

metabolitos secundarios de berberis buxifolia *

V. Fajardo**, A. Urzúa, R. Torres y B.K. Cassels***

RESUMEN: Berberis buxifolia Lam. (nombre vulgar "calafate") es conocida como una fuente de berberina. Al reestudiar la corteza de tallos y las raíces de esta planta fue posible confirmar la presencia de berberina y aislar además los alcaloides pavínicos (-)-argemonina y (-)-norargemonina, una bisbenzilisquinolina incompletamente caracterizada, y el lignano siringarresinol. Es esta la primera vez que se informa sobre el aislamiento de alcaloides pavínicos y de un lignano de una especie de Berberis.

SUMMARY: Berberis buxifolia Lam. (common name "calafate") is known as a source of berberine. Upon restudying the stem bark and roots of this plant, the presence of berberine was confirmed, and the pavine alkaloids (-)-argemonine and (-)-norargemonine, an incompletely characterized bisbenzylisoquinoline, and the lignan syringaresinol were isolated. This is the first report on the isolation of pavine alkaloids and a lignan from a Berberis species.

* Manuscrito revisado y aprobado en forma definitiva en Diciembre de 1978.

** Departamento de Química, Sede Punta Arenas, Universidad Técnica del Estado, Chile.

*** Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad Técnica del Estado, Santiago de Chile.

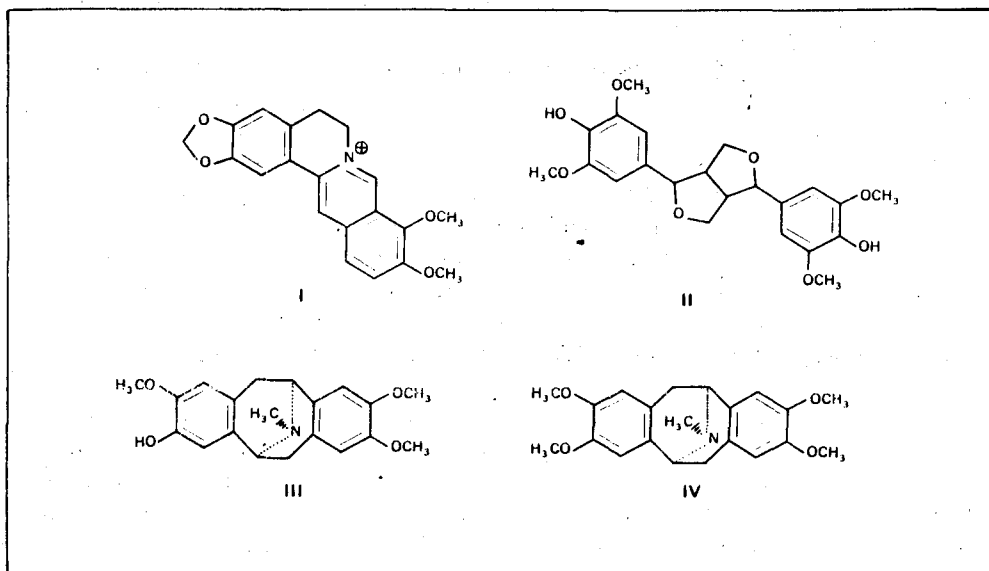
El género *Berberis* consta de unas quinientas especies,¹ de las cuales aproximadamente cuarenta han sido estudiadas en cuanto a su contenido de alcaloides,^{2,3} y muy excepcionalmente otros metabolitos.⁴ Estos trabajos, a veces muy superficiales, han conducido habitualmente al aislamiento de berberina (I). En aquellos casos en los cuales se ha profundizado el estudio de una especie, se ha descrito el aislamiento de otros alcaloides pertenecientes a diversos grupos derivados biogénicamente de las benciltetrahidroisoquinolinas.

Una especie común en el sur de Chile y Argentina, muy conocida por sus frutos comestibles, es *Berberis buxifolia* Lam. (nombres vulgares: "calafate", "michay", "palo amarillo"), cuyas raíces y tallos se han utilizado para teñir lana, y cuyas hojas y frutos se emplean en la medicina popular como febrífugos y tónicos.⁵ Estudios antiguos indicaron la presencia de berberina en las raíces⁶ y en las cortezas de raíz y tallo,⁵ así como de alcaloides no identificados en las hojas.⁷

En el presente trabajo se informa sobre algunos resultados obtenidos al reexaminar la corteza de tallo y las raíces de *Berberis buxifolia* recolectada en Punta Arenas, sobre el Estrecho de Magallanes. Fue posible confirmar por aislamiento y estudios espectrométricos la presencia de berberina, cuya identificación en los trabajos anteriores^{5,6,7} merecía algunas dudas. De la corteza de tallo se aisló, además, el lignano siringarresinol (II), el alcaloide pavínico (-)-norargemonina (III), y un alcaloide bisbencilisoquinolínico nuevo sólo parcialmente caracterizado, designado con la sigla C-O4. De las raíces se pudo aislar (-)-norargemonina, (-)-argemonina (IV), y C-O4.

Los extractos metanólicos de los diferentes órganos fueron separados en fracciones de acuerdo con su distribución entre cloroformo y HCl 50/o acuoso, NH₄OH, o NaOH 20/o acuoso, destacándose el hecho que este fraccionamiento no permitió una separación neta de sustancias básicas y no básicas, fenólicas y no fenólicas. Parece claro que todos los alcaloides encontrados se extraen eficazmente como pares iónicos con Cl⁻, mientras que la solubilidad del siringarresinol en agua ácida es también apreciable. Por otra parte, el hallazgo de la norargemonina en fracciones que deberían corresponder a compuestos fenólicos y no fenólicos indica que esta base sólo se encuentra parcialmente ionizada en solución acuosa a pH 13.

Esta es la primera vez que se informa sobre la presencia de un lignano y de alcaloides pavínicos en el género *Berberis*. En la familia de las berberidáceas es característica la presencia de lignanos de un tipo estructural diferente en los géneros *Podophyllum* y *Diphylleia*,⁴ y más recientemente se ha encontrado (-)-episiringarresinol en *Nandina domestica*.⁸ La única referencia a un alcaloide pavínico en una berberidácea es un trabajo que informa sobre el aislamiento de argemonina de *Leontice smirnowii*.⁹



PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal y métodos

La corteza de tallos de *Berberis buxifolia* fue recolectada en la ciudad de Punta Arenas en otoño y primavera de 1975, y las raíces en los otoños de 1976 y 1977. La identificación fue realizada por el Sr. Edmundo Pisano (Instituto de la Patagonia).

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Kofler y no están corregidos. Los espectros de RMN fueron registrados a 60 MHz usando TMS como referencia interna. Los espectros de UV se registraron para solución en MeOH. Los espectros de IR se registraron usando suspensiones en vaselina medicinal y pastillas de KBr. Para la cromatografía en capa fina se utilizaron los siguientes sistemas: CHCl_3 - MeOH (9 : 1) (sistema A), CHCl_3 - AcOEt - MeOH (4 : 4 : 2) (sistema B), C_6H_6 - acetona - NH_4OH (10 : 16 : 1) (sistema C), en capas de gel de sílice PF_{254} , HF_{254} , o G_{254} . Para la cromatografía en papel se utilizó el sistema AcOEt - piridina - agua (10 : 4 : 3) en papel Whatman N° 1. Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice y alúmina. Los espectros de masas fueron registrados con fragmentación inducida por impacto electrónico a 70 eV.

Extracción y fraccionamiento de componentes de corteza

Una muestra de 6.0 Kg de corteza de tallos de calafate (secada al aire y molida) se extrajo en un extractor sólido-líquido con éter de petróleo liviano (60-70°) hasta reacción de Dragendorff negativa. Se evaporó el solvente, y el residuo se distribuyó entre CHCl_3 y HCl 5%/o. La solución acuosa ácida se alcalinizó con NH_4OH y se extrajo con CHCl_3 . El extracto clorofórmico se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 , y se evaporó el solvente obteniéndose un residuo de alcaloides crudos que pesó 403 mg del cual se pudo separar por CCP (sistemas A y C) 104 mg del alcaloide C-04, observando la presencia de otras tres bases no aisladas.

El polvo agotado, una vez seco, se reextrajo con MeOH hasta reacción de Mayer negativa. La solución metanólica se concentró hasta sequedad y el residuo se trató con HCl 5%/o, y la solución ácida se filtró y se extrajo con CHCl_3 . El extracto se trató con HCl 5%/o, y la solución ácida se extrajo nuevamente con CHCl_3 hasta reacción de Dragendorff negativa en el último extracto, se lavó la solución clorofórmica con NaOH 2%/o, y después con agua, se secó y se eliminó el solvente, obteniéndose un residuo que pesó 400 mg (fracción A). Por CCP de este material usando el sistema A se aislaron 40 mg de (-)-norargemonina.

La solución alcalina se neutralizó con HCl 5%/o y luego se basificó con NH_4OH y se extrajo con CHCl_3 . El extracto se lavó con agua, se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose 1.69 g de residuo (fracción B). Este material se sometió a una cromatografía en columna húmeda de alúmina eluyendo con CHCl_3 y con mezclas de polaridad creciente de CHCl_3 - MeOH. Las primeras fracciones obtenidas fueron recromatografiadas en gel de sílice con los mismos eluyentes, obteniéndose siringarresinol y (-)-norargemonina que fueron purificadas por CCP usando el sistema A, pesando 253 mg y 51 mg, respectivamente.

La solución ácida agotada con CHCl_3 se alcalinizó con NH_4OH y se extrajo nuevamente con CHCl_3 . La fase orgánica se extrajo con NaOH 2%/o, se lavó con agua, se secó y se concentró a sequedad, obteniéndose un residuo que pesó 808 mg (fracción C). Este material se cromatografió en columna húmeda de alúmina usando los eluyentes ya citados, separándose (-)-norargemonina, C-04, y restos de berberina.

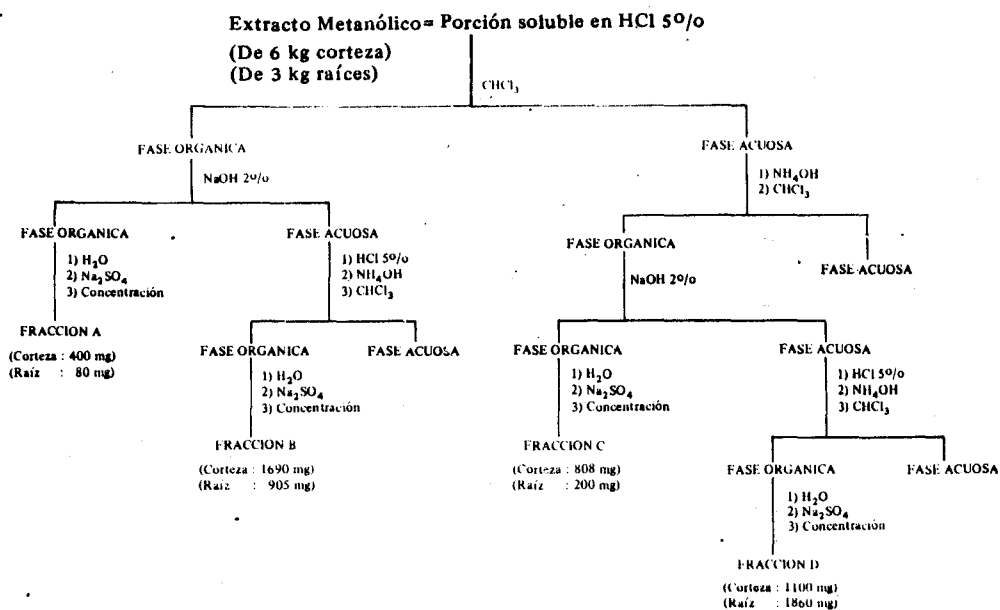
El extracto acuoso alcalino se neutralizó con HCl 5%/o, se basificó con NH_4OH , y se extrajo con CHCl_3 . Este extracto orgánico se lavó con agua, se secó y se concentró a sequedad, obteniéndose un residuo que pesó 1.1 g (fracción D). Esta última fracción fue cromatografiada en columna seca de gel de sílice, eluyendo con CHCl_3 y CHCl_3 - MeOH, separándose nuevamente siringarresinol y (-)-norargemonina.

Extracción y fraccionamiento de alcaloides de raíz

3.0 Kg de material vegetal (secado al aire y molido) se extrajo con éter de petróleo liviano (60-70°). El polvo agotado, una vez seco, se reextrajo con MeOH, y el extracto metanólico intensamente amarillo fue concentrado hasta un volumen de aproximadamente 200 ml al

que se agregó NaI 50% para precipitar la berberina como yoduro, que pesó 20 g. Las aguas madres fueron concentradas casi a sequedad, para luego continuar con el fraccionamiento de la misma manera que los componentes de la corteza. Los resultados se resumen en los esquemas 1 y 2.

ESQUEMA 1



ESQUEMA 2

Compuestos obtenidos de distintas partes de *Berberis Buxifolia*

FRACCION	ORGANO	COMPUESTO	CANTIDAD AISLADA (mg)
A	Corteza	(-)-norargemonina	40
	Raíz	(-)-argemonina	29
		(-)-norargemonina C-04	61 125
B	Corteza	(-)-norargemonina Siringarresinol	51 253
	Raíz	(-)-norargemonina	19
C	Corteza	(-)-norargemonina	30
		C-04	19
		Berberina	10
C	Raíz	(-)-norargemonina	15
		C-04	161
D	Corteza	(-)-norargemonina Siringarresinol	69 21
	Raíz	(-)-norargemonina	20

Siringarresinol

Recristalizado de C_6H_6 en forma de agujas, fundió a $168-170^\circ$ (lit. $170-172^\circ$),¹⁰ Rf 0.74 en sistema A, $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 238 nm (4.37), 272 (4.43), 282 inflexión (4.35), δ^{CDCl_3} 3.03 ppm m (2H, unión de anillos furánicos), 3.85 s (12H, OCH₃), 3.75 - 4.20 m (4H, OCH₂), 4.65 d J = 4.8 Hz (2H, Ar-CH-O), 5.50 s ancho, desaparece por intercambio con D₂O (2H, OH), 6.56 s (4H, Ar-H), M⁺ 418.1654 (100^o/o), calculado para C₂₂H₂₆O₈ 418.1609, 182.0560 (48^o/o), calculado para C₉H₁₀O₄ 182.0579, 181.0490 (86^o/o), calculado para C₉H₉O₄ 181.0501, 167.0787 (71^o/o), calculado para C₉H₁₁O₃ 167.0708. No fue posible medir valores significativos de rotación óptica siquiera en el UV cercano.

Diacetato de siringarresinol

27 mg de siringarresinol se disolvieron en 0.5 ml de piridina, se añadió 0.5 ml de anhídrido acético, y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 hr. Se agregaron 3 ml de EtOH y se concentró a sequedad, repitiendo estas operaciones hasta eliminación del olor a piridina. Se obtuvieron 25 mg de producto, cristalizado de MeOH, pf 175° (lit. $179-180^\circ$),¹⁰ δ^{CDCl_3} 2.16 ppm s (6H, COCH₃), 3.03 m (2H, unión de anillos furánicos), 3.82 s (12H, OCH₃), 3.75 - 4.24 m (4H, OCH₂), 4.65 d J = 4.8 Hz (2H, Ar-CH-O), 6.58 s (4H, Ar-H).

(-)-Norargemonina

Recristalizada de C_6H_6 - CHCl₃ (1 : 1) en forma de agujas, fundió a $242-244^\circ$ (lit. $239-242^\circ$),¹¹ $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 288 nm (4.45), δ^{CDCl_3} 2.52 ppm s (3H, NCH₃), 2.4-4.5 m (6H, anillos saturados), 3.80 s (6H, OCH₃), 3.82 s (3H, OCH₃), 6.60 s (1H, Ar-H), 6.61 s (1H, Ar-H), 6.42 s (2H, Ar-H), M⁺ 341.1633 (33^o/o), calculado para C₂₀H₂₃NO₄ 341.1595, 204.1032 (100^o/o), calculado para C₁₂H₁₄NO₂ 204.0923, 190.0877 (78^o/o), calculado para C₁₁H₁₂NO₂ 190.0837. Rf 0.56 en sistema A. Su espectro de IR resultó idéntico al de una muestra patrón de (-)-norargemonina.

(-)-Argemonina

Cristalizada de MeOH, fundió a $152-154^\circ$ (lit. $152.5-153^\circ$),¹² $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 287 nm (4.01), δ^{CDCl_3} 2.53 ppm s (3H, NCH₃), 2.62 d J = 17 Hz (2H, Ar-CH₂a), 3.42 dd J = 17 Hz, J' = 6 Hz (2H, Ar-CH₂e), 3.80 s (6H, OCH₃), 3.88 s (6H, OCH₃), 4.08 d J' = 6 Hz (Ar-CH-N), 6.42 s (2H, Ar-H), 6.60 s (2H, Ar-H). Su espectro de IR resultó idéntico al de una muestra preparada por metilación de (-)-norargemonina con CH₂N₂.

C-04

Cristalizado de C_6H_6 - ciclohexano, fundió a $135-137^\circ$, Rf 0.85 en papel, 0.37 en sistema A, $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 281 nm (3.82), $\lambda_{\text{mín}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 258 (3.32), sin cambio al agregar NaOH 5^o/o, δ^{CDCl_3} 2.31 ppm s (3H, NCH₃), 2.55 s (3H, NCH₃), 3.27 s (3H, OCH₃), 3.65 s (3H, OCH₃), 3.71 s (3H, OCH₃), 3.72 s (3H, OCH₃), 3.82 s (3H, OCH₃), 5.38 s (1H, Ar-H), sistema complejo de señales entre 5.86 - 7.10 (8H, Ar-H), M⁺ 652 correspondiente a C₃₉H₄₄N₂O₇, otros iones intensos a m/e 396 y 198.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se efectuó con el apoyo de la DICYT (UTE) y del FEMCIECC (OEA). Los autores le agradecen al Dr. Gert Eckhardt el registro de los espectros de masas, al Sr. Sergio Alegría el de los de RMP, y al Prof. F.R. Stermitz el envío de una muestra de (-)-norargemonina. Uno de los autores (V.F.) agradece una beca interna de la UTE.

BIBLIOGRAFIA

1. G. BUCHHEIM, en H. Melchior (ed.), A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien, 12^a ed., vol. 2, 131-147, Borntraeger, Berlín, 1964.
2. J.J. WILLAMAN Y H.-L. LI, *Lloydia*, 33, Suppl. 3A, 58-60 (1970); H.-G. BOIT, *Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960*, Akademie-Verlag, Berlín, 1961.
3. M. SHAMMA, J.L. MONIOT, S.Y. YAO, G.A. MIANA Y M. IKRAM, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1381-1382 (1972); M. SHAMMA, J.E. FOY Y G.A. MIANA, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 7809-7810 (1974); B. BRAZDOVICOVA, D. KOSTALOVA, J. SLAVIK Y J. TOMKO, *Chem. Zvesti*, 29, 265-268 (1975); M. IKRAM Y F. KHAN, *Planta Med.*, 32, 212-213 (1977); A. KARIMOV, M.V. TELEZHENETSKAYA, K.L. LUTFULLIN Y S. YU. YUNUSOV, *Khim. Prir. Soedin.*, 1977, 80-83; A. KARIMOV, M.V. TELEZHENETSKAYA, K.L. LUTFULLIN Y S. YU. YUNUSOV, *Khim. Prir. Soedin.*, 1978, 419.
4. R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, vol. 3, 240-255, Birkhäuser, Basel, 1964.
5. L. ITURRA, Tesis de Químico-Farmacéutico, Universidad de Concepción (Chile), 1924.
6. P.N. ARATA, *Anales Soc. Científica Argentina*, 7, 97-99, (1879).
7. G. SEPULVEDA, Tesis de Químico-Farmacéutico, Universidad de Concepción (Chile), 1947.
8. J. KUNITOMO, M. JU-ICHI, Y. ANDO, Y. YOSHIKAWA, S. NAKAMURA Y T. SHINGU, *Yakugaku Zasshi*, 95, 445-447 (1975).
9. E.G. TKESHALASHVILI Y K.S. MUDZHIRI, *Khim. Prir. Soedin.*, 1975, 807-808 (citado en *Chem. Abstr.*, 84, 102357).
10. E. DICKEY, *J. Org. Chem.*, 23, 179-184 (1958).
11. F.R. STERMITZ Y J.N. SEIBER, *Tetrahedron Lett.*, 1966, 1177-1180.
12. F.R. STERMITZ Y K.D. MCMURTREY, *J. Org. Chem.*, 34, 555-559 (1969).