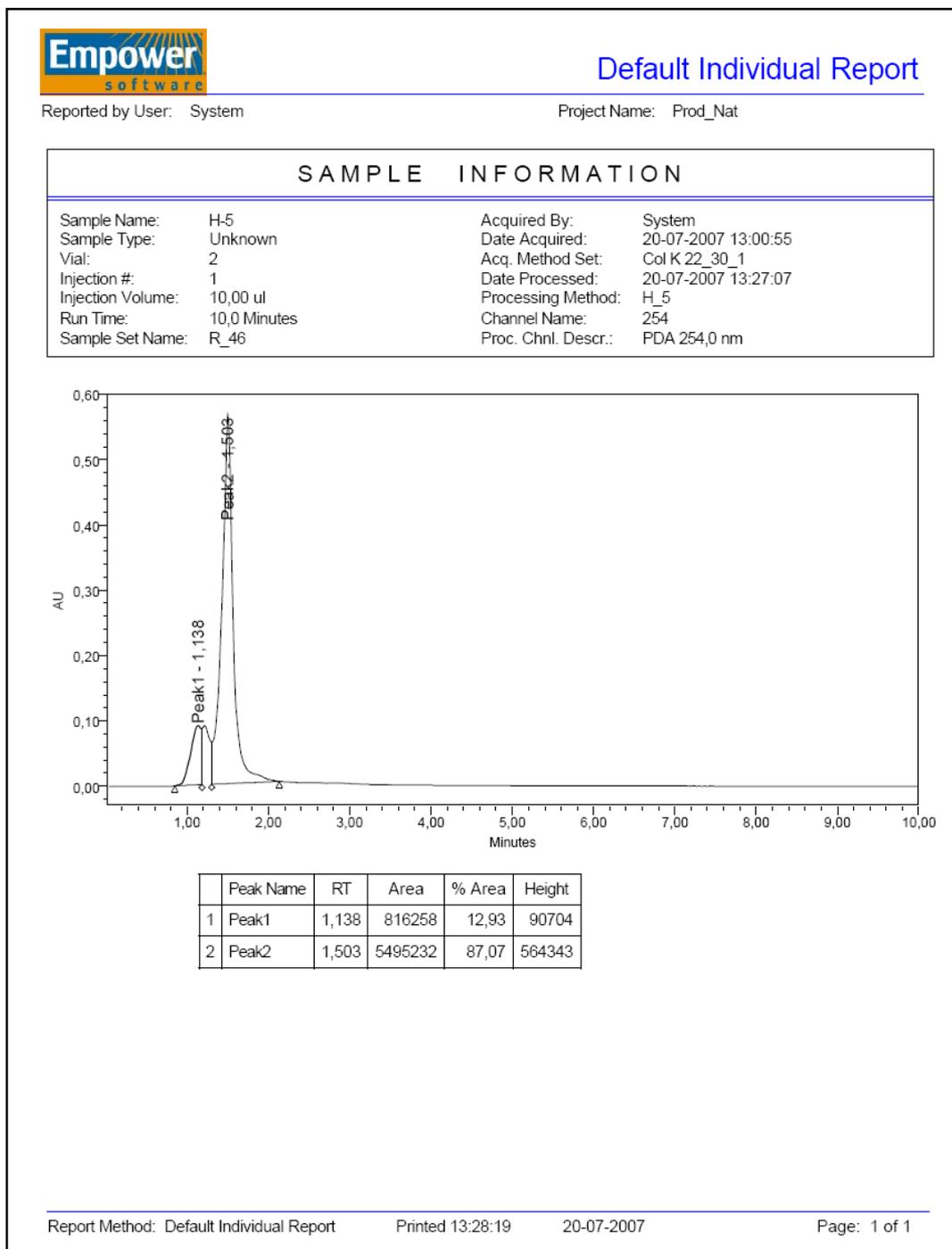
Anexo 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹H de la fracción BR99.



Anexo 6. Cromatograma HPLC de la fracción BR46.



Anexo 7. Cromatograma HPLC de Pronuciferina (patrón).



Anexo 8. Cromatograma HPLC de la fracción BR99.



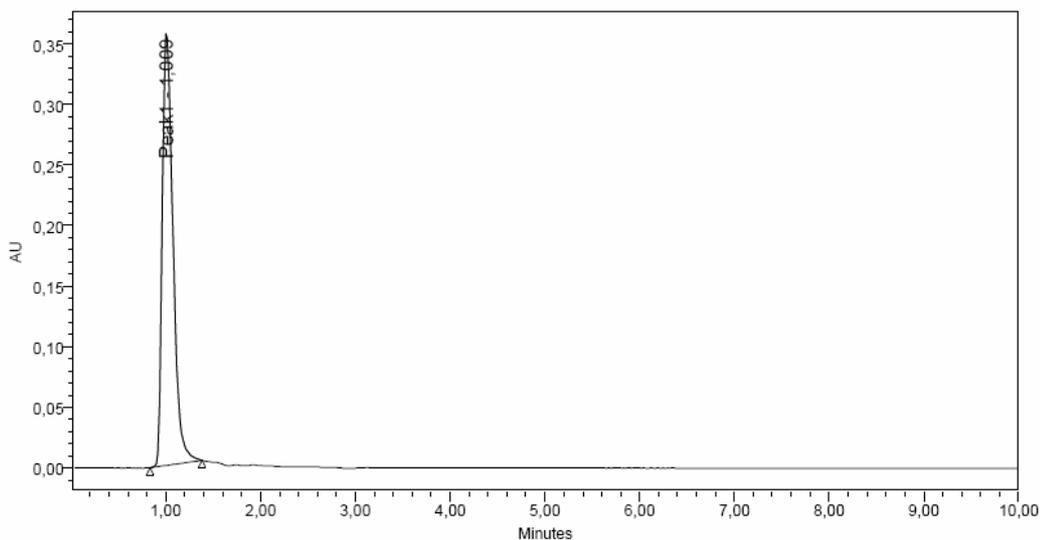
Default Individual Report

Reported by User: System

Project Name: Prod_Nat

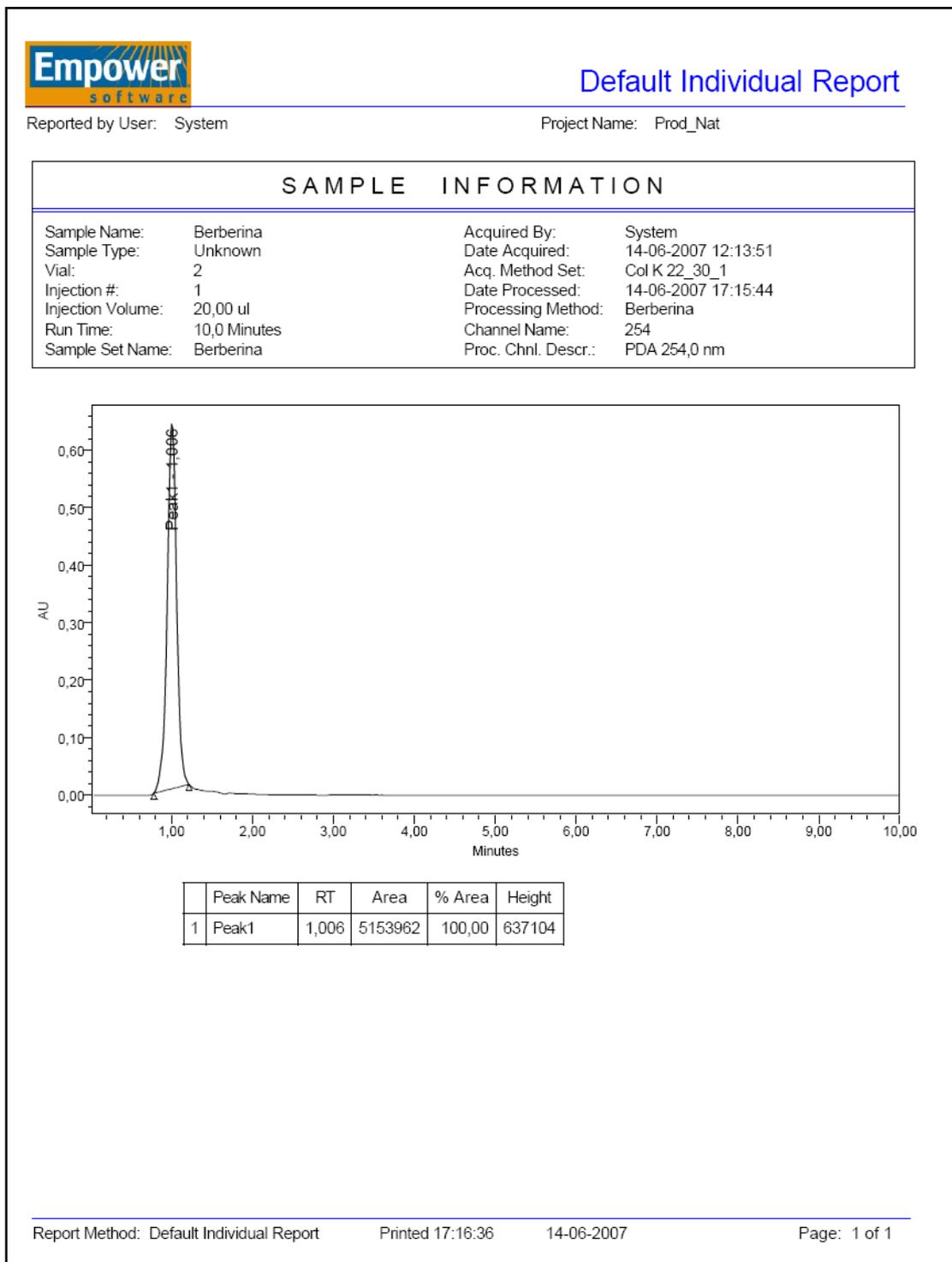
SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	R -99	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	30-07-2007 13:42:41
Vial:	18	Acq. Method Set:	Col K 22_30_1
Injection #:	1	Date Processed:	30-07-2007 14:29:23
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method:	R_112
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	254
Sample Set Name:	D_8	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 254,0 nm



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Peak1	1,009	2816052	100,00	359770

Anexo 9. Cromatograma HPLC de Berberina (patrón).



Anexo 10. Evaluación de la Actividad Antioxidante.

		Absorbancia				
		0 min.	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
Extracto alcaloidal de <i>Berberis rotundifolia</i>	M 1	0,316	0,195	0,190	0,190	0,196
	M 2	0,417	0,197	0,193	0,193	0,196
	M 3	0,413	0,195	0,194	0,192	0,192
	M 4	0,432	0,194	0,192	0,189	0,189
	M 5	0,441	0,194	0,197	0,190	0,190
Pronuciferina	M 1	1,002	0,661	0,579	0,529	0,458
	M 2	0,987	0,647	0,559	0,510	0,433
	M 3	0,969	0,608	0,531	0,484	0,420
	M 4	0,970	0,629	0,537	0,491	0,423
	M 5	1,035	0,649	0,565	0,515	0,442
Berberina	M 1	0,447	0,364	0,346	0,333	0,299
	M 2	0,483	0,354	0,334	0,322	0,293
	M 3	0,486	0,359	0,341	0,328	0,295
	M 4	0,481	0,362	0,343	0,329	0,302
	M 5	0,483	0,364	0,346	0,333	0,305

M = número de replica.

Anexo 11. Evaluación de la Actividad Antioxidante.

		Porcentaje de inhibición				
		0 min.	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
Extracto alcaloidal de <i>Berberis rotundifolia</i>	M 1	67,52	79,95	80,47	80,47	79,85
	M 2	57,14	79,95	80,16	80,16	79,85
	M 3	57,55	79,95	80,26	80,26	80,26
	M 4	55,60	80,06	80,57	80,57	80,57
	M 5	54,67	80,06	80,47	80,47	80,47
Pronuciferina	M 1	54,25	69,82	73,56	75,84	79,09
	M 2	54,93	70,46	74,47	76,71	80,23
	M 3	55,75	72,24	75,75	77,90	80,82
	M 4	55,71	71,28	75,48	77,58	80,68
	M 5	52,74	70,37	74,2	76,48	79,82
Berberina	M 1	34,74	50,20	52,66	54,44	59,09
	M 2	33,92	51,57	54,30	55,95	59,91
	M 3	33,51	50,88	53,35	55,12	59,64
	M 4	34,19	50,47	53,07	54,99	58,68
	M 5	33,92	50,20	52,66	54,44	58,27

M = número de replica.