



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“CUANTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE *Berberis hallii* “Carrasquilla” SECTOR LA JOSEFINA SAN ISIDRO DEL CANTÓN GUANO PROVINCIA DE CHIMBORAZO.

TESIS DE GRADO

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

**PRESENTADO POR:
CAROLINA NATALY SILVA PONCE**

**RIOBAMBA – ECUADOR
2010**

DEDICATORIA

Dedicado especialmente a mí hermano Dennis; quien ha sido el motivo y la razón diaria que me ha encaminado en el propósito de cultivar logros y metas; expresándole la dicha y felicidad que da a mi vida.

Para mis padres; por su comprensión y ayuda en todo momento, me han enseñado a sobrellevar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

AGRADECIMIENTO

Primero doy gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón y mente; por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Me gustaría agradecer sinceramente a mi tutora de Tesis, Dra. Cumandá Játiva; por la dedicación y ayuda desinteresada durante esta investigación; sus conocimientos, orientaciones, manera de trabajo, persistencia, paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación; quién ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa como profesional. Ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración; y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecida con aquellas personas que han otorgado un aporte desinteresado en la realización de esta Tesis siendo dignos de reconocimiento y gratitud.

Para ellos,

Muchas gracias por todo.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“CUANTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE *Berberis hallii* “Carrasquilla” SECTOR LA JOSEFINA SAN ISIDRO DEL CANTÓN GUANO PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**, de responsabilidad de la señorita egresada Carolina Nataly Silva Ponce, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Yolanda Días DECANA FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Luis Guevara DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dra. Cumandá Játiva DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Msc. Simón Moreano MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----

NOTA DE TESIS

Yo, **Carolina Nataly Silva Ponce**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

CAROLINA NATALY SILVA PONCE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
EtOH	Etanol 96 % (Alcohol Potable)
g	Gramos
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
pH	Potencia Hidrógeno
TLC	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)
mL	Mililitros
hrs	Horas
H.Ac	Ácido acético Glacial
L	Litros
Solv	Solventes
HCCl3	Cloroformo
NH3	Amoniacó
B₁	Banda 1
B₂	Banda 2
B₂ sub 1	Banda 2 sub 1

B₂ sub 2	Banda 2 sub 2
B₂ sub 3	Banda 2 sub 3
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
Abs	Absorbancia
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetros

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	- 6 -
ÍNDICE GENERAL.....	- 8 -
ÍNDICE DE CUADROS	- 15 -
ÍNDICE DE ANEXOS	- 19 -
INTRODUCCIÓN.....	- 20 -
CAPÍTULO I.....	- 23 -
1. MARCO TEÓRICO.....	- 23 -
1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	- 23 -
1.1.1 FAMILIA BERBERIDACEAE.....	- 23 -
1.1.2 GÉNERO BERBERIS.....	- 24 -
1.1.3 <i>Berberis hallii</i>	- 27 -
1.2 QUÍMICA DEL GÉNERO <i>BERBERIS</i>	- 29 -
1.2.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA.....	- 29 -
1.2.2 ALCALOIDES	- 30 -
1.2.2.1 Definición Etimológica	- 30 -
1.2.2.2 Datos históricos	- 30 -
1.2.2.3 Definición.....	- 30 -
1.2.2.4 Características Generales de los Alkaloides	- 31 -
1.2.2.5 Propiedades de los Alkaloides	- 31 -
1.2.2.6 Nomenclatura	- 32 -
1.2.2.7 Funciones de los alkaloides en las plantas.....	- 32 -
1.2.2.8 Biosíntesis de Metabolitos secundarios de origen vegetal	- 33 -

1.2.2.9 Biogénesis de Alcaloides a partir de Fenilalanina.....	37 -
1.2.2.10 Clasificación del los Alcaloides:	39 -
1.2.3 ALCALOIDES DEL GÉNERO <i>Berberis</i>	39 -
1.2.4 DATOS DE IDENTIFICACIÓN DE LA BERBERINA.....	43 -
1.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GÉNERO <i>Berberis</i>	45 -
1.3.1 ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA BERBERINA.....	46 -
1.4 MUESTREO, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.	47 -
1.4.1 MUESTREO	47 -
1.4.2 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN.....	48 -
1.4.3 LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN:.....	49 -
1.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	49 -
1.5.1 EXTRACCIÓN DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES	50 -
1.5.1.1 Maceración:.....	51 -
1.5.1.2 Extracción:.....	52 -
1.5.1.3 Agitación	52 -
1.5.1.4 Temperatura.....	52 -
1.5.1.5 pH	53 -
1.5.1.6 Naturaleza del solvente	53 -
1.5.1.7 Tiempo de Extracción.....	54 -
1.6 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	54 -
1.6.1 CONCEPTO DE CROMATOGRAFÍA.....	54 -
1.6.2 CONCEPTO DE R.f.....	55 -
1.6.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.(CCf o TLC).....	55 -
1.6.3.1 Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina.....	56 -

1.6.3.3 Adsorbentes más comunes para Cromatografía en Capa Fina	- 57 -
1.6.4 Factores que influyen en una separación por Cromatografía de Capa Fina. -	58 -
1.7 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO	- 59 -
1.7.1 ESPECTROMETRÍA.....	- 59 -
1.7.2 ESPECTROMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	- 59 -
1.7.3 APLICACIONES	- 60 -
1.7.4 ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE	- 61 -
1.7.5 ESPECTRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	- 63 -
1.7.6Reglas de Woodward-Fieser	- 63 -
CAPITULO II.....	- 64 -
2 PARTE EXPERIMENTAL	- 64 -
2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	- 64 -
2.2 RECURSOS MATERIALES	- 64 -
2.2.1 MATERIA PRIMA	- 64 -
2.2.2 EQUIPOS	- 65 -
2.3 FACTORES DE ESTUDIO.....	- 69 -
2.4 UNIDAD EXPERIMENTAL O DE ANÁLISIS	- 70 -
2.5 METODOLOGÍA	- 70 -
2.5.1 OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA	- 70 -
2.5.2.1 Muestreo:.....	- 71 -
2.5.2.2 Recolección:	- 71 -
2.5.2.3 Conservación	- 71 -
2.5.2.4 Limpieza y descontaminación:	- 72 -
2.5.3 EXTRACCIÓN DE LA PLANTA FRESCA POR MACERACIÓN.....	- 72 -

2.5.4 MACERACIÓN	- 73 -
2.5.5 EXTRACCIÓN	- 73 -
2.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	- 74 -
2.6.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF.....	- 74 -
2.6.2 ENSAYO DE WAGNER:.....	- 75 -
2.6.3 ENSAYO DE MAYER:	- 75 -
2.6.4 ENSAYO DE LIEBERMAN-BÜCHARD.	- 75 -
2.6.5 ENSAYO DE BÖRNTRAGER.	- 76 -
2.6.6 ENSAYO DE BALJET.	- 76 -
2.6.7 ENSAYO DE SUDAN III.....	- 77 -
2.6.8 ENSAYO DE CATEQUINAS.....	- 77 -
2.6.9 ENSAYO DE RESINAS.....	- 77 -
2.6.10 ENSAYO DE ESPUMA.	- 77 -
2.6.11 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO.....	- 78 -
2.6.12 ENSAYO DE N INHIDRINA.....	- 78 -
2.6.13 ENSAYO DE SHINODA.	- 79 -
2.6.14 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS.....	- 79 -
2.6.15 ENSAYO DE FEHLING:	- 79 -
2.7 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE EXTRACTOS	- 80 -
2.7.1 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS.....	- 80 -
2.7.2 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA.....	- 80 -
2.7.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	- 81 -
2.7.4 DETERMINACIÓN DEL pH DE EXTRACTOS	- 83 -
2.7.5 DETERMINACIÓN DE LOS SÓLIDOS TOTALES.....	- 84 -

2.7.6 ANÁLISIS CAPILAR.....	85 -
2.8 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA.....	87 -
2.8.1. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES:.....	87 -
Pérdidas por Desecación: Método Gravimétrico	90 -
2.9 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES.....	91 -
2.10 PRUEBAS PRELIMINARES CON SOLVENTES	94 -
2.11 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DE RESIDUO SECO DE ALCALOIDES	95 -
2.11.1 PREPARACIÓN DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS PREPARATIVAS .-	95 -
2.11.2 COLOCACIÓN DE MUESTRA DE ALCALOIDES SOBRE LA PLACA CROMATOGRÁFICA	96 -
2.11.3 OBSERVACIÓN EN LA CÁMARA UV.....	97 -
2.11.4 REVELADO CROMATOGRÁFICO.....	97 -
2.11.5 SEPARACIÓN DE MANCHAS REVELADAS EN LA CROMATOGRAFÍA.....	98 -
2.11.5.1 Separación de las B ₁ y B ₂ de la Silicagel	98 -
2.11.5.2 Cromatografía de B ₁ y B ₂	99 -
2.12 LECTURA EN EL ESPECTROFOTÓMETRO DE B ₁ Y B ₂	99 -
2.13 SEPARACIÓN DE B ₂	100 -
2.14 LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE 3 FRACCIONES B ₂ SUB 1; B ₂ SUB 2 B ₂ SUB 3	101 -
2.15 IDENTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA BERBERINA (ALCALOIDE EN MAYOR PROPORCIÓN)	102 -
2.16 APLICACIÓN DE LAS REGLAS DE WOOWARD – FIESER PARA IDENTIFICAR ALCALOIDES.	102 -
CAPÍTULO III	103 -

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	103 -
3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA.....	103 -
3.1.1. COMPROBACIÓN TAXONOMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	103 -
3.1.2. ESTUDIO MACROSCÓPICO	104 -
3.1.2.1 Muestreo, Recolección, Conservación, Limpieza y Descontaminación .-	104 -
3.1.3 EXTRACCIÓN DE LA PLANTA FRESCA POR MACERACIÓN.....	105 -
3.1.4 MACERACIÓN Y EXTRACCIÓN	106 -
3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	107 -
3.3 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE LAS RAÍCES de <i>Berberis hallii</i>	109 -
3.3.1 MÉTODOS GENERALES PARA ANÁLISIS DE EXTRACTOS.....	109 -
3.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DE RESIDUO SECO DE ALCALOIDES	112 -
3.4.1 OBSERVACIÓN EN LA CÁMARA UV.....	113 -
3.4.2 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE B ₁ Y B ₂	114 -
3.4 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE B ₁ Y B ₂	115 -
3.6 SEPARACIÓN DE B ₂	117 -
3.6.1 CROMATOGRAFÍA DE B ₂	117 -
3.6.2 IDENTIFICACIÓN DE BERBERINA EN LA CÁMARA UV.....	118 -
3.7ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE 3 FRACCIONES DE B ₂	119 -
3.8 DETERMINACIÓN DE LOS ALCALOIDES POR MEDIO DE WOODWARD - FIESER	119 -
B₂ sub 2	120 -
B₂ sub 3	120 -

3.9 IDENTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA BERBERINA (ALCALOIDE EN MAYOR PROPORCIÓN)	- 121 -
CONCLUSIONES	- 122 -
RECOMENDACIONES	- 124 -
RESUMEN.....	- 125 -
SUMMARY	- 126 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 127 -
ANEXOS.....	- 132 -
ANEXO N° 1. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE LAS RAÍCES DE <i>Berberis hallii</i>	- 132 -
ANEXO N° 2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	- 134 -
ANEXO N° 3. BARRIDOS EN EL UV- VISIBLE DE LAS FRACCIONES ...	- 136 -
Reglas de Woodward para Compuestos Carbonílicos Conjugados	- 140 -

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1 ALCALOIDES Y GRUPOS A LOS QUE PERTENECEN:	40
CUADRO N° 2. ALCALOIDES AISLADOS DEL GÉNERO <i>Berberis</i>	42
CUADRO N° 3. PLANTA, LUGAR DE PROCEDENCIA, SUSTANCIAS A IDENTIFICARSE	70
CUADRO N° 4. ALCOHOL QUE SE DEBE UTILIZA RESPECTO AL RESIDUO SECO	72
CUADRO No 5. ANÁLISIS FISICO QUIMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO ETANÓLICO.	74
CUADRO N° 6. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO Y OBTENCIÓN DE ALCALOIDES	93
CUADRO N° 7. LECTURAS DE LAS B ₁ Y B ₂ EN EL ESPECTROFOTÓMETRO	100
CUADRO N° 8. LECTURAS DE LAS SUB – BANDAS DE B ₂ sub 1; B ₂ sub 2 B ₂ sub 3, EN EL ESPECTROFOTÓMETRO	101
CUADRO N°9. COMPROBACIÓN TAXONOMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE <i>Berberis halliii</i>	104
CUADRO N°10. MUESTREO, RECOLECCIÓN, CONSERVACIÓN LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.	105
CUADRO N°11. PORCENTAJE DE RESIDUO SECO Y ALCOHOL UTILIZADO	105
CUADRO N°12. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS RAICES Y TALLOS DE <i>Berberis halliii</i>	106
CUADRO N°13. GRUPOS FITOQUIMICOS ENCONTRADOS EN LAS RAICES Y TALLOS DE <i>Berberis halliii</i> LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH	107
CUADRO N° 14. DETERMINACIONES PARA EL ANÁLISIS DE EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Berberis halliii</i>	109
CUADRO N°15. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES	111

CUADRO N° 16. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD	111
CUADRO No 17. (%) DE RENDIMIENTO DE B₁ Y B₂	114
CUADRO N° 18. LECTURAS DE LAS B₁ Y B₂ EN EL ESPECTROFOTÓMETRO	115
CUADRO N° 19. (%) DE RENDIMIENTO DE B₂	118

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1. HOJAS DE DIFERENTES ESPECIES DE <i>Berberis</i>	24
GRÁFICO N° 2. ESPINAS DE VARIAS ESPECIES DE BERBERIS	25
GRÁFICO N° 3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE VARIEDADES DE <i>Berberis</i> en Ecuador	29
GRÁFICO NO 4. BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL	36
GRÁFICO N° 5. BIOGÉNESIS DE ALCALOIDES A PARTIR DE FENILALANINA	38
GRÁFICO N° 6. PARTES DE UN ESPECTROFOTÓMETRO	62
GRÁFICO N° 7. SISTEMA DE SOLVENTES PARA IDENTIFICAR ALCALOIDES EN PLANTAS (TABLA 1)	94
GRÁFICO N° 8. PREPARACIÓN DE PLACAS	95
GRÁFICO N° 9. COLOCACIÓN DE MUESTRA SOBRE LA PLACA	96
GRÁFICO N° 10. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LAS BANDAS B1 Y B2	112
GRÁFICO NO 11. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA B2 (Absorbancia Vs λ) ...	116
GRÁFICO NO 12. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA B2 (Absorbancia Vs Concentración)	116
GRÁFICO N° 13. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA SEPARACIÓN DE LA BANDA 2, Y OBTENCION DE 3 FRACCIONES	117
GRÁFICO NO 14. PRINCIPALES ALCALOIDES DE <i>Berberis hallii</i> . (TABLA 2)	114
GRÁFICO NO 15. IDENTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES PRESENTES EN LAS SUB BANDAS DE B ₂ (TABLA 3)	120

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1. Hoja de <i>Berberis hallii</i>	25
FOTOGRAFÍA No. 2. <i>Berberis hallii</i>	26
FOTOGRAFÍA N° 3. Drupa de <i>Berberis hallii</i>	26
FOTOGRAFÍA N° 4 .Arbusto de <i>Berberis hallii</i>	27
FOTOGRAFÍA N° 5. Raíz de <i>Berberis hallii</i>	28
FOTOGRAFÍA No. 6. Extracto Alcohólico.....	73
FOTOGRAFÍA No. 7. Separación de Fracciones	93
FOTOGRAFÍA No. 8. Fluorescencia de las Sustancias En Cámara UV	114

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE LAS RAÍCES DE <i>Berberis hallii</i>.	132
Dragendorff, Mayer, Wagner, Ninhidrina, Resinas, Shinoda, Baljet, Antocianinas, Sudan III, Catequinas, Fehling.....	133
ANEXO N° 2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	134
Placas Preparativas, Fase Móvil, Cromatografía, Observación en la Cámara UV	134
Revelado Cromatográfico, Separación de Bandas, Cromatografía de Banda 2, Revelado Cromatográfico de la Banda 2.....	135
ANEXO N° 3. BARRIDOS EN EL UV- VISIBLE DE LAS FRACCIONES	136
Espectrofotómetro UV Visible Unicam Helios, Espectro de Absorción UV de Berberina, Fracciones de Berberina en B ₂ sub 2	136
Espectro de Absorción UV de Calafatina, Espectro de Absorción UV de Lambertina	137
ANEXO N° 4. TABLAS DE WOODWARD – FIESER	138

INTRODUCCIÓN

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 *Pseudomonas aeruginosa* y en hongos, donde tenemos como ejemplo la presencia de psilocina en hongos alucinógenos mexicanos (3).

El género *Berberis* comprende cerca de 500 especies de arbustos y árboles de distribución cosmopolita. En Sur América se encuentra alrededor de 178 especies de *Berberis* distribuidas desde Venezuela hasta las pampas de Chile; en los páramos las diferentes variedades de *Berberis* han sufrido una notable diversificación, especialmente en Ecuador y Colombia.(2)

En el Ecuador están representadas 32 especies: y se pueden citar algunas como *Berberis chillacochensis* Camargo, *B. chimboensis* C. Schneider, *B. conferta* H.B.K., *B. engleriana* C. Schneider, *B. farinosa* Benoist, *B. glauca* Kunth, *B. grandiflora* Turcz., *B. hallii* Benoist, *B. hirtellipes* Ahrendt, *B. hyperythra* Diels, *B. jamesonii* Lindley, *B. laidivo* Camargo, *B. lechleriana* C. Schneider, *B. lehmannii* Hieron., *B. lobbiana* C. Schneider, *B. loxensis* Benth., *B. lutea* Ruiz & Pavón, *B. minzaensis* Camargo, *B. multiflora* Benth., *B. paniculata* Juss Ahrendt y *B. warszewiczii* Hieron., todas sobre los 2000 m.s.n.m, y especialmente en el subpáramo.(1)

En la actualidad *Berberis hallii* Hieron es una especie que se encuentra a 2500-3000 metros en los Andes; está localizada en los páramos de Carchi, Chimborazo Cotopaxi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua; ha motivado el interés de investigación para realizar el análisis de sus metabolitos secundarios “alcaloides”.

Se encontró su aplicación para trabajos posteriores, como: ampliar el campo de usos y aplicaciones de dicha especie en el ámbito de teñido y disminución de la contaminación de los efluentes de tratamiento de teñido con productos que son biodegradables, disminuyendo la agresión al ambiente; así como también en el campo medicinal, análisis microbiológico industrial, que inclusive puede dar lugar a la formación de microempresas o emprendimiento personal.

El conocimiento general de los metabolitos secundarios de *Berberis* a nivel mundial son alcaloides isoquinolínicos y no existiendo mayor información del género *Berberis* en el Ecuador se comprobó su presencia y el método de cuantificación que permitió valorar el alcaloide principal que en este caso fue Berberina

Lo más interesante en este arbusto es el principio colorante amarillo que contiene su raíz y corteza. Este principio colorante ha sido químicamente definido como Berberina y su fórmula es: $(C_{20}H_{17}NO_4 + 6H_2O)$. Recolectar y realizar la identificación taxonómica de *Berberis hallii* de la Parroquia de San Andrés Chimborazo- Ecuador.

Con estas razones se identificó la especie de *Berberis hallii* existente en el Sector La Josefina-San Isidro provincia de Chimborazo, y se realizó el trabajo con *Berberis hallii* en primer lugar: luego de realizar la identificación taxonómica de la especie y una vez obtenida la materia prima (tallos de *Berberis hallii*) fue necesario que, en conocimiento de, que los alcaloides son los metabolitos secundarios presentes en las diferentes

variedades de *Berberis* se realizó de manera preliminar en *Berberis hallii* un Tamizaje Fitoquímico para comprobar la presencia de los alcaloides isoquinolínicos.

Posteriormente se separó, purificó e identificó, y determinó el metabolito marcador mediante Cromatografía de capa fina para verificar la presencia de los alcaloides, y en el mejor de los casos permitió identificar el mayor contenido de metabolitos secundarios para realizar el estudio de cuantificación de los mismos; y para realizar sus determinaciones mediante métodos espectroscópicos (UV).o químicos existentes en la facultad de Ciencias de la ESPOCH.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

1.1.1 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 (4).

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 (5).

1.1.2 GENERO BERBERIS

El género *Berberis* consta de más de 500 especies ampliamente distribuidas, pero mejor representadas en los Himalayas, el oeste de China y en los Andes. En el Ecuador están representadas 32 especies.(7)

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 (Gráfico N°1)

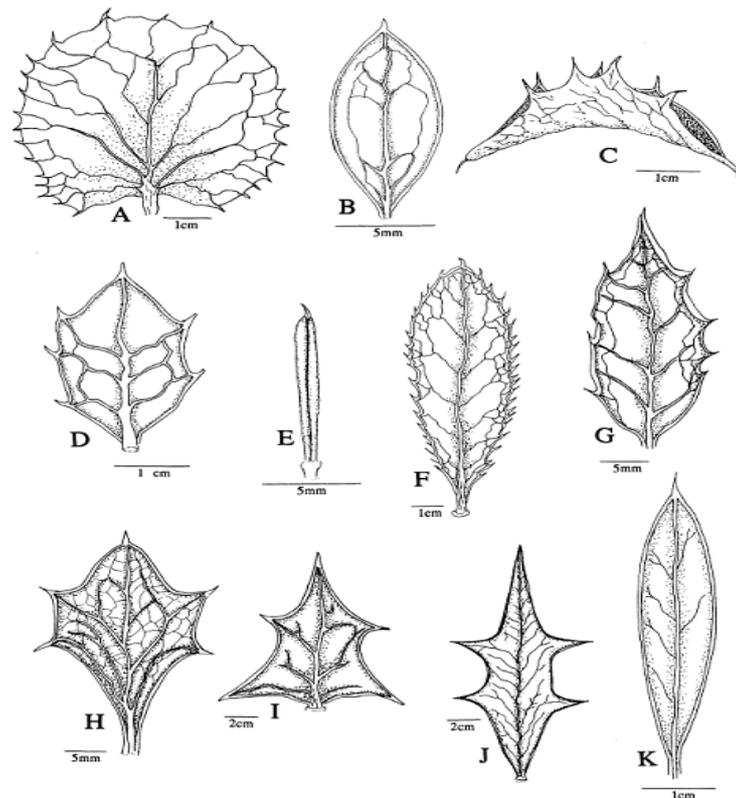
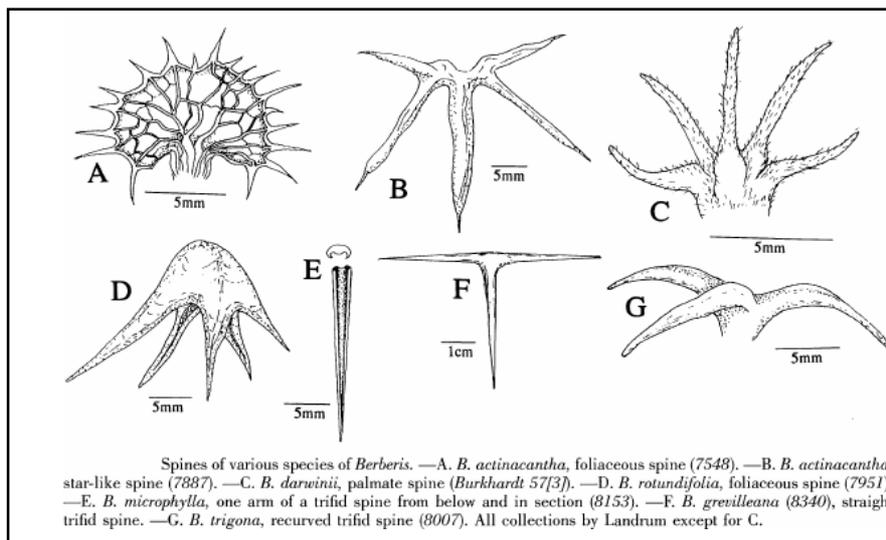


GRÁFICO N° 1. Hojas de Diferentes Especies de *Berberis*



FOTOGRAFÍA N° 1. Hoja de *Berberis hallii*

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 (Gráfico N° 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 (28).



Spines of various species of *Berberis*. —A. *B. actinacantha*, foliaceous spine (7548). —B. *B. actinacantha*, star-like spine (7887). —C. *B. darwinii*, palmate spine (Burkhardt 57[3]). —D. *B. rotundifolia*, foliaceous spine (7951). —E. *B. microphylla*, one arm of a trifid spine from below and in section (8153). —F. *B. grevilleana* (8340), straight trifid spine. —G. *B. trigona*, recurved trifid spine (8007). All collections by Landrum except for C.

GRÁFICO N°2. Espinas de Varias Especies de *Berberis*



FOTOGRAFÍA N°2. *Berberis hallii*

Son Arbustos o pequeños árboles, espinosos, leño amarillo. Hojas alternas, coriáceas, margen entera o espinosa, a menudo con el envés pruinoso; ramas secundarias con entrenudos muy cortos apareciendo las hojas fasciculadas. Inflorescencia racimosa o paniculada o flores solitarias. Flores bisexuales, amarillas o anaranjadas; 6 sépalos, en 2 series de 3; pétalos 6 en 2 series, con glándulas basales en la superficie interna; estambres en igual número que pétalos, dentados o edentados; ovario súpero, unicarpelar, con pocos óvulos en placentas marginales, estigma papiloso con el ápice cóncavo, generalmente sésil. Drupa negro-morada, generalmente pruinosa.(6)



FOTOGRAFÍA N° 3. Drupa de *Berberis hallii*

1.1.3 *Berberis hallii*

Es un arbusto glabro, que puede alcanzar hasta 1,5 metros de altura. Presenta espinas 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 brotan simples o en racimo, en este último caso hasta veinte en un mismo tallo. Son de color amarillo o naranja, de 3 a 6 mm de longitud, con seis sépalos y seis pétalos en grupos alternos de tres. Los sépalos están habitualmente coloreados igual que los pétalos.



FOTOGRAFÍA N° 4. Arbusto de *Berberis hallii*

El fruto es una pequeña baya de 5 a 15 mm de largo, que al madurar toman un color rojo o azul oscuro, a menudo con un botón rosa o violeta. La forma puede ser, según la especie, esférica o alargada.

Los frutos son subglobosos de 6 a 7 mm de largo, azul-púrpura y usualmente con 5

semillas. Son comestibles, ricas en vitamina C, y de sabor ácido. Es difícil recolectarlas por los tallos espinosos. Son un alimento importante para muchas pequeñas aves, que ayudan además a dispersar las semillas. En Irán el fruto seco, conocido como Zereshk es de consumo común. En Ucrania se usa como aromatizante en una confitura muy popular.

En la Patagonia y otras regiones de Sudamérica algunas especies de *Berberis* conocidas como *calafate* y/o *michay* eran conocidas y consumidas ya por los pueblos originarios, y existen varias leyendas sobre la interacción humana con la planta.

La corteza de la raíz es útil en congestiones hepatobiliares y coleocistitis y contra la retención de orina. También es un laxante discreto. La planta es venenosa y medicinal. La planta, con excepción de sus frutos y semillas, es ligeramente venenosa. Su agente más poderoso es la berberina, que también se sabe que tiene una serie de efectos terapéuticos. En esta planta se puede desarrollar la fase acídica del peligroso hongo *Puccinia graminis* (óxido negro), que provoca la enfermedad de la roya de los cereales. Es muy utilizado en jardinería como planta ornamental.(3).

Lo más interesante en este arbusto es el principio colorante amarillo que contiene su raíz y corteza y que tiene la propiedad de adherirse a la fibra sin necesidad de mordiente, razón por la cual se busca aprovechar este recurso. Este principio colorante ha sido químicamente definido como *Berberina* y su fórmula es la siguiente: (C₂₀ H₁₇ VO₄ + 6 H₂₀).



FOTOGRAFÍA N° 5. Raíz de *Berberis hallii*

Berberis hallii “Carrasquilla” es endémica de la zona centro y sur de Ecuador, este arbusto florece entre los meses de noviembre y enero y es posible encontrarlo con frutos entre enero y marzo (28).

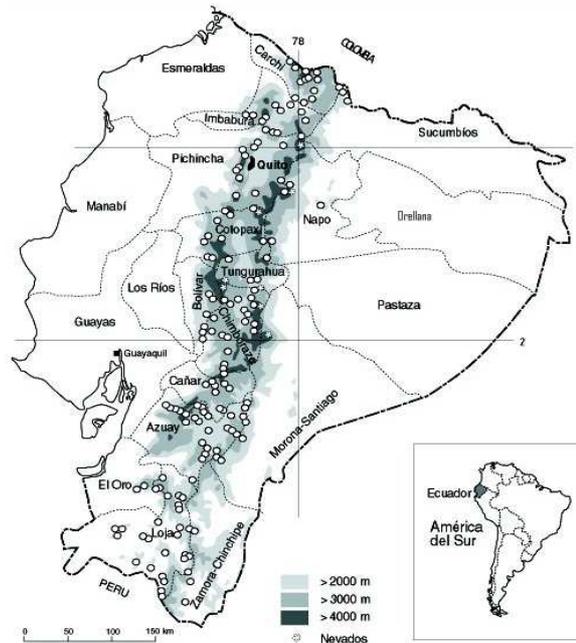


GRÁFICO N° 3. Ubicación Geográfica de Variedades De *Berberis* en Ecuador

1.2 QUÍMICA DEL GÉNERO *BERBERIS*

1.2.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

Reino:	Plantae	Orden:	Ranunculales
Subreino:	Tracheobionta	Familia:	Berberidaceae
División:	Magnoliophyta	Subfamilia:	Berberidoideae
Clase:	Magnoliopsida	Tribu:	Berberideae
Subclase:	Magnoliidae	Género:	<i>Berberis</i>

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. Se encuentra caracterizado por la presencia de alcaloides, a los que se les atribuyen muchas de las propiedades medicinales que presentan estas especies (22).

1.2.2 ALCALOIDES

1.2.2.1 Definición Etimológica

Etimológicamente proviene del griego *alkaly*: sosa y del griego *eidos*: aspecto (2)

1.2.2.2 Datos históricos:

- Su química real se desarrolla desde hace dos siglos
- F.W Sertürmeer (1805) aísla la morfina
- Gómez (1820) extrae el principio activo de la chinchona
- Robiquet aísla la narcotina (1817) y codeína (1832)
- Runge (1820) descubre la cafeína
- Mein (1832) descubre la atropina
- Coniína Primer alcaloide sintetizado (1886) (40)

1.2.2.3 Definición

- Sustancias naturales que reaccionan como bases como los álcalis. (W. Meissner 1819).
- Compuestos básicos nitrogenados de origen vegetal o animal (Winterstrien y Trier 1910).
- Un alcaloide es una sustancia orgánica cíclica que contiene un Nitrógeno en estado

de oxidación negativo y cuya distribución es limitada entre los organismos vivos.

- 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 (6).

1.2.2.4 Características Generales de los Alcaloides

- Son compuestos orgánicos de origen vegetal que se forman a partir de aminoácidos.
- Son sustancias nitrogenadas de carácter básico que contienen un Nitrógeno heterocíclico.
- Poseen estructura compleja
- Son tóxicos
- Presentan actividad fisiológica incluso a dosis muy bajas
- Precipitan con ciertos reactivos

1.2.2.5 Propiedades de los Alcaloides

- FPM: entre 100 y 900
- Alcaloides oxigenados: Generalmente son sólidos y cristalizables. Incoloros e inodoros; rara vez coloreados (Berberina de color amarillo; sanguinaria de color rojo). Sabor desagradable amargo. Punto de fusión por debajo de los 200 °C
- Alcaloides no oxigenados: Son líquidos, volátiles y olorosos. Arrastrables en corriente de vapor de Agua (coniína, nicotina, esparteína)
- Tienen actividad óptica (l) y (d); la levógira es más activa; propiedad interesante para el control de la pureza.
- Forman sales dobles con Hg, Au, Pt, I, y otros metales pesados.

- Carácter básico (par de electrones libres del N), debido a esto son sensibles al calor y a la luz, son estables con ácidos orgánicos.
- En la naturaleza se encuentran en forma de sales; aunque también como bases libres.
- Las sales cristalizadas se conservan bastante bien; y constituyen habitualmente la forma comercial de estas moléculas.

1.2.2.6 Nomenclatura

No existe una sistematización. Tienen una terminación en “**ina**”.

Son denominados siguiendo alguno de los criterios siguientes:

- De acuerdo a la especie que los contiene ejm: *Ephedra sp* = efedrina
- De acuerdo al nombre vulgar de la especie que produce ejm: Ergot de cornezuelo de centeno *Claviceps purpurea* = Ergotamina
- De acuerdo al Género a partir del cual se ha obtenido ejm: Género: *Papaver* (*Papaver somniferum*) = papaverina.
- De acuerdo a la actividad farmacológica ejm: Actividad farmacológica emética = emetina.
- Raramente de acuerdo a algún investigador (Jean Nicot embajador francés que envió semillas de la planta del tabaco a Francia) = Nicotina, Morfina = Morfeo Dios Griego del sueño.(52)

1.2.2.7 Funciones de los alcaloides en las plantas

Son dignos de mención los puntos siguientes:

- Siendo de naturaleza tan diversa, no puede esperarse que los alcaloides, como grupo, desempeñen un papel común (si es que tienen alguno) en la planta, excepto

en situaciones en que posiblemente se requiera un compuesto básico no específico.

- Como la mayoría de los alcaloides son biosintetizados a partir de unidades fácilmente disponibles, mediante una serie de reacciones inespecíficas; su presencia en la planta puede ser pura casualidad, dependiendo de las enzimas presentes y de la disponibilidad de precursores. Siendo aparentemente inocuos para la planta, no son eliminados por necesidad sino por selección natural.
- Las investigaciones están demostrando constantemente, no sólo que los alcaloides participan en el metabolismo de la planta a largo plazo, sino también, que la variación diaria en el contenido alcaloídico (cualitativo y cuantitativo) es muy común en varias especies. Esto implica que, si bien la presencia de alcaloides no es vital para la planta, estos deben participar en las secuencias metabólicas y no son solamente productos finales de desecho del metabolismo.
- De acuerdo con lo que antecede, se ha establecido que los alcaloides pueden desempeñar un papel en la defensa de la planta, frente al singlete de oxígeno (O_2), que está dañando a todos los organismos vivos y es producido en los tejidos vegetales en presencia de la luz. (49)

1.2.2.8 Biosíntesis de Metabolitos secundarios de origen vegetal

Tanto en animales como en vegetales, la energía para los fenómenos vitales proviene de una cadena de oxidaciones y reducciones, en las que se producen sustancias (metabolitos) útiles para el crecimiento o reproducción del organismo o inútiles y hasta tóxicas. (40)

También es análogo el sistema de preservación de las características del organismo, llamado información genética. Pero la diferenciación y especialización se enlazan con los mecanismos empleados por el organismo en sus transformaciones de materia y energía

(*metabolism*), por lo que éste experimenta algunas modificaciones, particularmente en la que se refiere a sustancias metabolizables, paso de organismos autotróficos a heterotróficos y elaboración de metabolitos secundarios.

En el aspecto externo, las tendencias evolutivas se manifiestan por diferencias morfológicas y fisiológicas, notables en organismos muy distantes y sutiles en los muy próximos; esto permite utilizar la información adquirida por los bioquímicos para explicar, en términos de consideraciones biogenéticas, la presencia de un mismo metabolito secundario en plantas pertenecientes a taxones diferentes (especies, géneros, tribus, etc.), o de metabolitos similares en la misma planta.

También es importante que al proponer la estructura o la estereoquímica de un metabolito secundario, se discuta su factibilidad en base a su biosíntesis, pues si no hay un mecanismo razonable es probable que la estructura asignada sea incorrecta. Las consideraciones biogenéticas han servido para planear síntesis sencillas de las sustancias y para el diseño de nuevas moléculas que interfieran con determinado proceso metabólico; v.gr., factores de crecimiento, desorganizadores de información genética, etc. (40)

La observación cuidadosa de las estructuras de numerosos productos naturales permite emitir hipótesis razonables sobre sus posibles biogénesis. Además del interés que ello tiene para el bioquímico, para el químico orgánico significa una base firme para:

- a. Elegir con más seguridad entre varias estructuras posibles para una sustancia más probable.
- b. La estereoquímica más probable; O un camino más simple para sintetizar un

compuesto natural;

- c. Una hipótesis que le permita escoger entre vegetales del mismo género, para buscar compuestos parecidos o iguales, como consecuencia de la extensa coincidencia de sus patrones genéticos

Las hipótesis biogenéticas adquieren más consistencias con el aislamiento de compuestos postulados como intermediarios, en ocasiones en la misma fuente natural, aunque con más frecuencia en otras. También se refuerzan por la síntesis, en condiciones similares a las de una célula, de estructuras naturales a partir de los intermediarios que se les postularon o más aún, cuando la introducción al vegetal o tejidos del mismo, de estos intermediarios conteniendo átomos marcados, lleva el aislamiento de las sustancias finales con átomos marcados en los sitios predichos por el esquema biogenético.

Entre los numerosos tipos de sustancias producidos por una planta, los alcaloides, aceites esenciales, terpenoides, glicósidos, flavonoides, etc., pueden o no encontrarse en un determinado vegetal; carecen de función definida en el metabolismo y, por su abundancia o ausencia, proporcionan a una planta características químicas útiles para su clasificación botánica o su aprovechamiento por el hombre. (16)

En el Gráfico No 4 aparece una interrelación de los productos primarios y secundarios del metabolismo vegetal.

Si se toman en cuenta los objetivos de la fitoquímica, la discusión se limitará a la biogénesis de los compuestos secundarios, y se recuerda que en las reacciones participan las enzimas, catalizadores orgánicos complejos muy efectivos y estéreo-selectivos. La introducción o eliminación de un grupo CO_2 es fácil, con intervención de la tiamina; (vitamina E).

1.2.2.9 Biogénesis de Alcaloides a partir de Fenilalanina

La fenilalanina origina numerosos tipos de alcaloides; así, pasando algunas moléculas por una oxidación, se forma la 3, 4-dihidroxi-fenilalanina y si hay descarboxilación, desanimación y oxidación, se obtiene el 3, 4-dihidroxi-fenilacetaldehído.

Una condensación de Mannich con ambas moléculas, seguida de una descarboxilación, origina la norlaudanosina. Las oxidaciones del anillo heterocíclico de esta molécula y su metilación, originan la papaverina.

La copulación oxidativa de ésta, origina los alcaloides de la aporfina. Una rotación de la molécula seguida de una copulación, forma los alcaloides típicos del opio. La condensación con formaldehído da los alcaloides tipo berberina; la fenilalanina al oxidarse, descarboxilarse y metilarse, origina la mezcalina, alcaloide típico de las cactáceas; ésta y sus derivados se condensan con un grupo acetilo formando la pelletina, la anhalonidina y la lofocerina. (Gráfico. No 5.)

Los estudios con lisina conteniendo ^{14}C han demostrado que ésta es el precursor de numerosos alcaloides con núcleo de piperidina. Así la anabasina, de la *Nicotiana glauca*, la N-metiliso-pelletierina (*Púnica gratte.tum*), la sedamina (*Sedum acre*) y la lobelina (*Lobelia. inflata*) se han formado como sigue (16)

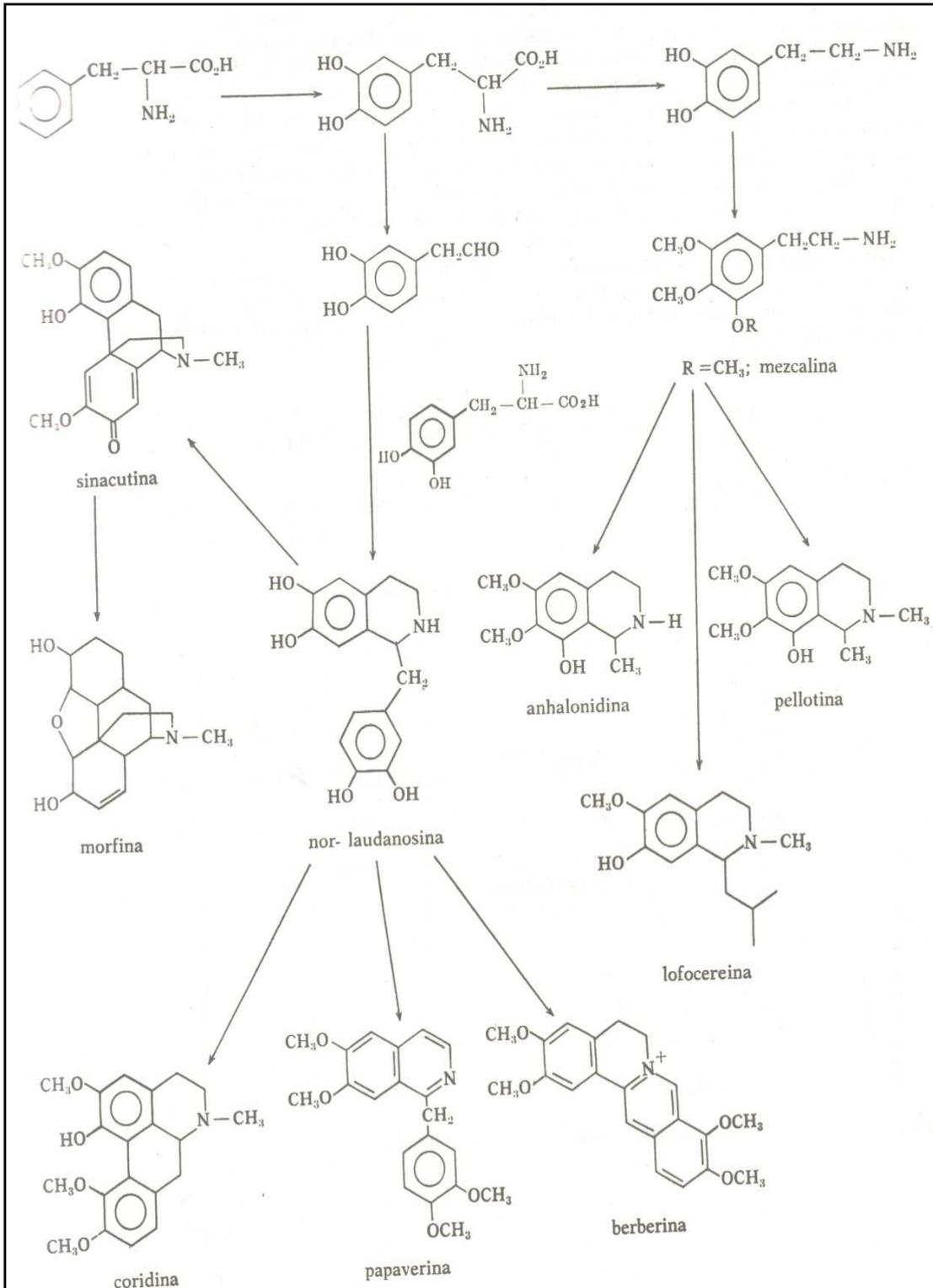


GRÁFICO NO 5. Biogénesis de Alcaloides A Partir de Fenilalanina

1.2.2.10 Clasificación del los Alcaloides:

Las plantas que contienen alcaloides han sido utilizadas como medicamentos, alimentos, y venenos desde la era antigua. los primeros alcaloides fueron aislados a comienzos del siglo XIX y la identificación del primero de ellos (coniína), así como la identificación de la estructura química, en 1870. (19)

Debido a la complejidad y diversidad de sus estructuras químicas la nomenclatura de los alcaloides no ha sido esquematizada y su clasificación ha sido realizada por semejanza con estructuras moleculares más simples. Los alcaloides son clasificados como:

- Indólicos
- Quinolínicos
- Isoquinolínicos
- Derivados del Tropano, etc.

1.2.3 ALCALOIDES DEL GÉNERO *Berberis*

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. (19).

Los ordenamientos que se mencionan se pueden clasificar en:

Protoberberinas

Aporfinas

Bencilisoquinolinas

Proaporfinas

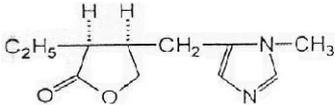
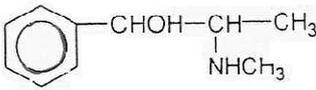
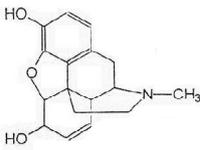
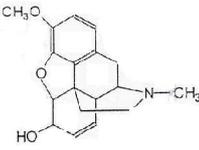
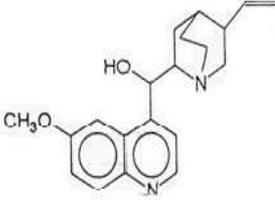
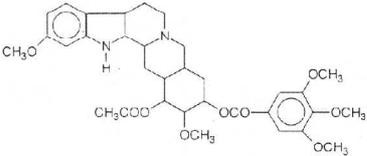
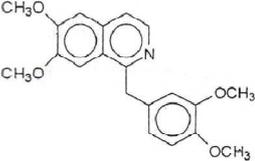
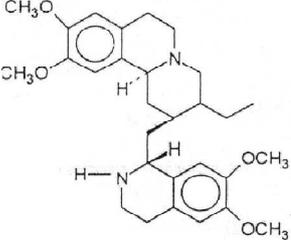
Protopinas

Pavinas,

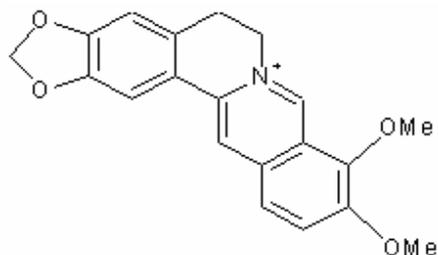
(bis) Benciltetrahidroisoquinolinas

Dímeros (bis) bencilisoquinolínicos (BBI), entre otros (22).

CUADRO N°1. ALCALOIDES Y GRUPOS A LOS QUE PERTENECEN:

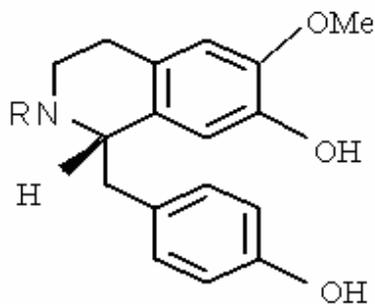
1. Pirrolidínicos	2. Derivados de la Fenilalanina
 <p data-bbox="497 607 625 636">Pilocarpina</p> <p data-bbox="336 680 788 745">Utilizada en el tratamiento del Glaucoma; disminuye la presión intraocular</p>	 <p data-bbox="1046 613 1142 642">Efedrina</p> <p data-bbox="916 687 1278 752">Vasoconstrictor, Broncodilatador Descongestionante nasal</p>
2 Derivados del Morfinano	4. Quinolínicos
<p data-bbox="379 835 395 864">1</p>  <p data-bbox="331 1122 810 1182">1) Morfina (Narcótico, hipnótico, sedante) 2) Codeína (Sedante de la tos, analgésico)</p>	<p data-bbox="695 835 711 864">2</p>   <p data-bbox="959 1099 1235 1128">Quinidina (Antidiarréico)</p>
5. Indólicos	6. Isoquinolínicos
 <p data-bbox="405 1525 719 1554">Reserpina (Antihipertensivo)</p>	 <p data-bbox="919 1525 1273 1554">Papaverina (Relajante muscular)</p>
7 Derivados del Tropano	 <p data-bbox="919 1895 1273 1955">Emetina (Emético, expectorante, amebicida)</p>

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 (30).

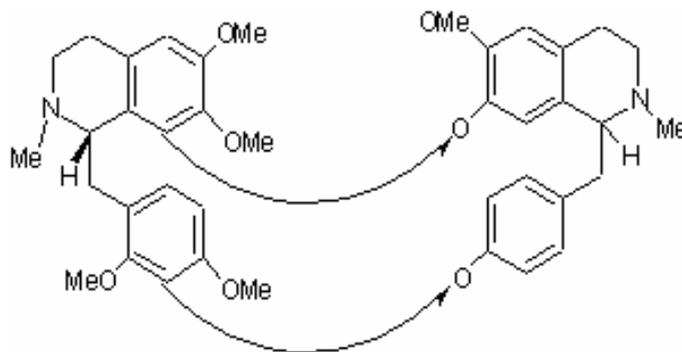


R = H,

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 (11).

En el Cuadro N° 2 se muestra una lista de las especies de *Berberis* investigadas en el mundo y los alcaloides identificados en cada una de ellas (26).

CUADRO N° 2. ALCALOIDES AISLADOS DEL GÉNERO *Berberis*

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, berbericidina, 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, berbamunina, chitralina, natalamina, natalinina, patagonina.
<i>B. virscens</i> Hook	berbamina, berberina, berberrubina, oxiacantina, palmatina.
<i>B. zebiliana</i> Schneider	berbamina, berlambina (oxiberberina).

KIRK, O., Enciclopedia de Tecnología Química, 3ra. ed., Nueva York – Estados Unidos, John Wiley, 1998, p. 230.

1.2.4 DATOS DE IDENTIFICACIÓN DE LA BERBERINA

- BERBERINA

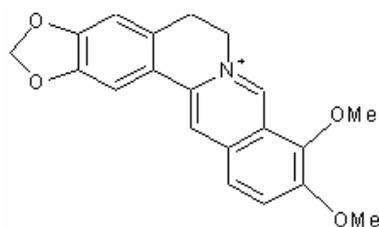
- Nombre químico (IUPAC):

9,10-Dimetoxi-5,6-dihidro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquino[3,2-a]isoquinolin-7-ilo
7,8,13,13a-Tertadehidro-9,10-dimetoxi-2,3-[metilenbis(oxi)]berbinio.(32)

▪ Sinónimos:

Rizoma de Coptis; Umbellatina; Umbellatine; Umbellatin; Thalsine; Majarine; Berbinium, 7,8,13,13a-tetradehidro-9,10-dimetoxi-2,3-(metilendioxi)-; Berberine; Berberin; 9,10-Dimetoxi-2,3-(metilendioxi)-7,8,13,13a-tetrahydroberbinio; Benzo(g)-1,3-benzodioxolo(5,6-a)quinolizinio, 5,6-dihidro-9,10-dimetoxi-; catión 5,6-dihidro-9,10-dimetoxibenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinio. (14)

▪ Estructura química:



▪ Fórmula química:

C₂₀H₁₈NO₄

▪ Peso molecular:

336.37

▪ Clasificación:

Alcaloide isoquinolínico

▪ Propiedades físicas y químicas:

Alcaloide obtenido de plantas (raíces, rizomas y corteza) de las familias Ranunculaceae y Berberidaceae, incluyendo especies de los géneros *Berberis*,

Mahonia, Coptis, Thalictrum e Hydrastis. Sólido cristalino en forma de agujas, de color amarillo. Su punto de fusión es igual a 145 °C. Es soluble en agua y etanol, pero insoluble en benceno, éter y cloroformo. Su solubilidad estimada en agua es de 0.116 mg/L a 25 °C o de 3.53×10^{-4} mg/L. Su forma aislada se presenta siempre como una sal ácida (hidrocloruro, sulfato o sulfato ácido). Frecuentemente su sal cristaliza como solvato (hidrato). (17)

- Peligrosidad

Salud (Azul)

Inflamabilidad (Rojo)

Riesgo de Explosión (Amarillo)

- Destino en el ambiente

Persistencia

Toxicidad para los organismos y el medio ambiente

Este compuesto presenta actividad bacteriostática, bactericida, fungicida, antiviral, antiprotozoaria (antimalarica) e insecticida. En diferentes tipos de microorganismos inhibe el metabolismo, la formación de endotoxinas y la adherencia que permite la colonización de la piel y las mucosas.(23)

1.3 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 (34).

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 (36).

1.3.1 ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA BERBERINA

A la 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

Además berberina posee características antimicrobianas inhibiendo el crecimiento de muchos microorganismos, incluidos hongos, protozoos y bacterias (32).

Se evaluó la actividad anti fúngica 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, oxicanina, magnoflorina y columbamina han sido objeto de estudios *in vivo* usando varios modelos de ratones, mostrando todos ellos una importante actividad

antiinflamatoria. El alcaloide berberrubina, ha exhibido una actividad antitumoral en diversos estudios. (37).

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 hallii* se encuentra dentro de las más de 30 especies de *Berberis* que carecen de estudios que permitan conocer tanto su composición química, como propiedades biológicas. (25).

La realización del estudio de *Berberis hallii* 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 ecuatorianas estudiadas. (34)

1.4 MUESTREO, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

1.4.1 MUESTREO

Se debe obtener una muestra representativa del total, para realizar el análisis y determinar los niveles de los diversos componentes de la materia vegetal, como minerales, macro y micronutrientes, o residuos de plaguicidas remanentes en los vegetales.

La correcta utilización requiere efectuar adecuadamente la toma de muestras, de modo que sea representativa del conjunto, e interpretar correctamente los análisis. El contenido de sustancias depende de factores como la edad, tipo y posición del tallo que se muestrea, la disponibilidad de nutrientes del suelo, el estado fitosanitario, etc.

No se ha obtenido inconvenientes en el muestreo por tratarse de una planta silvestre, aislada de los cultivos que requieren control fitosanitario.

También varía mucho el contenido inorgánico en las distintas partes de la planta. Para la mayoría de las plantas, los órganos más ricos en estas sustancias son los ápices, las hojas y los tallos si son fotosintéticos. Los tejidos leñosos generalmente acumulan menos elementos. Así mismo, el contenido en nutrientes es mayor en los tejidos jóvenes. También se debe tener en cuenta la fluctuación en el contenido en nutrientes que ocurre diurna, estacional, o anualmente. (8)

Como norma general, no deben recogerse las plantas con el tiempo húmedo. Los instrumentos que se utilizan para la toma de muestras deben estar libres de contaminantes de plaguicidas. Se deben utilizar envases nuevos y en perfecto estado de limpieza. Las muestras deben de transportarse refrigeradas y mantenerse así hasta que se realice el análisis.

1.4.2 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN.

Para el transporte y almacén, la muestra se mantendrá en las condiciones más parecidas a las de campo.

Pueden ser refrigeradas, conservadas en bolsas de papel o de plástico, pero en éstas el tiempo de permanencia ha de ser el mínimo posible, ya que las reacciones enzimáticas pueden llevar a cambios en la estructura química. (8)

1.4.3 LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN:

La descontaminación es necesaria para eliminar sustancias no nativas si se determina que el tejido está cubierto de polvo o de materiales de fumigación. Existen muchas fuentes de contaminación en el campo que incluyen:

- Arrastre de fertilizantes por el viento.
- Excrementos de animales (dan lugar a contenidos muy elevados en N y P)
- Contaminación de metales por estructuras cercanas, tipo vallado, cables, etc.
- Herramientas y contenedores metálicos oxidados.

Se deben enjuagar las muestras suavemente para quitar las partículas de la superficie de las hojas. No deben lavarse demasiado, pues algunos nutrientes solubles podrían perderse. Las muestras han de secarse suavemente con un trapo o papel. (10)

1.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

“El Tamizaje Fitoquímico o “screening” fitoquímico Es la etapa inicial de la investigación para determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí realizar la extracción para el aislamiento de los grupos de mayor interés, utilizando los solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. (50)

Consiste en la extracción de la planta *Berberis hallii* con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración; debe permitir la evaluación rápida con reacciones

sensibles, reproducibles y de bajo costo, los resultados del mismo constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse.

Diversos métodos de tamizaje fitoquímico están descritos. Algunos evalúan pocos grupos de sustancias, en compensación otros evalúan la presencia de compuestos de poco interés como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos.(52)

La cantidad de material vegetal necesario para hacer las pruebas varía de 5 g a 200 g.

Se puede determinar la presencia de los principales grupos de compuestos químicos, tanto libres, como en forma de glicósidos.

Comprende los siguientes ensayos: Dragendorff, Wagner, Mayer, Lieberman-Buchard, Borntrager, Baljet, Sudan III, Catequinas, Espuma, Benedict, Ninhidrina, Shinoda, Antocianidinas, Fehling; los mismos que se aplican a la raíz de *Berberis hallii*; para aislar los grupos de mayor interés”. (8)

1.5.1 EXTRACCIÓN DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES

La Materia Prima Vegetal se define como la planta fresca , droga vegetal o preparado fitoterapéutico empleado en la investigación; la planta fresca *Berberis hallii*, después del proceso de la recolección, secado, estabilización y conservación y el preparado como producto triturado, pulverizado, extracto, tintura, aceite fijo o volátil, cera, jugo y otros obtenidos de las plantas frescas o de las drogas vegetales, a través de operaciones de extracción, fraccionamiento, concentración y purificación.

En la industria se utiliza preferencialmente como materia prima, el material vegetal seco, una vez que este material se sometió a procesos de secamiento y estabilización. El secado del material en cuestión interrumpe los procesos enzimáticos en las células vegetales e impide el crecimiento de microorganismos, facilitando el almacenamiento y transporte de este material sin los riesgos de deterioro.

Pocas son las plantas medicinales que son procesadas frescas: una de las excepciones es la alcachofa (*Cynara scolymus*), y en esta investigación *Berberis hallii*; debido a que los procesos de secado dan como resultado un producto final con contenidos inferiores de principios activos. (10)

1.5.1.1 Maceración:

La maceración es precedida de la selección de la materia prima para aislar las impurezas. Se separa manualmente los materiales extraños como pedazos de madera, metal, o materiales de otra naturaleza. Poner en contacto la droga con el solvente, durante varios días con agitación ocasional.(1)

La maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente durante varios días. El resultado es un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente dependiendo de la naturaleza, humedad y factores relacionados con el solvente como selectividad y cantidad. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación droga/solvente aumenta. El hinchamiento de la droga es importante porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y difusión del solvente. La velocidad con que se obtiene el equilibrio está en función del tamaño de partícula de la droga; así como del grado de hinchamiento de las células y de las propiedades del solvente; como por ejemplo su viscosidad y polaridad (11)

1.5.1.2 Extracción:

“Abarca la obtención del extracto bruto, que contiene además de la totalidad de los alcaloides presentes en la planta, impurezas, entre las cuales están grasas y ceras vegetales, resinas, colorantes, taninos, y sales de ácidos orgánicos Para la purificación del extracto bruto es necesario el uso de solventes inmiscibles y variaciones de pH, lo que conlleva a la separación de la fracción alcaloidal bruta, también llamada de base libre. El aislamiento del alcaloide libre generalmente ocurre por cristalizaciones sucesivas.

La eficiencia del proceso extractivo sería mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas, ya que así se obtiene una mayor área de contacto con el solvente”.(11)

1.5.1.3 Agitación

La eficiencia del proceso extractivo es función del equilibrio de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado.

1.5.1.4 Temperatura

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura; de la misma manera que la agitación; la temperatura contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruídos, total o parcialmente a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles, como aceites esenciales. (44)

1.5.1.5 pH

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales. La obtención de alcaloides constituye un ejemplo clásico de la influencia del pH en el proceso de extracción. La extracción de alcaloides con solventes orgánicos de baja polaridad exige un pre tratamiento con soluciones alcalinas buscando con esto liberar los alcaloides de sus sales y así volverlos solubles en el solvente orgánico. En el caso de extracción de alcaloides con soluciones acuosas es necesario un pH ácido, buscando con esto la conversión de los alcaloides en sus respectivas sales, solubles en agua.(11)

1.5.1.6 Naturaleza del solvente

Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae selectivamente o no, cierta clase de compuestos. Entre los solventes generales, los más utilizados son los alcoholes alifáticos de hasta 3 Carbonos o mezclas de estos con el H₂O. Estos solventes logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés como los alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos y terpenos. Debido a su poder extractivo estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente la droga.(30)

El alcohol etílico y sus mezclas con H₂O es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas. Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar una mezcla de alcohol: agua 7:3 ó 8:2 para la extracción de las partes leñosas de la planta; raíces y semillas, mientras la proporción de 1:1 es recomendada para extraer las hojas o las partes aéreas verdes, ya que en esta concentración se evita la extracción de la clorofila y de las sustancias polimerizadas o resinoides que, generalmente, no presentan

actividad terapéutica pero complican las siguientes etapas de purificación, por el hecho de presentar precipitados vacíos.

1.5.1.7 Tiempo de Extracción

El tiempo de extracción se determina experimentalmente en función del solvente. Esta variable es el resultado de todos los factores mencionados previamente. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario, no influye en el proceso negativamente, pero sí influye en los costos. (11).

1.6 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

1.6.1 CONCEPTO DE CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor). (13)

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido.

Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía. (13)

1.6.2 CONCEPTO DE R_f.

R_f es el registro y se define como:

R_f = distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente. (15)

El valor de R_f depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.). Tiene una reproducibilidad de $\pm 20\%$, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa.(14)

1.6.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.(CC_f o TLC)

En este caso se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo “manchas” de los componentes. (42)

Se usan láminas de: vidrio como soporte del adsorbente, plástico (ejm: acetato) ó metálicos

(ejm: aluminio). Los tamaños de la placa para CC_f convencional son: 20 x 20; 10 x 20 y 5 x 2 cm.

Hay placas que contienen un indicador de fluorescencia, para facilitar la identificación de

las muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos se requerirán técnicas de revelado.(14)

1.6.3.1 Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina.

- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido acético
- Ciclohexano
- Cloroformo
- Diclorometano
- Dietil-éter, t-butil-éter
- Etanol
- Éter de petróleo
- Éter dietílico
- Iso-propanol
- Metanol
- N-pentano, n-hexano
- Tetracloruro de carbono
- Tolueno

1.6.3.2 Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante:

- Luz UV: si la sustancia absorbe luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (F254 ó F366), el número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado.
- La introducción de la placa en vapores de yodo.
- El rocío con una solución de agua/H₂SO₄ 1:1 (dentro de un compartimiento especialmente protegido y bajo una campana de extracción de gases).
- Después calentar intensamente, por ejemplo, con un mechero hasta carbonizar los compuestos.(15)

1.6.3.3 Adsorbentes más comunes para Cromatografía en Capa Fina.

- Silica gel (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- Óxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica)
- Celulosa (Nativa o micro-cristalina)
- Poliamidas
- Para la selección del adsorbentes deber tomar las siguientes consideraciones:
- Polaridad
- Tamaño de partícula
 - *Diámetro*
 - *Área Superficial*
- Homogeneidad
- Pureza

1.6.4 Factores que influyen en una separación por Cromatografía de Capa Fina.

- Temperatura: a menor temperatura las sustancias se adsorben más en la fase estacionaria.
- La cromatografía debe llevarse a cabo en un área sin corrientes de aire.
- Limpieza de las placas. Muchas placas están contaminadas con grasa o agentes plastificantes o adhesivos. Para el trabajo a pequeña escala, éstas deben limpiarse corriendo primero una mezcla de cloroformo y metanol y después dejar
- secar completamente antes de aplicar la muestra.
- Pureza de los disolventes.(13)

1.7 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

1.7.1 ESPECTROMETRÍA

La espectroscopia surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda (λ). En un principio se refería al uso de la luz visible dispersada según su longitud de onda, por ejemplo por un prisma. Más tarde el concepto se amplió enormemente para comprender cualquier medida en función de la longitud de onda o de la frecuencia. Por tanto, la espectroscopia puede referirse a interacciones con partículas de radiación o a una respuesta a un campo alternante o frecuencia variante (ν). Una extensión adicional del alcance de la definición añadió la energía (E) como variable, al establecerse la relación $E=h\nu$ para los fotones. Un gráfico de la respuesta como función de la longitud de onda (o más comúnmente la frecuencia) se conoce como espectro.(20)

La espectrometría es la técnica espectroscópica para tasar la concentración o la cantidad de especies determinadas. En estos casos, el instrumento que realiza tales medidas es un espectrómetro o espectrógrafo. La espectrometría a menudo se usa analíticamente para la identificación de sustancias mediante el espectro emitido o absorbido por las mismas. (5)

1.7.2 ESPECTROMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano). En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas.

Esta técnica es complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que trata con transiciones desde el estado excitado al estado basal, mientras que la espectrometría de absorción mide transiciones desde el estado basal al estado excitado. (20).

1.7.3 APLICACIONES

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

- Soluciones de iones metálicos de transición: Pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos.
- Compuestos orgánicos: Especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico. La tirosina, por ejemplo, aumenta su máximo de absorción y su coeficiente de extinción molar cuando aumenta el pH de 6 a 13, o cuando disminuye la polaridad de los disolventes.(52)

Aunque los complejos de transferencia de carga también dan lugar a colores, éstos son a menudo demasiado intensos para ser usados en mediciones cuantitativas.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. Es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias (las tablas de coeficientes de extinción molar) o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración.(20)

1.7.4 ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible se llama espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I₀). La relación I / I₀ se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T).

La absorbancia (A) se basa en la transmisión:

$$A = - \log (\%T)$$

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de luz (a menudo una bombilla incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz, y un detector. El detector suele ser un fotodiodo o un CCD. Los fotodiodos se usan con monocromadores, que filtran la luz de modo que una sola longitud de onda alcanza el detector. Las rejillas

de difracción se utilizan con CCDs, que recogen la luz de diferentes longitudes de onda en píxeles.

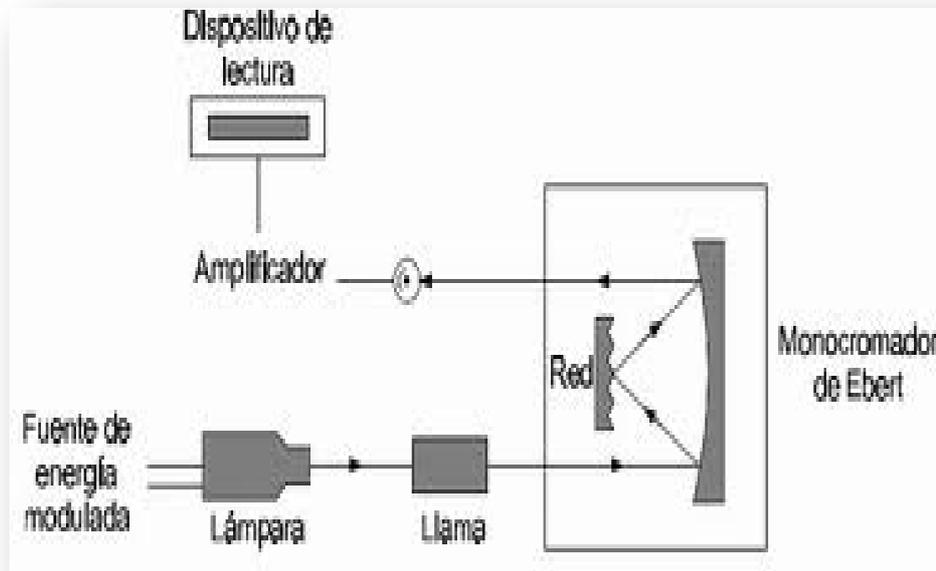


GRÁFICO N° 6 : Partes de un Espectrofotómetro

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras suelen ser colocadas en una célula transparente, conocida como cubeta. Las cubetas suelen ser rectangulares, con una anchura interior de 1 cm. Esta anchura se convierte en la longitud de ruta, L , en la Ley de Beer-Lambert. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque son comunes las de vidrio o plástico. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles.(33)

1.7.5 ESPECTRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Un espectro ultravioleta-visible es esencialmente un gráfico de absorbancia de luz frente a una longitud de onda en el rango del ultravioleta o la luz visible. Este espectro puede ser producido directamente con los espectrofotómetros más sofisticados, o bien pueden registrarse los datos de una sola longitud de onda con los instrumentos más simples. La longitud de onda se representa con el símbolo λ .

Del mismo modo, para una determinada sustancia, puede hacerse un gráfico estándar del coeficiente de extinción (ϵ) frente a la longitud de onda (λ). Este gráfico estándar sería efectivamente "la concentración corregida" y, por tanto, independiente de la concentración.

Para una sustancia determinada, la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se llama λ_{max} , y se pronuncia "lambda-max". (33)

1.7.6 Reglas de Woodward-Fieser

Las reglas de Woodward-Fieser son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir λ_{max} , la longitud de onda de la absorción UV-Vis, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas. Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Vis no es, sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado. La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos, así como las variaciones en la anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.(16)

Ver Anexo N°. 4 (Tablas de Woodward- Fieser).

CAPITULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias; de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 RECURSOS MATERIALES

2.2.1 MATERIA PRIMA

- *Berberis hallii* (Carrasquilla)
- Raíces
- Corteza

Se adquirió la materia prima procedente del sector la Josefina San Isidro del Cantón Guano provincia de Chimborazo.” en las siguientes coordenadas 857707,3917054 a una altura de 3123 m.s.n.m de lo cual se tomo las raíces para realizar la investigación

2.2.2 EQUIPOS

N°	Equipo	Descripción
1	Balanza Analítica	Boeco Germany
2	Bomba de vacío	Vacum Pressure Pump 115 VAC-60Hz
3	Cámara Digital	
4	Cámara UV	Chromato-VUE Model CC-20
5	Centrífuga	Dynac CA
6	Desecador	
7	Equipo de Revelado Cromatográfico	Atomizador Bomba de vacío
8	Espectrofotómetro	UV 1603 Shimadzu
9	Estufas de secado y esterilización	Memmert Fanem 315
10	Mufla	Ivymem Optic System
11	pH metro	
12	Refractómetro	Abbé
13	Refrigerador	
14	Rotavapor	Büchi R 110
15	Sorbona	

2.2.3 MATERIALES DE LABORATORIO

Nº	Materiales	Cantidad
1	Balón esmerilado sin base de 250 mL	1
2	Balón esmerilado sin base de 500 mL	1
3	Cápsulas de porcelana	2
4	Corcho	1
5	Crisol	1
6	Cuba de vidrio	2
7	Émbolo de succión	2
8	Embudo de Filtración	1
9	Embudo de separación de 250 mL	1
10	Envases de vidrio transparentes de 750 mL	5
11	Estiletes	2
12	Galones negros de 8 L	2
13	Gradilla para Tubos de Ensayo	2
14	Guantes de manejo descartables	1Caja de 50 unidades
15	Guantes de Nitrilo descartables	1 Docena
16	Guantes para recolección del arbusto	2 pares
17	Libreta de apuntes	1
18	Mangueras	3

19	Mascarillas	1 Docena
20	Matraz Erlenmeyer de 250 mL	1
21	Olla pequeña	2
22	Papel Filtro	1 pliego
23	Papel Negro	1 pliego
24	Papel Toalla	1 Rollo
25	Paquetes pequeños de gasa	5
26	Pera de succión	1
27	Picnómetro 10 mL	1
28	Pinza de cápsula	1
29	Pipeta graduada de 1 mL	1
30	Pipeta graduada de 10 mL	2
31	Pipeta graduada de 5 mL	1
32	Pipeta Pasteur	2
33	Pipeta volumétrica de 1 mL	1
34	Pipeta volumétrica de 10 mL	1
35	Piseta	1
36	Placas Cromatográficas 10*4 cm	50 unidades
37	Placas Cromatográficas Preparativas 10*20 cm	25 unidades
38	Probeta de 100 mL	1
39	Probeta de 500 mL	1
40	Regla metálica de 20 cm	1

41	Reverbero eléctrico	1
42	Rollo de Papel Aluminio	1
43	Saquillos de Nylon	3
44	Sierras	2
45	Tijeras	2
46	Trípode	1
47	Tubos de Ensayo	15
48	Varilla de Agitación	1
49	Vaso de Precipitación de 100 mL	3
50	Vaso de Precipitación de 250 mL	2
51	Vaso de Precipitación de 500 mL	2

2.2.4 REACTIVOS

N°	Materiales	Cantidad
1	Ácido acético glacial	200 mL
2	Ácido Clorhídrico concentrado	5 mL
3	Ácido fórmico	1 mL
4	Ácido sulfúrico 0.1 M	10 mL
5	Agua destilada	
6	Alcohol Potable 96%	8 L
7	Börntrager	1 mL

8	Cloroformo	1200 mL
9	Cloruro Férrico	1 mL
10	Dietilamina	1 mL
11	Etil acetato	2 mL
12	Iodo en granallas	3 g
13	Propanol	9 mL
14	Reactivo Baljet	1 mL
15	Reactivo de Dragendorff	10 mL
16	Reactivo de Fehling	2 mL
17	Reactivo de Lieberman-Buchard	2 mL
18	Reactivo de Wagner	2 mL
19	Sudan III	1 mL
20	Tolueno	10 mL
21	Cloruro de Sodio	1 g
22	Amoníaco	100 mL
23	Magnesio en granallas	0.5 g

2.3 FACTORES DE ESTUDIO

Los factores de estudio de esta investigación fueron:

- Alcaloides presentes en la raíz de *B. hallii*.
- Análisis espectrofotométrico de los alcaloides aislados.
- Se utilizaron las cortezas y raíces de *Berberis hallii*.

2.4 UNIDAD EXPERIMENTAL O DE ANÁLISIS

- Se utilizaron las Cortezas y Raíces de *B. hallii*.

CUADRO N° 3. PLANTA, LUGAR DE PROCEDENCIA, SUSTANCIAS A IDENTIFICARSE

Planta	Lugar de Procedencia	Sustancias a identificarse
<i>Berberis hallii</i> “Carraquilla”	Sector La Josefina San Isidro del Cantón Guano provincia de Chimborazo	Metabolitos secundarios (alcaloides)

Fuente: Carolina Silva Ponce

2.5 METODOLOGÍA

2.5.1 OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Las raíces y cortezas del arbusto *Berberis hallii* fueron recolectadas en el Sector La Josefina San Isidro del Cantón Guano provincia de Chimborazo el 7 de Mayo del 2010.

2.5.2. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La identificación taxonómica y una muestra del material vegetal fueron realizados por el Ing. Jorge Caranqui; curador del herbario de la ESPOCH quien certificó el ejemplar.

Se procedió a obtener la materia prima, mediante las técnicas artesanales de recolección considerando que el arbusto se encuentra en la etapa adecuada de cosecha entre los meses de Enero-Mayo; realizándose la recolección en este período.

2.5.2.1 Muestreo:

Obtención de una muestra representativa del total, para el análisis. Efectuando adecuadamente la toma de muestras, de modo que fueron representativas del conjunto, El contenido de sustancias depende de factores como la edad, tipo y posición del tallo que se muestrea, la disponibilidad de nutrientes del suelo, el estado fitosanitario.

2.5.2.2 Recolección:

Se realizó en la época en la cual la planta posee el contenido máximo de sus principios activos.

2.5.2.3 Conservación

Las muestras se mantuvieron refrigeradas, conservadas en saquillos de nylon.

2.5.2.4 Limpieza y descontaminación:

La descontaminación es necesaria para eliminar sustancias extrañas que interfieren con el análisis, fue necesario

Enjuagar las muestras suavemente para quitar las partículas de la superficie de las raíces.

No deben lavarse demasiado, pues algunos nutrientes solubles podrían perderse.

Una vez realizados los pasos anteriores se procedió a separar las cortezas exteriores que recubren la raíz para obtener un extracto libre de clorofila. Por consiguiente pesó las cortezas y raíces

2.5.3 EXTRACCIÓN DE LA PLANTA FRESCA POR MACERACIÓN

- Pesarse una muestra del vegetal fresco para determinar el residuo seco (3 g).
- Dividir en fragmentos suficientemente reducidos.
- Secar en la estufa a una temperatura de 50 °C hasta peso constante.
- Calcular el porcentaje de Residuo seco. Para calcular la cantidad de alcohol que se debe utilizar fue recomendable utilizar el Cuadro N° 4

CUADRO N° 4: ALCOHOL QUE SE DEBE UTILIZA RESPECTO AL RESIDUO SECO

Residuo seco	Alcohol que se debe utilizar
25 %	90-99 %
30-35%	80 %
40-50%	70 %

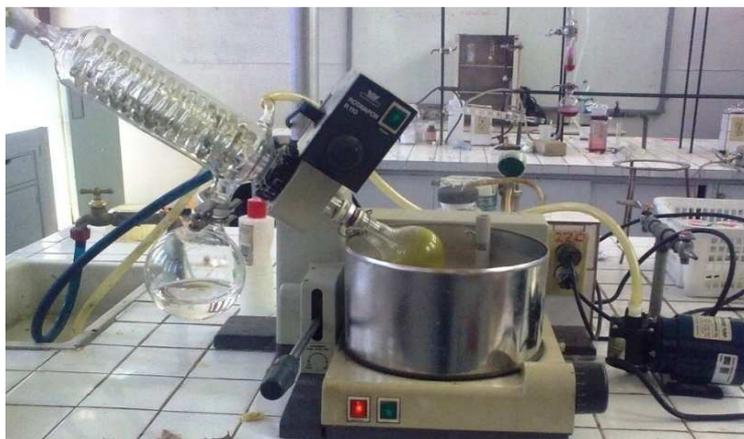
Fuente: HAMMERSLAG, F., The Technology and Chemistry of Alkaloids, 2da. ed., Santiago de Chile - Chile, Hochstetter, 2008, p. 76

2.5.4 MACERACIÓN

- En 2 envases negros con capacidad de 15 L se colocó 8 L de Alcohol potable EtOH 96%, distribuyendo en cada uno respectivamente 4L de EtOH 96%.
- Envase 1: Poner en contacto las raíces (sin corteza) con el solvente Alcohol potable EtOH 96%, durante 48 hrs con agitación ocasional.
- Envase 2: Poner en contacto las cortezas con el solvente Alcohol potable EtOH 96%, durante 48 hrs con agitación ocasional.
- Mantener a Temperatura inferior a 35 °C. (9)

2.5.5 EXTRACCIÓN

- Se filtra el contenido de los envases 1 y 2.
Contenido envase 1: 1439 .04 g
Contenido envase 2: 1918.72 g
- El extracto se concentró a presión reducida en el rotavapor a 70°C, durante 10 min.
(Fotografía No 6)
Total de extracto etanólico envase 1 (raíces): 253.63 g
Total de extracto etanólico envase 2 (cortezas): 452.69 g

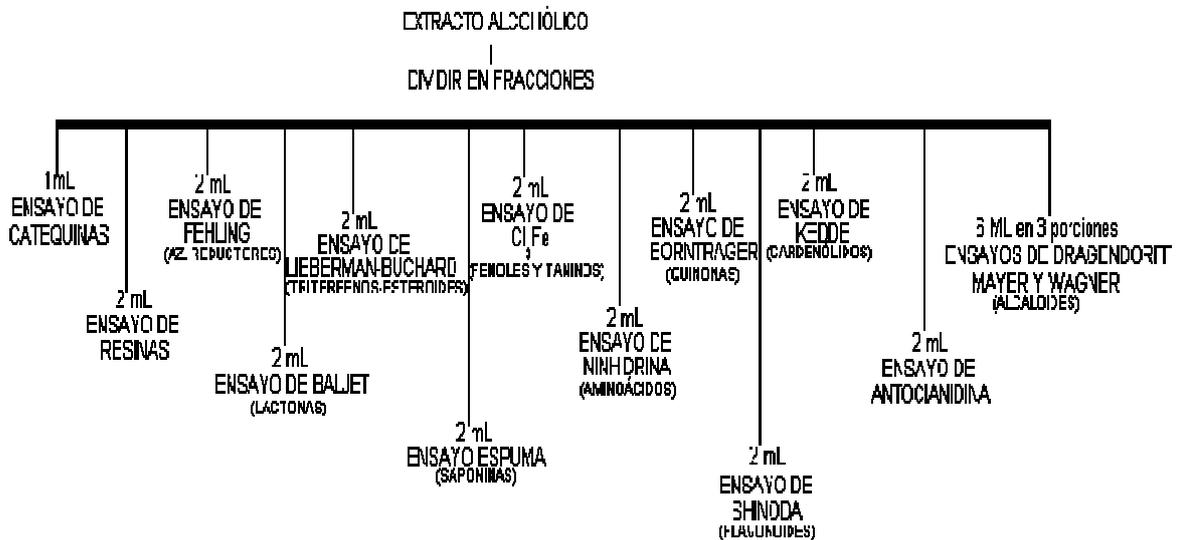


FOTOGRAFÍA No. 6 Extracto Alcohólico

- Una vez obtenidos los 2 extractos concentrados se procedió a utilizar el extracto etanólico libre de clorofila la cual interfiere y en los posteriores análisis cromatográficos así como también en las determinaciones espectrofotométricas.

2.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

CUADRO No 5: ANÁLISIS FISICO QUIMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO ETANÓLICO.



Es la etapa primordial para determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en *B. hallii* y a partir de allí realizar la extracción para el aislamiento de los grupos de mayor interés, utilizando los solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. (24)

2.6.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF.

Para el ensayo, a la solución se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa:

- Opalescencia : (+)

- Turbidez definida : (++)
- Precipitado : (+++)

2.6.2 ENSAYO DE WAGNER:

Adicionar 2 ó 3 gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma:

- Opalescencia : (+)
- Turbidez definida : (++)
- Precipitado : (+++)

2.6.3 ENSAYO DE MAYER:

Se adiciona 2 ó 3 gotas del reactivo de Mayer y se reporta los resultados.

- Opalescencia : (+)
- Turbidez definida : (++)
- Precipitado : (+++)

2.6.4 ENSAYO DE LIEBERMAN-BÜCHARD.

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esferoides, en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

Rosado-azul muy rápido. Verde intenso-visible aunque rápido.

Verde oscuro-negro-final de la reacción.

Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes. (27)

2.6.5 ENSAYO DE BÖRNTRAGER.

Para detectar la presencia de quinonas.

Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo.

Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.

Ensayo positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) . O rojo para lo cual se reporta (+++).

2.6.6 ENSAYO DE BALJET.

Para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo (-H- y +++) respectivamente. (13)

2.6.7 ENSAYO DE SUDAN III.

Permite conocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, cuando un extracto etéreo se evapora a sequedad en presencia de una solución de Sudan 111 al 0.6 % en glicerina- agua (1:1).

La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro, indica la presencia de Lípidos y/o Aceites Esenciales.

2.6.8 ENSAYO DE CATEQUINAS.

Para ello, tomar de la solución .alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de Carbonato de Sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica positiva la prueba.

2.6.9 ENSAYO DE RESINAS.

Para detectar este tipo de compuesto, adicionar a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

2.6.10 ENSAYO DE ESPUMA.

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se

diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y es persistente por más de 2 minutos.

2.6.11 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO.

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general. (24).

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

2.6.12 ENSAYO DE NINHIDRINA.

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. A la fracción disuelta en 1 mL de Etanol se le adiciona 1 mL de solución de Ninhidrina al 5%. Se calienta en baño de agua de 5 a 10 minutos. Si aparece una coloración azul o violeta el ensayo es positivo.

2.6.13 ENSAYO DE SHINODA.

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos. (27)

2.6.14 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS.

Permite conocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃- Q del grupo de los flavonoides.

Se calienta 2 ml, del extracto etanólico por 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Dejar enfriar y luego adicionar 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Agitar y dejar separar las 2 fases.

La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, indica ensayo positivo.

2.6.15 ENSAYO DE FEHLING:

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del

reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. (24)

2.7 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE EXTRACTOS

Permite establecer la calidad de los extractos obtenidos a partir de drogas crudas; así como controlar su estabilidad. (46)

2.7.1 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS.

Determinación de olor: Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

Determinación del color: Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas. Se informa los resultados. (18).

2.7.2 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA.

Se entiende por densidad relativa a la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Materiales y reactivos.

- Picnómetro de al menos 10 mL de capacidad.

- Balanza analítica v D 0.1 mg LSP 200 g.

Procedimiento.

Primero pésese el picnómetro vacío y seco a 2 °C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 min., y ajústese el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso y secar exteriormente el picnómetro. (18)

Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25 °C, después de limpio el picnómetro.

Expresión de los resultados.

La densidad relativa a 25 °C se calcula por la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

M₁ = peso del picnómetro con la muestra (g)

M₂ = peso del picnómetro con el agua (g)

M = peso del picnómetro vacío (g)

Los resultados se aproximan hasta la tercera cifra.

2.7.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Esta relación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\sin i / \sin r = n$$

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

Materiales y reactivos.

- Refractómetro de Abobé
- Varilla de vidrio
- Solución mezcla de alcohol etílico-éter di etílico (1:1) para la limpieza del equipo.

Procedimiento.

Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termo prisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

Expresión de los resultados.

Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002

Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la fórmula siguiente:

$$N_d^{25} = N_d + 0.00044 (t - 25)$$

Donde: N_d^{25} = índice de refracción

N_d^t = valor leído en la escala del aparato a la temperatura t.

t = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 = factor de corrección por grado Celsius. Los valores se aproximan hasta las milésimas.

2.7.4 DETERMINACIÓN DEL pH DE EXTRACTOS

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógeno. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$pH = -\log \alpha [H^+]$$

$\alpha [H^+] =$ actividad de los iones hidrógeno

En la práctica, la medición de pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea digital o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo. (46)

Materiales y reactivos.

- Medidor del pH con electrodo de vidrio combinado.
- Solución reguladora de pH, para rango de 0 - 7, preparada de la siguiente forma: 2.5

g de Bitartrato de potasio para 250 mL de agua (pH=3.5).

Procedimiento.

Ajuste el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.

Los resultados se darán apreciando hasta la décima.

2.7.5 DETERMINACIÓN DE LOS SÓLIDOS TOTALES.

La determinación de la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor, mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en estufa, hasta masa constante, se le asigna como sólidos totales. (46)

Materiales y Reactivos.

- Cápsula de porcelana, platino o cristal.
- Baño de agua
- Balanza analítica
- Desecadora conteniendo sílica gel
- Estufa con temperatura controlada (105 ± 2 °C)
- Pipeta aforada de 5 mL.

Procedimiento.

5.0 mL del producto se llevan a una cápsula previamente tarada a 105 °C, se evapora sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco. Se pasa entonces hacia una estufa y se deja hasta peso constante (aproximadamente 3 h). Se retira la cápsula de la estufa y se coloca en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente.

Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos.

Expresión de los resultados.

La cantidad de sólidos totales, expresado en %, R, se calcula por la siguiente fórmula:

$$St = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

Donde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo

P = masa de la cápsula vacía

V = volumen de la porción de ensayo

100 = factor matemático para el cálculo

Observación: En caso de aceites esenciales se denomina como residuo de evaporación (R).

2.7.6 ANÁLISIS CAPILAR

Este método se basa en los fenómenos de absorción y de repartición de sustancias en materiales colorantes a través de los espacios capilares del material inerte que constituye el papel filtro. (50).

Materiales y Reactivos.

- Beaker Pirex de 100 mL de aproximadamente 5 cm de diámetro 70 cm de alto.
- Bandas de papel de filtro de 4 cm x 20 cm.
- Cámara protectora de luz.

- probeta o copa graduada de 25 mL.
- Lámpara de luz UV de 366 nm.

Procedimiento.

Se tienen 20 mL de la muestra o de la disolución de la muestra en un beaker de 100 mL, colóquelo en la cámara protectora. Coloque una banda de papel de filtro verticalmente de manera que su extremidad inferior esté sumergida dentro de la muestra, pero sin tocar el fondo ni las paredes del recipiente.

Cierre la cámara y deje transcurrir 2 horas, al cabo de este tiempo se retirará el papel y se deja secar. Una vez seco se procederá a su inspección visual y caracterización. (46)

Para la interpretación de la imagen se tienen en cuenta los aspectos siguientes:

- Color
- Altura
- Descripción de las diferentes partes
- Cambios de coloración con vapores de amoníaco
- Examen bajo la luz ultravioleta.
- Color: el color de la imagen se define en su conjunto inicialmente como:

1. Vivamente coloreado
2. Poco coloreado
3. Muy poco coloreado

En dependencia de la tonalidad que predomine en toda la imagen se detallan los colores característicos de todas las zonas.

Altura: La altura de una imagen capilar se determina midiendo con una regla graduada en cm, del borde inferior del papel a la franja, siendo esta inversamente proporcional al grado alcohólico de la muestra. La altura promedio de una

imagen capilar es de 8 cm aproximadamente, de ahí que se pueden clasificar las imágenes en:

- Altas (de 8 cm en adelante)
- Medianas (entre 5 y 8 cm)
- Pequeñas (menos de 5 cm)
- En el análisis de la imagen se pueden distinguir 4 zonas:
- Franja: límite superior de la ascensión del líquido
- Sub-franja: región generalmente poco coloreada, comprendida entre la franja y la zona superior de la banda.
- Banda: zona generalmente pigmentada debido a la presencia de sustancias coloreadas.
- Sub-banda: situada debajo de la banda hasta el límite de inmersión.

Una de las zonas de mayor interés es la franja, que ésta puede ser o no traslúcida, lo que denotará la presencia de resinas o aceites esenciales y grasas.

También se debe observar la forma que la franja adopta, dentro de ellas tenemos:

1. Lineal
2. Festonada
3. Dentada
4. Profunda dentada.

2.8 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA

2.8.1. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES:

Se denominan cenizas totales al residuo inorgánico que se obtiene al incinerar una droga, fundamentalmente en su determinación gravimétrica.

Materiales y Reactivos.

- Crisol de porcelana o platino
- Acido clorhídrico al 10%
- Trípode
- Agua destilada
- Triángulo de porcelana
- Papel filtro libre de cenizas
- Mechero
- Ácido nítrico
- Mufla
- Desecadora
- Solución de nitrato de amonio 10 g/100 mL.
- Peróxido de Hidrógeno concentrado

Procedimiento.

Se determina la masa de no menos de 2 g ni más de 3 g de la porción de ensayo pulverizada y tamizada con un a desviación permisible de 0.5 mg en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado. Caliente suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incinere en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante 2 horas.

Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5 mg por a (masa constante).

Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco. (46)

Expresión de los resultados.

$$C = (M_2 - M) / (M_1 - M) * 100$$

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

2.8.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.

Los límites de agua establecidos en las farmacopeas oscilan entre 8 y 14% con pocas excepciones. Los dos métodos más usados para determinar el contenido de agua en las drogas vegetales son el gravimétrico y el azeotrópico. El método gravimétrico es el más fácil, pero no es aplicable a drogas que contengan sustancias volátiles. El método

azeotrópico requiere de un equipo especial, lo cual comparativamente dificulta su uso, pero es aplicable a drogas que contengan sustancias volátiles.

Pérdidas por Dsecación: Método Gravimétrico

Se basa en la determinación gravimétrica en masa que muestra una droga después de ser desecada en la estufa

Materiales y Equipos:

- Balanza Analítica
- Cápsula de porcelana
- Estufa u horno de calentamiento
- Desecadora

Procedimiento:

De la muestra de laboratorio, con el grado de trituración que determine la norma específica, se pesan 2g con desviación permisible de 0.5 mg y se transfieren a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105°C hasta masa constante; seguidamente se deseca a 105 °C durante 3h. La cápsula se coloca en la desecadora donde se deja enfriar a temperatura ambiente \ se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 hora, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante.

Expresión de los resultados:

$$\text{Hg} = \frac{(M_2 - M_1)}{(M_2 - M)} * 100$$

Hg = pérdida en peso por desecación (%)

M2 = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M 1 = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía

1 00 = factor matemático.

Los resultados se aproximan a las décimas

2.9 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

La extracción abarca la obtención del extracto bruto, que contiene además de la totalidad de los alcaloides presentes en la planta, impurezas entre las cuales se citan grasas, ceras vegetales, resinas, colorantes, taninos, y sales de ácidos orgánicos como el ácido oxálico.

Para la purificación del extracto bruto es necesarios el uso de solventes inmiscibles y variaciones de pH lo que conlleva a la separación de la fracción alcaloidal bruta, también llamada "base libre". (32)

El aislamiento del alcaloide de su base libre generalmente ocurre por cristalizaciones sucesivas.

La extracción de la droga vegetal se realiza con solventes orgánicos o con soluciones acuosas de ácidos o de sales de reacción ácida de bases libres. El segundo caso indica que son extraídos en forma de sus sales. (3)

La extracción y purificación suele hacerse en base a la basicidad. El método más común de extracción y purificación de alcaloides es la utilización de un sistema de ácidos o bases en el cual los alcaloides son extraídos con soluciones, 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 (32).

En un embudo de separación a 20 mL del extracto etanólico (149.9 g) se agregaron 15 mL de Tolueno; obteniéndose 2 fracciones:

- Fracción 1: Extracto etanólico EtOH
- Fracción 2: Sub-terpenos

A la fracción 1 se le agregan 15 mL de Cloroformo HCCl_3 ; obteniéndose la fracción 3.

- Fracción 3: Cloroformo HCCl_3

A la fracción 1 EtOH se le agrega 15 mL de Amoníaco NH_3 , y se obtienen las fracciones 4 y 5.

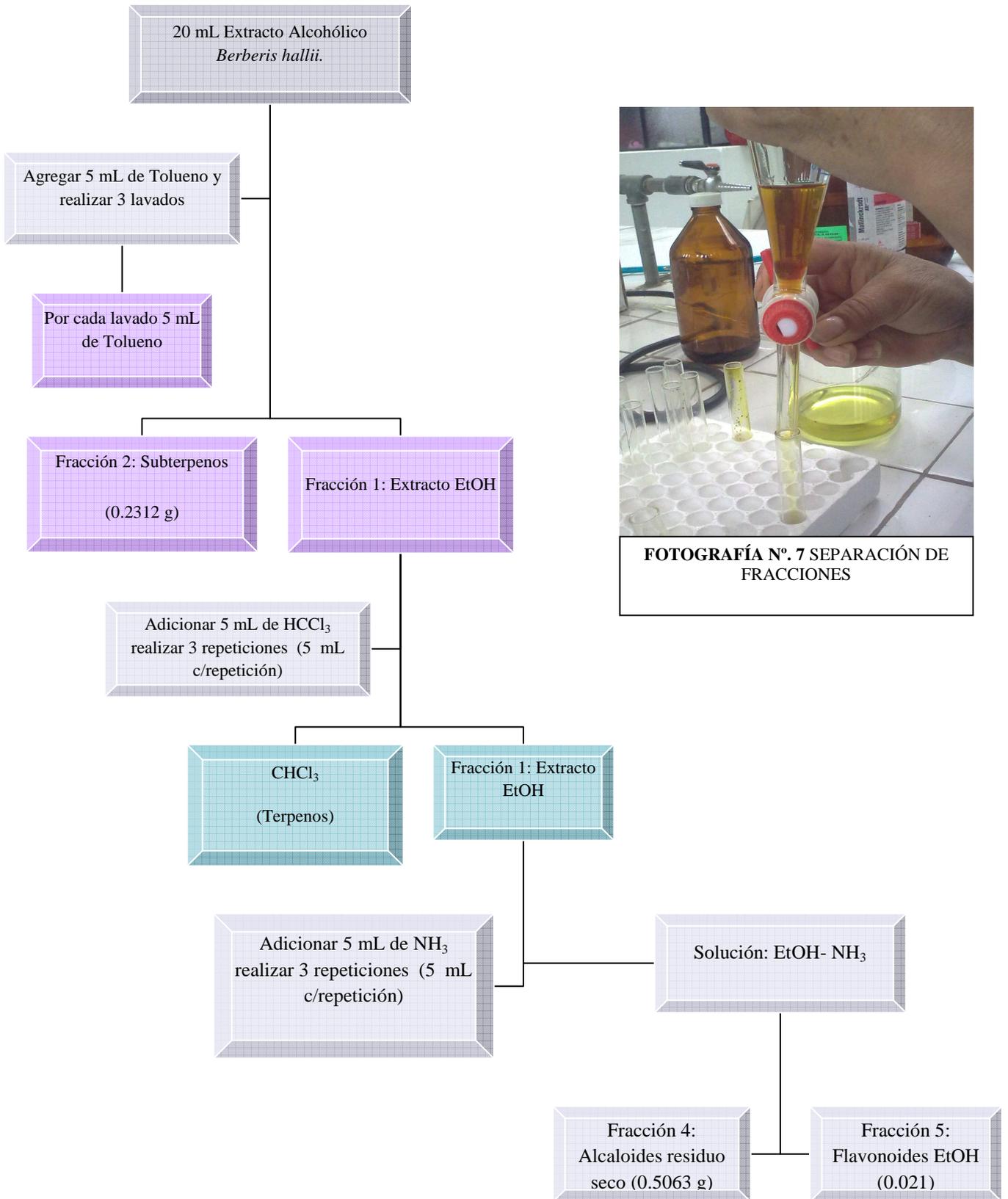
- Fracción 4: Alcaloides y HCCl_3
- Fracción 5: (flavonoides) EtOH

Posteriormente a la fracción 4 se realizó un baño en frío con hielo y Acetona para obtener el residuo seco de Alcaloides. (0.5063g)

Mediante Cromatografía en capa fina y posterior revelado con reactivo de Dragendorff, se observó que este extracto contiene compuestos alcaloideos, por lo que desde ahora en adelante se denominará extracto alcaloidal de *Berberis hallii*.

El procedimiento descrito se explica en el esquema 2.

CUADRO N° 6: FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO Y OBTENCIÓN DE ALCALOIDES



FOTOGRAFÍA N°. 7 SEPARACIÓN DE FRACCIONES

2.10 PRUEBAS PRELIMINARES CON SOLVENTES

Una vez obtenido el residuo seco de los alcaloides (0.5063 g) se procedió a realizar ensayos preliminares con diferentes solventes para realizar la cromatografía de Capa fina, que fue el punto siguiente para proceder con la investigación; fue necesario tomar en consideración que se eligió un sistema de solventes apropiado es decir que sea eficiente, que se de mejor separación de las sustancias y se pueda identificar adecuadamente las sustancias en la Cromatografía. (39)

Se buscó un sistema de solventes adecuado como lo indica la tabla No 3

GRÁFICO N° 7. SISTEMA DE SOLVENTES PARA IDENTIFICAR ALCALOIDES EN PLANTAS
(TABLA 1)

Sistema de Solventes para buscar Alcaloides Mayoritarios en algunas Plantas	Proporciones (en relación a 100 mL)
Cloroformo – Dietilamina	90 : 10
Ciclohexano – Cloroformo - Dietilamina	50 : 40 : 10
Cloroformo - Acetona - Dietilamina	50 : 40 : 10
Cloroformo – Metanol – Amoníaco 10 %	80 : 40 : 15
Etilacetato – Ciclohexano- Metanol – Amoníaco 25 %	70 : 15 : 10 : 5
Etil acetato – Metanol	90 : 10
Tolueno – Cloroformo – Etanol	28.5 : 5.57 : 14.5
n-Propanol – Ácido fórmico – Agua	90 : 1 : 9
n-Butanol – Etilacetato – Ácido Fórmico - Agua	30 : 50 : 10 : 10
Ciclohexano – Cloroformo – Ácido acético Glacial	45 : 45 : 10
Cloroformo – Etanol – Acido acético Glacial	65 : 25 : 10

FUENTE: WAGNER H; *Plant and Drug Analysis*; 2 ed; Springer, Nueva York - Estados Unidos, 1995 , pp. 14-48

2.11 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DE RESIDUO SECO DE ALCALOIDES

2.11.1 PREPARACIÓN DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS PREPARATIVAS

La preparación está detallada para placas de vidrio de 2 mm de espesor y 10*20, el procedimiento es el mismo a seguir para el resto de placas que fueron preparadas posteriormente.

- Lavar exhaustivamente las placas de vidrio 10 x 20, secarlas y colocarlas sobre una superficie plana
- .Preparar en un erlenmeyer de 250 ml una papilla bien homogeneizada con 16 g de sílicagel de capa fina (SiO_2) y 32 ml de agua destilada. Hasta sonido metálico.
- Con ayuda de un extensor, del grosor adecuado de capa, extender la papilla sobre las placas antes de que endurezca.
- Al cabo de un momento llevar las placas a la estufa durante 1 hra.
- Retirar las placas de la estufa y dejar en el desecador durante 15 – 20 min.

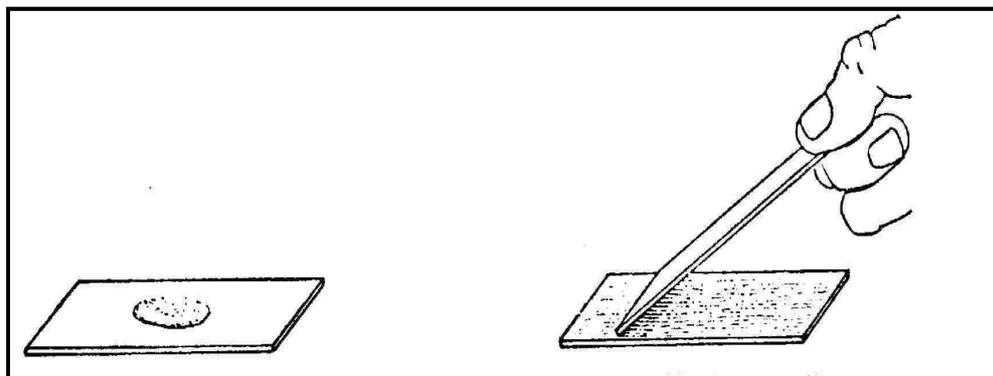


GRÁFICO N° 8: Preparación de Placas

2.11.2 COLOCACIÓN DE MUESTRA DE ALCALOIDES SOBRE LA PLACA CROMATOGRÁFICA

- A partir de 0.458 g de alcaloides secos agregar 2 mL de Etanol 96 %.
- Disolver el residuo de alcaloides secos con el Et OH.

Peso alcaloides + EtOH = 1.3582 g

- En la placa cromatográfica señalar 1 cm de distancia desde el borde inferior de la misma.
- Con la ayuda de un Capilar despuntado o de una Pipeta Pasteur proceder a colocar pequeñas gotas de muestra sobre la placa, esperando a que se seque las manchas repetir el procedimiento por 3 o 4 veces. evitando que las manchas se unan.

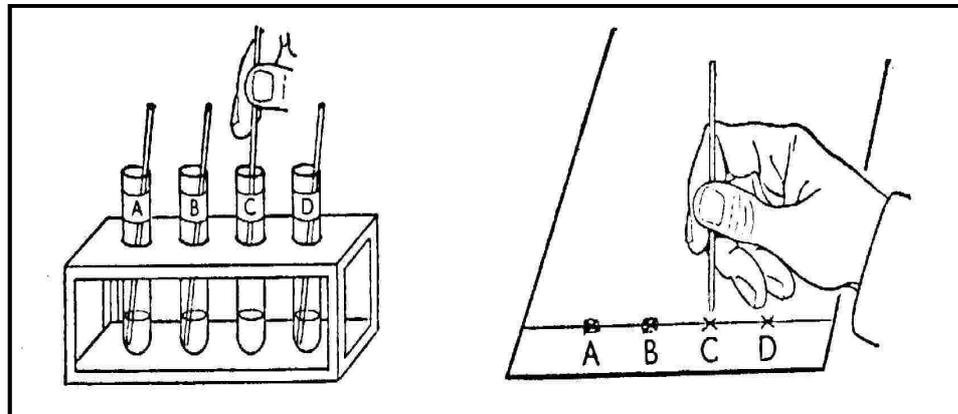


GRÁFICO N° 9: Colocación de muestra sobre la placa

- Una vez secas las manchas se coloca sobre una cuba de vidrio que contiene el sistema de solventes Cloroformo, Etanol, Acido acético (13: 5: 2) en relación a 20ml. Se deja correr el solvente que ascendió a través de las manchas y arrastró a sus componentes a lo largo de la placa que depende de las características moleculares.

- Es necesario recalcar que durante el corrido del solvente, el lugar de trabajo donde se encontraba la muestra estaba recubierto por una cortina oscura con el propósito de evitar degradaciones de los compuestos (37)

2.11.3 OBSERVACIÓN EN LA CÁMARA UV

- Una vez seca la placa inmediatamente se lleva a observación en la Cámara UV.
- se observa en UV corto y largo

2.11.4 REVELADO CROMATOGRÁFICO

- La sustancia utilizada para el revelado cromatográfico fue el Reactivo de Dragendorff.
- Con la ayuda de la bomba de vacío y el atomizador dentro del cual se encuentran 50 mL del reactivo de Dragendorff se arma el equipo de Revelado Cromatográfico.
- Colocar las placas dentro de la Sorbona en posición vertical.
- Encender la bomba de vacío y a una distancia considerable se procede a dispersar el reactivo revelador sobre las placas.
- Esperar de 2 – 5 min que las placas se sequen.
- Identificar las manchas presentes.
- Observar el color de las manchas
- Calcular el R_f de las manchas reveladas
- Se denomina R_f a la distancia recorrida por cada componente de la mezcla dividido por la distancia recorrida por el disolvente.

2.11.5 SEPARACIÓN DE MANCHAS REVELADAS EN LA CROMATOGRAFÍA

Luego de haberse identificado que en las placas Cromatográficas preparativas se presentaron 2 manchas bien diferenciadas, se separó las mismas:

- Con la ayuda de una placa cubre-objetos se traza una línea de separación entre las 2 manchas de cada una de las placas Cromatográficas.
- Separar cuidadosamente las manchas; evitando que el contenido de las mismas se mezcle; pues los resultados en la lectura del espectro se alterarían y ocasionarían datos incorrectos.
- A cada mancha se les denomina como Banda B₁, y Banda B₂
- Inmediatamente el contenido de B₁ y B₂ colocar en frascos ámbar de vidrio y tapa rosca previamente etiquetados.

2.11.5.1 Separación de las B₁ y B₂ de la Silicagel

- En el envase que contiene la B₁, se agrega una cantidad del sistema de solventes (Cloroformo, Etanol, Acido acético 6.5 : 2.5 : 1), de tal manera que el contenido quede humedecido
- En el envase que contiene la B₂, se agrega una cantidad del sistema de solventes (Cloroformo, Etanol, 8 : 2.); de tal manera que el contenido quede humedecido
- Traspasar los contenidos de B₁ y B₂ a tubos de ensayo previamente etiquetados.
- Los tubos de ensayo con B₁ y B₂ centrifugar durante 5 min.
- Retirar el sobrenadante de cada tubo.
- Una vez terminado el proceso se concentra el sobrenadante tanto de B₁ y B₂ por separado en el rota vapor:

B₁: 0.2357 g

B₂: 0.2023 g

2.11.5.2 Cromatografía de B₁ y B₂

- En placas cromatográficas de 10 * 4 cm proceder a colocar pequeñas gotas de muestra B₁ y B₂, esperando a que se seque las manchas repetir el procedimiento por 3 o 4 veces. Evitando que las manchas se unan.
- Sistema de solventes:

B₁: Cloroformo, Etanol, Acido acético 6.5 : 2.5 : 1

B₂: Cloroformo, Etanol, 8 : 2
- Colocar en Cubas de vidrio que contienen el sistema de solventes indicado para cada Banda
- Seguir el protocolo indicado para revelado y determinación de manchas

2.12 LECTURA EN EL ESPECTROFOTÓMETRO DE B₁ Y B₂

- Tanto para B₁ y B₂:
- Se realizó diluciones de 1:10 mL
- Se llevó a lectura en el espectrofotómetro.
- Se realizó un barrido desde (350-500 nm).
- Se determinó las λ

CUADRO N° 7: LECTURAS DE LAS B₁ Y B₂ EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Bandas	Solvente	Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ)
Banda 1 (B1)	(EtOH, HCCl3)	0.101	549 nm
Banda 2 (B2)	(EtOH, HCCl3, Ac. Acético)	0.872	421 nm
		0.808	390 nm
		0.793	383 nm
		0.893	397 nm
		0.805	389 nm

FUENTE: Carolina Silva Ponce

2.13 SEPARACIÓN DE B₂

- Se realizó cromatografías en Placas preparativas de la B₂; utilizando el mismo sistema de solventes.
- Partiendo de 0.2023g de extracto alcaloideo.
- Se realizó la cromatografía para 10 Placas preparativas
- La B₂ se separó en 3 fracciones; a las cuales se les denominó como sub-bandas: B₂ sub 1, B₂ sub 2, B₂ sub 3; Se observó el color de las 3 sub-bandas.
- Se observó en la Cámara UV, se observó el color de las bandas
- Se separó las 3 sub – bandas de la misma forma que se separaron B₁ y B₂
- B₂ sub 1: 0.084 g
- B₂ sub 2: 0.057 g
- B₂ sub 3: 0.042g

2.14 LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE 3 FRACCIONES B₂ SUB 1; B₂ SUB 2 B₂ SUB 3

CUADRO N° 8: LECTURAS DE LAS SUB – BANDAS DE B₂ sub 1; B₂ sub 2 B₂ sub 3, EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Banda 2, B ₂	Solvente	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
B₂ sub 1	H ₂ O	550	0.000
	(EtOH, HCCl ₃)	519	0.054
		323.5	0.005
		291.5	0.000
		550	0.000
		306.0	0.011
B₂ sub 2	Sin solventes	379	0.003
		370	0.004
		351	0.000
		334	0.002
		324	0.004
		312	0.003
		299.5	0.005
B₂ sub 3	B ₂ sub 3+ EtOH, HCCl ₃	520.5	-0.005
		487.5	-0.003
		361.5	-0.003
		550.5	-0.001

Fuente : Lecturas realizadas en el Espectrofotómetro UV 1603 Shimadzu Carolina Silva

2.15 IDENTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA BERBERINA (ALCALOIDE EN MAYOR PROPORCIÓN)

- Utilizando Acido Sulfúrico 0.1 N
- Se realizó la lectura en el Espectrofotómetro a una (λ) de 228 nm.
- Se estableció la Absorbancia.

2.16 APLICACIÓN DE LAS REGLAS DE WOODWARD – FIESER PARA IDENTIFICAR ALCALOIDES.

- Se aplicaron las Reglas de Woodward – Fieser.
- Se descarto aquellas absorbancias con similaridad o igualdad a las (λ) de los solventes
- Se hizo determino las estructuras de los alcaloides presentes mediante las tablas que proporcionan los datos de absorción de cada compuesto.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA

Para los análisis de control de calidad, se utilizó las cortezas y raíces de planta fresca *Berberis hallii Carrasquilla* de los mismos que se separó las cortezas para que no existan interferencias y falsos positivos debido a la clorofila, la materia prima fue adquirida del Sector La Josefina San Isidro del Cantón Guano provincia de Chimborazo el 7 de Mayo del 2010.

3.1.1. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el Ing. Jorge Caranquí, que es el curador, encargado del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo quien al estudiar la especie aportó con el siguiente cuadro categorial que corresponde a la comprobación taxonómica e identificación Botánica de *Berberis hallii*.

CUADRO N° 9. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Berberis hallii*

REINO	CLASE	FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Plantae	Magnoliopsida	Berberidaceae	<i>Berberis</i>	<i>Hallii</i>

Fuente: Ing. Jorge Caranquí.

3.1.2. ESTUDIO MACROSCÓPICO

La especie fue identificada de acuerdo a las características como un arbusto glabro, que puede alcanzar hasta 1,5 metros de altura. Presenta:

Espinas de 2 a 15 mm de largo.

Hojas son lisas, suborbiculares, elípticas de 1,5 a 5 cm de largo y 0,6 a 4 cm de ancho.

Al secarse adquieren un color café claro a verde grisáceo.

Las flores brotan en racimo, en este último caso hasta veinte en un mismo tallo. Son de color amarillo o naranja, de 3 a 6 mm de longitud, con seis sépalos y seis pétalos en grupos alternos de tres.

Los sépalos están habitualmente coloreados igual que los pétalos.

3.1.2.1 Muestreo, Recolección, Conservación, Limpieza y Descontaminación

CUADRO N° 10: MUESTREO, RECOLECCIÓN, CONSERVACIÓN LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

Muestreo	Recolección	Conservación	Limpieza y descontaminación
Se obtuvieron muestras frescas de raíces de <i>Berberis hallii</i> : Edad:5 meses Sitio: Semidespejado; Suelo: Árido libre de infestación con otros arbustos.	Fecha de Recolección: 7 de Mayo del 2010. Raíces: Fueron recolectadas antes de completar el ciclo vegetativo de la planta.	de Tiempo de permanencia: Fue el mínimo posible, menos de 8 hrs, con el propósito de evitar que las reacciones enzimáticas produzcan cambios en la estructura química.	de Se obtuvo el peso en (g) Peso cortezas: 340.123 (g) Peso raíces: 1927.758 (g)

3.1.3 EXTRACCIÓN DE LA PLANTA FRESCA POR MACERACIÓN

CUADRO N°11. PORCENTAJE DE RESIDUO SECO Y ALCOHOL UTILIZADO

Peso Material Vegetal fresco	Peso Constante	Porcentaje Residuo seco (%)	Alcohol a utilizar
3 g	0.831 g	28 %	Alcohol Potable 96 %.

Después de haberse calculado el Porcentaje de Residuo seco se utilizó alcohol Potable al

96 % siguiendo las indicaciones del Cuadro N° 11..

3.1.4 MACERACIÓN Y EXTRACCIÓN

- **MACERACIÓN:** El resultado es un equilibrio de concentración entre la planta *Berberis hallii* y el EtOH 96%. El hinchamiento de la droga es importante porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y difusión del alcohol

- **EXTRACCIÓN:**

CUADRO N°12. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS RAICES Y TALLOS DE *Berberis hallii*

Envases	Contenido	Extracto EtOH concentrado	Pocentaje de Rendimiento
			$\% = \frac{\text{Rendimiento Real}}{\text{Rendimiento Teórico}} \times 100$
Env₁ (raíces)	1439.04 g	253.63 g	18 %
Env₂(cortezas):	1918.72 g	452.69 g	24 %

El contenido de los extractos concentrados disminuye notablemente debido a la recuperación del solvente; además que el concentrado debía dar una consistencia espesa y libre de Etanol.

Los Porcentajes de Rendimiento del extracto de las Raíces fue de 18 %, y el de las cortezas fue del 24 % ; El % de rendimiento de los extractos es menor al 50 %, ya que la relación de las raíces y cortezas con el EtOH 96% aumenta debido a factores como el

tiempo de permanencia entre droga y solvente .

Otros factores influyentes que afectan el porcentaje del rendimiento se encuentran la temperatura y la presión a la cual se sometieron los extractos para ser concentrados.

3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Los resultados obtenidos en los extractos de las cortezas y raíces de *Berberis hallii* se aprecian en el siguiente cuadro. Con respecto A las reacciones de coloración o aparición de precipitados, aplicadas según las técnicas de tamizaje fitoquímico.

CUADRO N°13. GRUPOS FITOQUIMICOS ENCONTRADOS EN LAS RAICES Y TALLOS DE *Berberis hallii* LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia, (+/-) Falsos Positivos

Ensayos	Raíces	Cortezas
Dragendorff	Opalescencia : (+++)	Opalescencia : (++)
Alcaloides	Turbidez definida (+++)	Turbidez definida (++)
	Precipitado: (+++)	Precipitado: (+++)
Wagner	Opalescencia : (++)	Opalescencia : (+++)
Alcaloides	Turbidez definida (++)	Turbidez definida (+++)
	Precipitado: (++)	Precipitado: (++)

Mayer	Opalescencia : (++)	Opalescencia : (+)
Alcaloides	Turbidez definida (++)	Turbidez definida (++)
	Precipitado: (+++)	Precipitado: (++)
Lieberman-Büchard. (Triterpenos-esteroides)	(+)	(+)
Sudan III (Lípidos)	(+)	(++)
Catequinas	(-)	(+/-)
Resinas	(+)	(+)
Benedict (Taninos)	Verde Intenso (++)	Verde Intenso (++)
Ninhidrina (Aminoácidos)	(+)	(+)
Shinoda (Flavonoides)	Amarillo (+++)	Amarillo (+)
Antocianidinas	(++)	(-)
Fehling (azúcares)	(++)	(++)
Clorofila	(-)	(+)

En el cuadro N°13, se muestra la composición química de los extractos de *Berberis hallii*, se evidencia una alta presencia de alcaloides en los dos extractos. También existe una presencia considerable de flavonoides. Azúcares reductores, aminos, lípidos están presentes tanto en las raíces como en las cortezas.

La Clorofila esta presente en las cortezas y no en las raíces por dicha razón se utilizó el extracto de las raíces de *Berberis hallii* para los ensayos posteriores

3.3 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE LAS RAÍCES de *Berberis hallii*

3.3.1 MÉTODOS GENERALES PARA ANÁLISIS DE EXTRACTOS

CUADRO N° 14: DETERMINACIONES PARA EL ANÁLISIS DE EXTRACTO ETANÓLICO DE *Berberis hallii*

Determinaciones	Resultados
Requisitos organolépticos	Olor: Característico, Color: Amarillo claro Transparencia : (-) Presencia de Partículas: (++) Separación en Capas : (-)
Densidad relativa. $D_{25} = M_1 - M / M_2 - M$ $M_1 = 22.9430 \text{ g}$ $M_2 = 22.6515 \text{ g}$ $M = 11.5127 \text{ g}$	$D_{25} = \frac{22.9430 \text{ g} - 11.5127 \text{ g}}{22.6516 \text{ g} - 11.5127 \text{ g}} = 1.0261$
Índice de Refracción $N_d^{25} = N_d + 0.00044 (t - 25)$ $N_d^t = 1.267$	$N_d^{25} = 1.267 + 0.00044 (22 \text{ }^\circ\text{C} - 25)$

t = 22 ° C	$N_d^{25} = 1.265$
0.00044 = factor de corrección ° C.	
pH del Extracto	pH = 5.03
Sólidos Totales	
$St = \frac{P_r - P}{V} * 100$	$St = \frac{46.4826g - 45.4023g}{5 mL} * 100$
$P_r = 46.4826$ $P = 45.4023$	
V = 5 mL, 100 = factor	St = 22

Análisis capilar	Color: Vivamente coloreado
	Altura: Mediana (6 cm)
	Análisis de Imagen: Franja, Sub franja, Banda, Sub Banda
	Forma de la Franja: Dentada

Estas pruebas fueron aplicadas al extracto etanólico de raíces de *Berberis hallii* que fue obtenido e inmediatamente se realizaron los ensayos.

Mediante los requisitos organolépticos se establecieron las características propias del extracto. La Densidad relativa es de 1.0261 obtenida al realizarse una comparación entre las densidad del agua con respecto al extracto de referencia. Estableciéndose que la Densidad relativa es el cociente de las densidades.

El índice de Refracción de 1.265 indica la reducción de la velocidad de la luz al propagarse.

El pH es del extracto fue 5.03 indicativo de la acidez del mismo.

El resultado de los Sólidos totales fue de 22 siendo estos los residuos que quedaron después de la evaporación de la muestra y su consecutivo secado en estufa.

3.3.2 CONTROL DE CALIDAD DE *Berberis hallii*

CUADRO N°15: DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Cenizas Totales	Extracto etanólico	Límite
$C = (M_2 M / M_1 - M) * 100$		
M = 23.6874 g	$C = \frac{(24.1236 - 23.6874)g}{(28.6453 - 23.6874)g} \times 100$	Máx: 12 %
M ₁ = 28.6453		
M ₂ = 24.1236	C = 9 %	
100 = Factor		

Los índices de cenizas, de las raíces están dentro de los límites normales establecidos para las plantas medicinales. Las cenizas totales permitieron determinar la cantidad de material remanente después de la ignición: cenizas fisiológicas o derivados de los tejidos vegetales y cenizas no vegetales.

CUADRO N°16: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Determinación	<i>Raíces De Berberis Hallii</i>	Límite
Humedad (%)	12%	8-14%

La presencia de exceso de agua en las drogas vegetales, puede promover el crecimiento de hongos, insectos y la hidrólisis de constituyentes que pueden provocar el deterioro de la droga. Es por ello, que los límites en el contenido de agua debe ser determinado para las drogas vegetales, especialmente para aquellas que absorben fácilmente la humedad o en las cuales el deterioro puede ser promovido por la presencia de un exceso de agua.

Al realizar el ensayo, se encontró que la humedad de las raíces se encuentra dentro de los límites establecidos para drogas; lo que nos indica además que la materia en estudio ha sido recolectada en la época adecuada.

3.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DE RESIDUO SECO DE ALCALOIDES

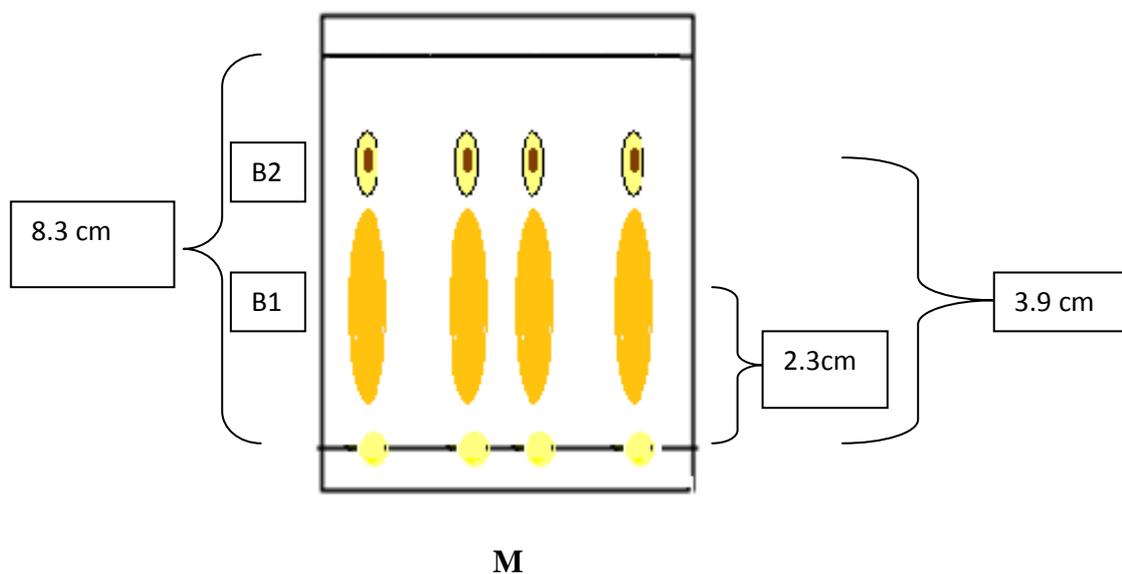
Fase Móvil: Cloroformo, Etanol, Acido acético (13: 5: 2).

Luego de haber probado todos y cada uno de los solventes se trabajó con el sistema Cloroformo – Etanol –Ácido acético; el mismo que dio mejores resultados en la cromatografía.

Revelador: Dragendorff

Soporte: Sílica Gel 60 F 254 (Merck)

Se analizaron las diferentes fracciones obtenidas:



M: Extracto de raíces de *Berberis hallii*

GRÁFICO N°10. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LAS BANDAS B1 Y B2

Se puede apreciar con nitidez la aparición de 2 manchas o Bandas bastante definidas.

Banda 1 : De color anaranjado al revelar con Dragendorff se determina un $R_f = 0,28$

Banda 2 : De color amarillo al revelar con Dragendorff se determina un $R_f = 0,46$

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Como se puede apreciar en el caso de la B2 existe la aparición de una tonalidad café dentro de la mancha amarilla lo que conlleva a que se realice la separación de las bandas para determinar los alcaloides presentes.

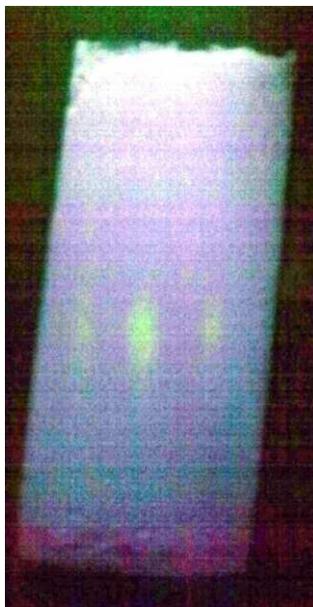
El color café – amarillo según la Bibliografía indica la presencia de alcaloides; así como también el $R_f = 0.46$ indica la presencia de Berberina en esta zona.

El proceso de separación tiene lugar por la diferente adsorción de cada componente a la superficie del soporte sólido (silicagel), esto ocurre a través de enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas entre la molécula orgánica y la silicagel. En general cuanto más polar es un compuesto (mayor número de grupos hidroxilo posee) más se retiene y menor es su R_f . Cuanto mayor es la polaridad del disolvente del tanque (o sea, cuanto mayor es la proporción de los disolventes más polares, acetona y metanol) mayor será el espacio recorrido por todos los componentes y esta polaridad se ha de ajustar de forma que las manchas queden centradas en la placa y se pueda analizar su composición adecuadamente.

3.4.1 OBSERVACIÓN EN LA CÁMARA UV

Al observarse en el UV largo previas a ser reveladas las sustancias presentes son fluorescentes debido a la capacidad de absorber luz durante un tiempo mucho más

prolongado, aún después del corte del estímulo que la provoca, ya que la energía absorbida se libera lenta (incluso muchas horas después) y continuamente.



FOTOGRAFÍA N° 8 FLUORESCENCIA DE LAS SUSTANCIAS EN CÁMARA UV

3.4.2 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE B₁ Y B₂

CUADRO N° 17. (%) DE RENDIMIENTO DE B₁ Y B₂

Bandas	Peso (g)	Porcentaje de Rendimiento
	Alcaloides secos:	$\% = \frac{\text{Rendimiento Real}}{\text{Rendimiento Teórico}} \times 100$
B₁	0.2357 g	52%
B₂	0.2023 g	44 %
Alcaloides secos	0.458 g	

El % de Rendimiento de las Bandas es indicativo de que existieron pérdidas de las muestras ya sea por razones como la presión, temperatura; y por el tamaño de partícula de las muestras.

3.4 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE B1 Y B2

CUADRO N° 18: LECTURAS DE LAS B₁ Y B₂ EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Bandas	Solvente	Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ)
Banda 1 (B₁)	(EtOH, HCCl ₃)	0.101	549 nm
Banda 2 (B₂)	(EtOH, HCCl ₃ , Ac. Acético)	0.872	421 nm
		0.808	390 nm
		0.793	383 nm
		0.893	397 nm
		0.805	389 nm

FUENTE: Lecturas fueron realizadas en el Espectrofotómetro UV 1603 Shimadzu
Carolina Silva

En la lectura del espectro de la B₁, se obtuvo nada más que un resultado; y no existió la presencia de Picos; lo que es indicativo de que no existe presencia de alcaloides; y se establece que el resultado obtenido es un indicativo de los solventes que se encuentran presentes en la muestra; y que se produjo un arrastre de las sustancias hacia la B₂.

Se obtuvo una concentración de 2.35 % en base a la Longitud de onda de 549 nm.

GRÁFICO NO 11: CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA B2 (Absorbancia Vs λ)

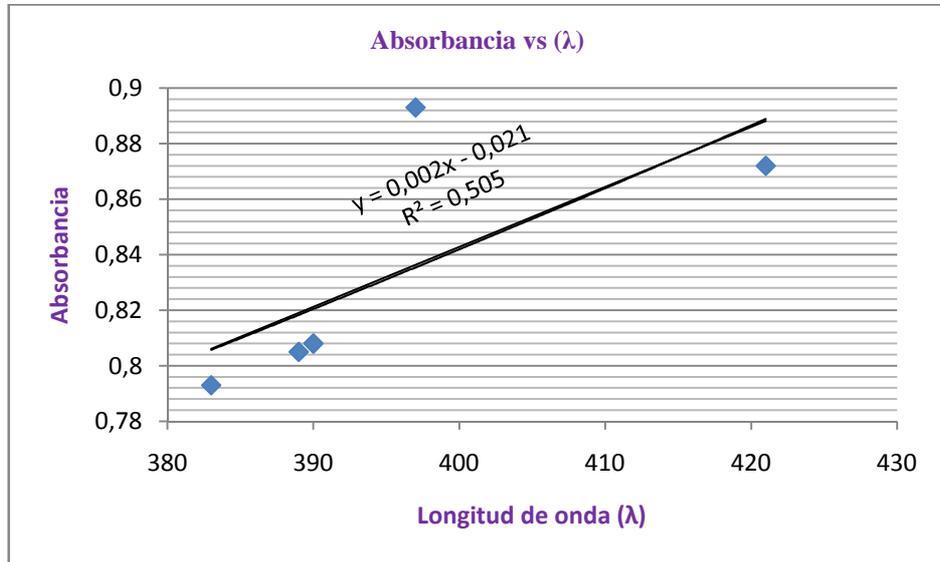
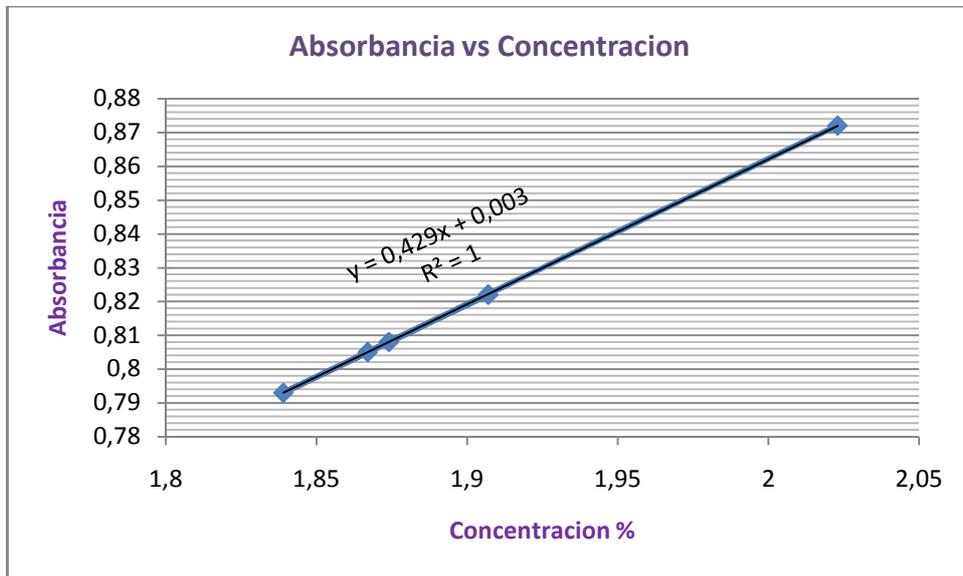


GRÁFICO NO 12: CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA B2 (Absorbancia Vs Concentración)



En el Gráfico N° 11: Se tiene la curva de Calibración de las Absorbancias respecto a las Longitudes de Onda; que en este caso fueron predominantes para realizar la separación

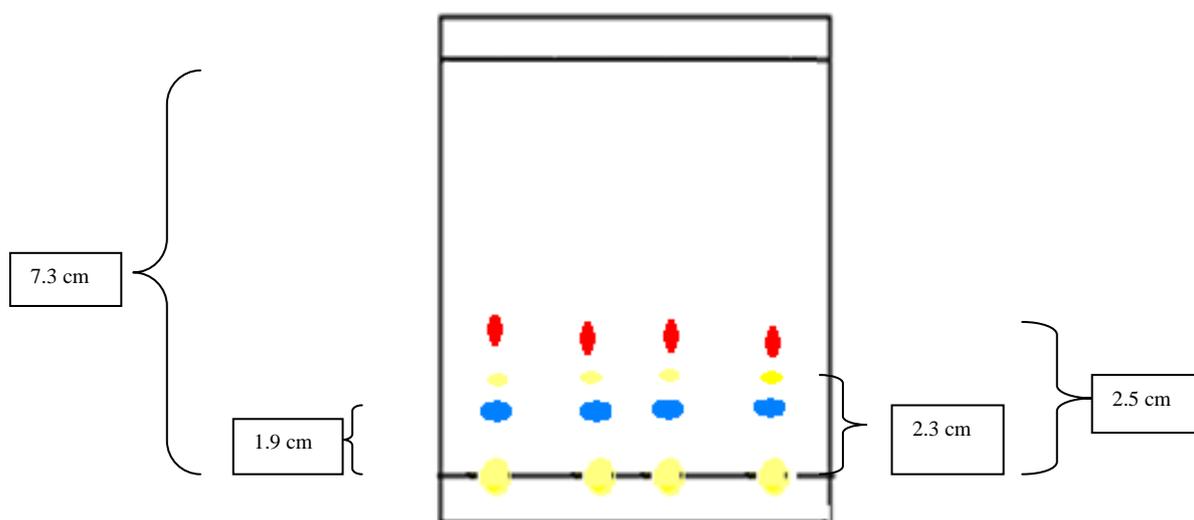
de dicha banda y realizar las determinaciones que en ella se encuentran; con una pendiente de 0.845. Se obtuvieron los primeros indicativos de la presencia de Berberina; pues según Miranda J; la Berberina está presente en los diferentes géneros de *Berberis* a longitudes de onda entre (205 – 350 nm).

En el Gráfico N° 12: Al haberse realizado las diluciones; se puede realizar la curva de calibración, para que por interpolación de datos o resultados se conozca directamente la concentración de acuerdo a la absorbancia que resulte de las lecturas del equipo a la longitud de onda determinada

3.6 SEPARACIÓN DE B2

3.6.1 CROMATOGRAFÍA DE B2

Al realizar las cromatografías utilizando la misma Fase Móvil; y lográndose una mejor separación y arrastre se pudo identificar 3 manchas bien diferenciadas



B2: Banda 2

GRÁFICO N°13. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA SEPARACIÓN DE LA BANDA 2, Y OBTENCIÓN DE 3 FRACCIONES

Color azul: B2 sub 1

Color rojo: B2 sub 2

Color amarillo: B2 sub 3

Se puede apreciar con nitidez la aparición de 3 manchas tricolor Bandas bastante definidas.

B2 sub 1: De color azul se determina un $R_f = 0,26$

B2 sub 2: De color amarillo se determina un $R_f = 0,32$

B2 sub 3: De color rojo se determina un $R_f = 0,34$

Los alcaloides minoritarios reaccionan con unas tonalidades rojo – café.

La berberina al encontrarse en mayor proporción revela tonalidades amarillas y fluorescentes. El color azul indicativo de alcaloides como calafatina.

3.6.2 IDENTIFICACIÓN DE BERBERINA EN LA CÁMARA UV

Al observar en la Cámara UV en el UV largo se comprobó la fluorescencia de la B2 sub 2; que indica una vez más la presencia de Berberina.

CUADRO N° 19: (%) DE RENDIMIENTO DE B₂

B2	0.2023(g)	% Rendimiento
	Alcaloides secos:	$\% = \frac{\text{Rendimiento Real}}{\text{Rendimiento Teórico}} \times 100$
B₂ sub 1	0.084	42%
B₂ sub 2	0.057	28 %
B₂ sub 3	0.042	21%

3.7 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE 3 FRACCIONES DE B₂

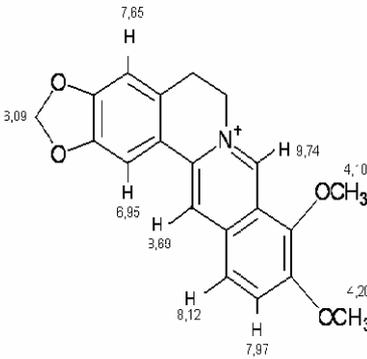
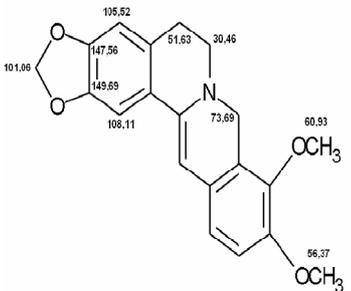
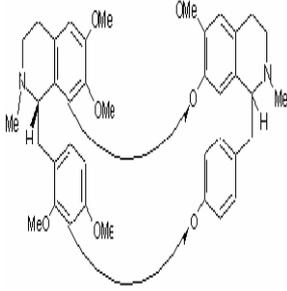
Se llevó al espectrofotómetro las sub-Bandas para establecer las longitudes de onda; las mismas que una vez obtenidas sirven como referencia para establecer mediante las Reglas de Woodward y Fieser en que longitud de onda se encuentra la berberina; así como también identificar la presencia de compuestos como la calafatina, y labertina mediante su estructura molecular; se pudo establecer las longitudes de onda y la presencia de estos compuestos.

Es necesario añadir a este resultado las tablas utilizadas para realizar las determinaciones

3.8 DETERMINACIÓN DE LOS ALCALOIDES POR MEDIO DE WOODWARD – FIESER

A partir de las tablas (Ver Anexo N° 4) y de los datos de las longitudes de onda se procedió a cuantificar los alcaloides que se encuentran presentes obteniéndose:

GRÁFICO N°14. PRINCIPALES ALCALOIDES DE *Berberis halli* . (TABLA 2)

Berberina: (333, 373, 312 nm)	Lambertina: (273; 348 ; 365)	Calafatina: 360, 300 nm
		

Después de haberse obtenido las longitudes de onda de los 3 alcaloides mediante la aplicación de las Reglas de Woodward y Fieser se ubicó la presencia de los alcaloides en la Gráfico N° 15; con un rango de diferencia de +/- 5 nm.

GRÁFICO N° 15. IDENTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES PRESENTES EN LAS SUB BANDAS.DE B2 (TABLA 3)

Banda 2, B₂	Alcaloides presentes Woodward-Fieser (+/- 5 nm)	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
B₂ sub 1		323.5	0.005
		291.5	0.000
		550	0.000
	300 (Calafatina)	305.0	0.011
B₂ sub 2	373(Berberina)	370	0.004
	348 (Lambertina)	351	0.001
	333(Berberina)	334	0.002
		324	0.004
	312 (Berberina)	312	0.003
		299.5	0.005
B₂ sub 3		487.5	0.003
	365 (Lambertina), (Calafatina)	361.5	0.003
		550.5	0.001

SILVERSTEIN, R., CLAYTON, G., MORRIL T., Identificación Espectrofotométrica de Compuestos Orgánicos, Trad. del Ingles: OLIVERIO, Moreno, México DF - México, Diana, pp. 257-268.

Se puede identificar que, en *Berberis hallii* existe la presencia del alcaloide principal que es la Berberina; así como también la Calafatina y Lambertina.

Debido a que los alcaloides son sustancias fotosensibles, no se realizaron las lecturas en el espectro visible, debido a la degradación casi inmediata que se produce.

3.9 IDENTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA BERBERINA (ALCALOIDE EN MAYOR PROPORCIÓN)

- Utilizando Acido Sulfúrico 0.1 N
- Se realizó la lectura en el Espectrofotómetro a una (λ) de 228 nm.
- Se estableció una Absorbancia de 0.006 que se correlaciona con las absorbancias en las que se encuentra la Berberina.

CONCLUSIONES

1. Se realizó la recolección de las Raíces y tallos de *Berberis halliii* el 7 de Mayo del 2010; dicho arbusto se encuentra presente con abundancia en la Parroquia de San Andrés Chimborazo- Ecuador. Las raíces y tallos fueron recolectadas antes de completar el ciclo vegetativo de la planta. En la identificación taxonómica se detalla que *Berberis halliii*, pertenece al Reino Plantea, Clase: Magnoliopsida, Familia: Berberidaceae, Género: Berberis, Especie: *Halliii*, en la identificación colaboró el Ing. Jorge Caranqui.
2. El extracto de las raíces de *Berberis halliii*, se obtuvo por maceración y eliminación posterior del solvente, los alcaloides se separan por medio de Basificación y extracción con Cloroformo, comprobándose reacción positiva con el Ensayo de Dragendorff
3. El estudio químico del extracto alcaloidal de *Berberis halliii*, permitió aislar por primera vez de esta planta, los alcaloides Berberina, Lambertina, y Calafatina; con los Porcentajes de Rendimiento de 42 % en B₂ sub 1 (Calafatina), 28 % en B₂ sub 2, (Berberina, Lambertina), 21 % en B₂ sub 3 (Lambertina, Calafatina).
4. La Metodología adecuada y utilizada para identificar y cuantificar los alcaloides isoquinolínicos implica Cromatografía de Capa Fina preparativa, fraccionamiento de Bandas y Análisis Espectrofotométrico.
5. La identificación de los alcaloides se realizó por espectroscopia UV, aplicando las Reglas de Woodward – Fieser, considerando las λ proporcionadas por el espectrofotómetro y las λ calculadas utilizando las Tablas de Woodward – Fieser, obteniéndose para:

($\lambda(\text{nm})$) Espectrofotómetro; $\lambda(+/- 5\text{nm})$ Woodward - Fieser)

B₂ sub 1 (305.0 nm; 300 nm (Calafatina)).

B₂ sub 2 (370 nm; 373 nm (Berberina)), (351 nm; 348 nm (Lambertina)), (334 nm; 333 nm (Berberina)), (312 nm; 312 nm (Berberina)).

B₂ sub 3 (361.5 nm; 365 nm (Lambertina, Calafatina))

RECOMENDACIONES

1. Seguir el estudio de la planta ya que por los demás compuestos como Lambertina y Calafatina que están presentes en el arbusto se puede determinar que posee propiedades biológicas de interés.
2. De esta investigación se determinó que la Berberina es un alcaloide que puede ser utilizado como colorante en tinciones de fibra sintética y animal .motivo por el cual se deberá realizar un monitoreo respectivo y ensayos de tinción.
3. Para el Fraccionamiento de Bandas es necesario trabajar en cortina de oscuridad con el fin de evitar degradaciones, debido a que los compuestos son fotosensibles.

RESUMEN

Se investigó la identificación y cuantificación de los alcaloides de *Berberis hallii*; arbusto que se encuentra con abundancia en el Sector de San Isidro Cantón Guano de la Provincia de Chimborazo.

Mediante el estudio físico – químico, realizando Cromatografía de Capa Fina y aplicando metodologías cualitativas clásicas como el Tamizaje Fitoquímico; y técnicas modernas como Espectroscopia UV, se aislaron tres compuestos de naturaleza alcaloidal a partir del extracto etanólico de las raíces de *Berberis hallii*. Resultando tres Metabolitos secundarios cuantificados e identificados como Berberina, Lambertina, y Calafatina, provenientes de una base bencilisoquinolínicos en común.

De los Alcaloides Berberina, Lambertina y Calafatina, la Berberina es el alcaloide que posee aplicaciones de gran interés, desde el punto de vista terapéutico es un antitumoral, y en el campo industrial debido a sus propiedades tintoreras se proyecta como un colorante natural en la gama de amarillos.

Se concluye que el mundo vegetal constituye una fuente de moléculas potencialmente importantes; esta investigación aporta una base de referencia, que indica los alcaloides presentes en una de las variedades de *Berberis* ecuatorianas. Se recomienda que las sustancias identificadas sean aplicadas en los campos de la Fitoterapéutica y en el campo Industrial, contribuyendo con el desarrollo y emprendimiento en nuestra sociedad.

SUMMARY

A research was developed about identification and quantification of the alkaloids *Berberis hallii*, Shrubs are found in abundance in San Isidro Sector, Guano Cantón from Chimborazo Province.

Through The physical-chemical, carried out Thin layer chromatography and applying classic qualitative methodology such as phytochemical screening; and modern techniques as UV spectroscopy, three compounds of an alkaloid nature were isolated from the ethanolic extract of the *Berberis hallii* roots. Resulting three secondary metabolites quantified and identified as Berberine, Lambertina and Calafatina, from benzylisoquinoline base.

Being the alkaloids Berberine Lambertina and Calafatina, The Berberine is the alkaloid providing applications of great interest, from therapeutic point of view is an antitumoral, and in the industrial field is used as dye being a natural dye in the yellow spectrum

It is concluded the plant world becomes a source of molecules potentially important; this research contribute a baseline, indicating the alkaloids present in one of the *Berberis* Ecuadorian varieties. It is recommended the identified substances are applied in the phytotherapy and Industrial fields, contributing both development and entrepreneurial from our city.



BIBLIOGRAFÍA

1. **ASOCIACION OFICIAL DE QUIMICA ANALITICA.**, Official Methods of Analysis. A.O.A.C. Washington D.C.1990 (Biblioteca personal Dra. Cumandá Játiva)
2. **BERNFELD, P.**, Biogénesis de Compuestos Naturales, Nueva York – Estados Unidos, Pergamon. 2003, pp. 236-251.
3. **Berberis**
<http://patlibros.org/lpa/vwoth/flora-fauna.htm>
2008-06-05
4. **Berberis:**
www.linneo.net/.../berberis_vulgaris/berberis_vulgaris.htm
(2007-08-08)
5. **Berberis halliii**
<http://patlibros.org/lpa/vwoth/flora-fauna.htm>
(2008-06-12)
6. **Berberis halliii**
<http://www.plantsystematics.org>.
(2009-06-14)
7. **BERBERINA**
<http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/berberina.pdf>
(2008-12-11)
8. **BULLOCK, J.**, Biosíntesis de Productos Naturales, 2da. ed., Bilbao - España, URMO. 2001, pp. 123-130.
9. **CÁCERES, A.**, Alcaloides de Plantas en Guatemala. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala. 1996, pp.28-32.
10. **CAMARGO, A.**, Especies Nuevas del Género Berberis. 3ra. ed., Barcelona-España, Caldasia. 2008, pp. 419-424.
11. **CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

www.textoscientificos.com

(2007-01-17)

12. **CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

es.wikipedia.org/wiki/Cromatografía_en_capa_fina

(2008-03-18)

13. **CROMATOGRAFÍA**

www.unedcervera.com/.../cromatografia.html

(2004-03-27)

14. **CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

html.monografias.com/cromatografia-en-cap-fina.htm

(2008-05-12)

15. **CORPEI** Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones.

<http://www.corpei.org/FrameCenter.asp?Ln=SP&Opcion>

(2008-06-27)

16. **DOMINGUEZ, J.**, Métodos de Investigación Fotoquímica, México D.F - México, Limusa. 1999, 215p.

17. **DOMINGUEZ, X.**, La importancia de la Taxonomía en la Investigación Fotoquímica, 2da. ed., Bogotá - Colombia, Limusa. 2006, p. 28-33.

18. **DONKIN, R.**, Transactions of the American Philosophical Society, 2da. ed., Los Angeles – Estados Unidos, Boex, 1997, pp 5-84.

19. **ENRIZ, R., FREILE, M.**, Structure-Activity relationship of berberine and derivatives acting as antifungal compounds, *Discovery Science*, Estados Unidos. (3). pp41-43, 19-05/2002

20. **ESPECTROFOTOMETRIA**

http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible

(25-10-2002)

21. **EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES**

http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apbot-farm2c/evanswc01/31.html.

(2009-07-12)

22. **FAJARDO, V., SALMERÓN, M.,** y otros, Estudio Químico de Plantas Australes. en Flora de Chile. Biología, Farmacología y Química. Químico Farmacéutico. Santiago de Chile – Chile, Universidad de Playa Ancha, Facultad de Ciencias, 2007, pp.103-104
23. **HAMMERSLAG, F.,** The Technology and Chemistry of Alkaloids, 2da. ed., Santiago de Chile - Chile, Hochstetter, 2008, p. 76.
24. **HARBONE, J.,** Phytochemistry, Nueva York – Estados Unidos, T. Swain, 2002, p 245.
25. **JEON, Y., JUNG, J.,** y otros., NMR Studies on Antitumor Drugs, Berberine and Berberrubine, Bull. Korean Chem, Korea. (3). pp. 91-94, 2008-06-15.
26. **KANNER, J., HAREL, S.,** Química de Agricultura. Berberina-una nueva clase de antioxidante, 2da. ed., Caracas – Venezuela, Bolívar. 2001, pp. 5178-5185.
27. **KIRK, O.,** Enciclopedia de Tecnología Química, 3ra. ed., Nueva York – Estados Unidos, John Wiley, 1998, pp. 231-239.
28. **LANDRUM, L.** Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and Adjacent Southern Argentina, Annals of the Missouri Botanical Garden, Los Angeles – Estados Unidos. (4) 1999, pp. 86-89.
29. **LUCIO, E.,** Spectroscopy, 2da. ed., Los Ángeles – Estados Unidos, Grays. 2007, p.87.
30. **LUCKNER, M.,** Metabolitos Secundarios en Plantas, 2da. ed., Buenos Aires – Argentina, Chapman, 1999, 123p.
31. **MARCANO, D., HASEGAWA, M.** Fitoquímica Orgánica. Caracas – Venezuela, Litopar. 1991. 258p.

32. **MORALES, C.**, Alcaloides. Universidad Técnica Federico Santa María.
<http://johan.jmc.utfsm.cl/pi/Alcaloidesdoc1.PDF>
(24-01-2008)
33. **PARTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO**

<http://www.google.com.ec/images?hl=es&q=partes+de+espectrofotometro&um=1&ie=UT>

(2005-06-12)
34. **PHALOW, M.** Farmacéutica El gran libro de las plantas medicinales, 2da. ed.
Valencia – España, Everest. 1982. 288p.
35. **POMILIO A, MONGELLI E.**, Etapas de Screening. Ciencia Hoy. (Chile). (3).
pp. 12:13, 2002.
36. **RAMIREZ, M ., WILLIAMS, K.**, Guía Agro Industria de Cotacachi Ecuador y
alrededores. Con el apoyo del programa Food for Peace, Quito – Ecuador,
Soboc, 2005, pp. 27-28.
37. **RANDERATH, K.**, Thin Layer Cromatography, 2da. ed. Nueva York – Estados
Unidos, Academic Press. 2003, pp.221-245.
38. **RANGANNA, S.** Handbook of Analysis and Quality Control of vegetable
products. 2da ed. New York – Estados Unidos, Tata McGraw-Hill, 2005,
pp.107-110.
39. **RIDDICK, J.**, Solventes Orgánicos, 3ra. ed., Nueva York – Estados Unidos,
Interciencia, 2003, p. 339.
40. **ROBINSON, T.**, The Biochemistry of Alkaloids, Nueva York – Estados
Unidos, Verlag, 2008, pp.59-73.
41. **ROBSON, N.**, Maravillas Botánicas. Madrid-España, LIBSA. 1991. 83p.
42. **SCHWAB, W.**, Farmacopea Homeopática Brasileira, 2da. ed., Rio de Janeiro-
Brasil, Leiziping, 2003, pp. 1298-1231.
43. **SCOTT, I.**, Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, 4ta. ed.,
Nueva York – Estados Unidos, Macmillan, 2004, p.145.
44. **SILVA, G. Y CASALS, P.** Bioensayo. Facultad de Agronomía. Universidad de
Concepción.

<http://www.multired.com/ciencia/gosilagu/analisi%20estadistico.htm>

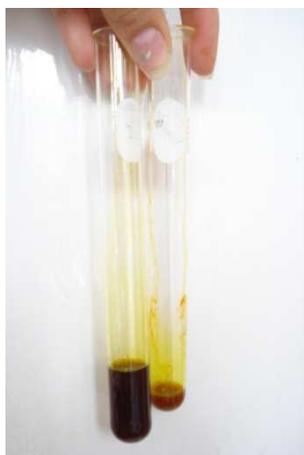
(2007-12-10)

45. **SILVERSTEIN, R., CLAYTON, G., MORRIL T.,** Identificación Espectrofotométrica de Compuestos Orgánicos, Trad. del Ingles: OLIVERIO, Moreno, México DF - México, Diana, pp. 257-268.
46. **SOLIS N; GUERRERO.,** Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos, 3ra. ed., Barcelona – España, Laurence. 1999. pp. 83-85.
47. **SOLÍS, P., GUERRERO, N.,** Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos, Madrid – España, LIBSA, 2003, pp.43, 65-80.
48. **STINTZING, F.C., SCHIEBER, A., CARLE, R.,** Phytochemical and Nutritional Significance of Cactus Pear. European Food Research and Technology, Chicago – Estados Unidos, Brius, 2001, pp. 396-407.
49. **SUNG, I.,** Plantas Medicinales, 7ma. ed. Lima – Perú, Isabel, 2000, pp. 128-135.
50. **SWAIN, T.,** Chemical Plant Taxonomy, Nueva York – Estados Unidos, Academic Press. 2003, p. 126.
51. **VILLANUEVA, C.** La Tara: El Oro Verde de los Incas, Lima – Perú, AGRUM, 2007, p.146.
52. **WAGNER H;** Plant and Drug Analysis; 2 ed; Springer, Nueva York – Estados Unidos, 1995, pp. 42-48
53. **WARREN, F.,** The Alkaloids, Nueva York – Estados Unidos, Academic Press, 2002, p.246.

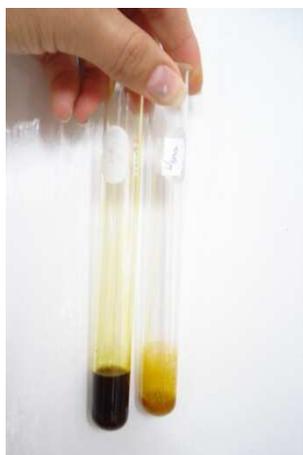
ANEXOS

ANEXO N° 2. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE LAS RAÍCES DE *Berberis hallii*.

Dragendorff



Wagner



Mayer



Ninhidrina



Resinas



Shinoda



Baljet



Antocianinas



Sudan III



Catequinas



Fehling

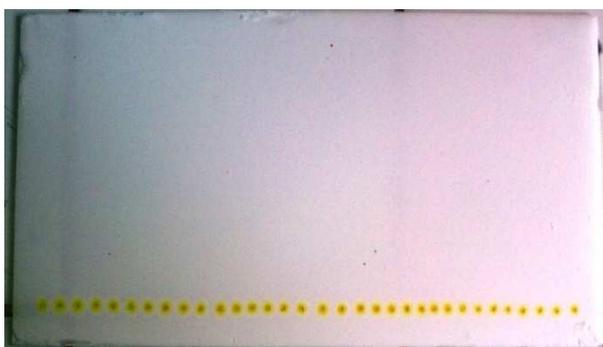


Tamizaje Fitoquímico



ANEXO N° 2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Placas Preparativas

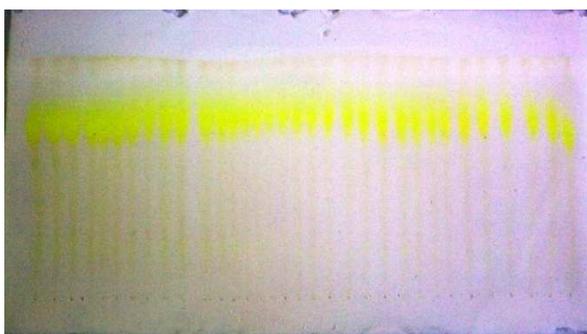


Fase Móvil

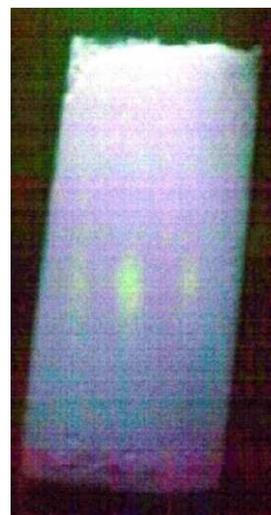
HCCl3, EtOH, Ác. Acético Glacial



Cromatografía



Observación en la Cámara UV



Revelado Cromatográfico



Revelador: Dragendorff

Separación de Bandas

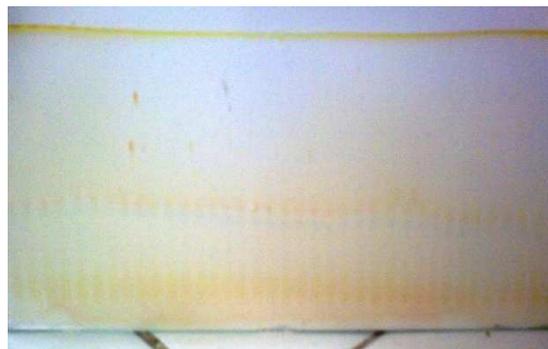


Cromatografía Banda 2



Manchas coloreadas: Azul, Rojo, Amarillo

Revelado Cromatográfico de la Banda 2



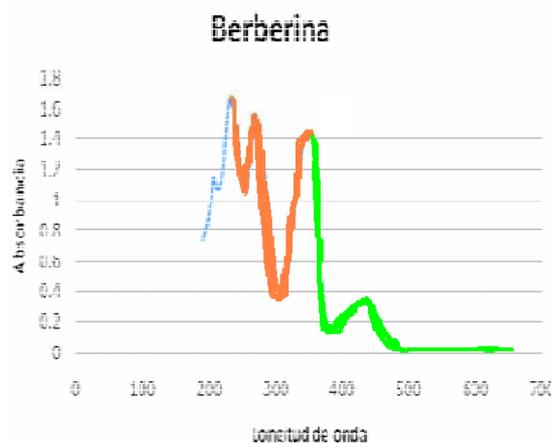
Revelador: Dragendorff

ANEXO N° 3. BARRIDOS EN EL UV- VISIBLE DE LAS FRACCIONES

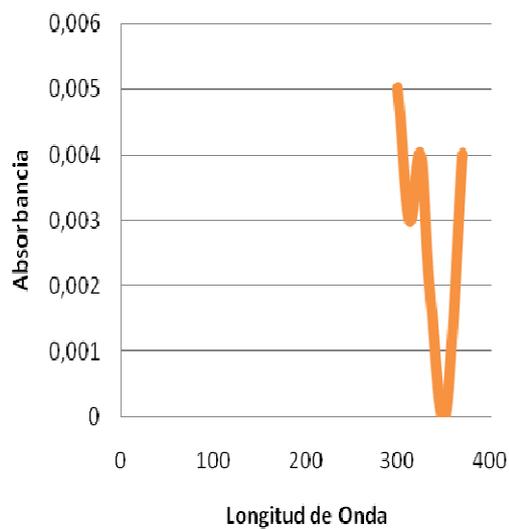
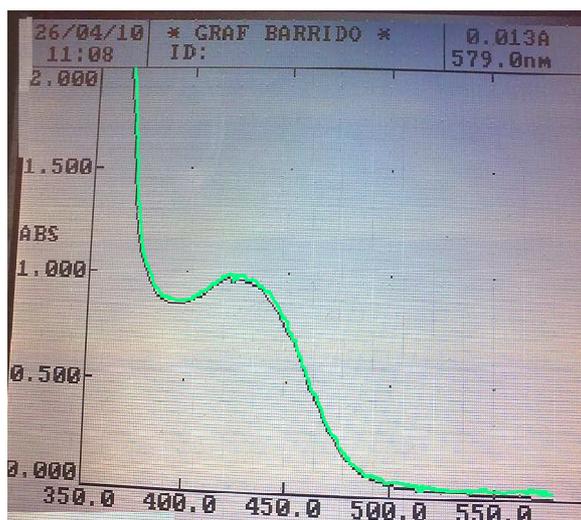
Espectrofotómetro UV Visible Unicam modelo Helios.



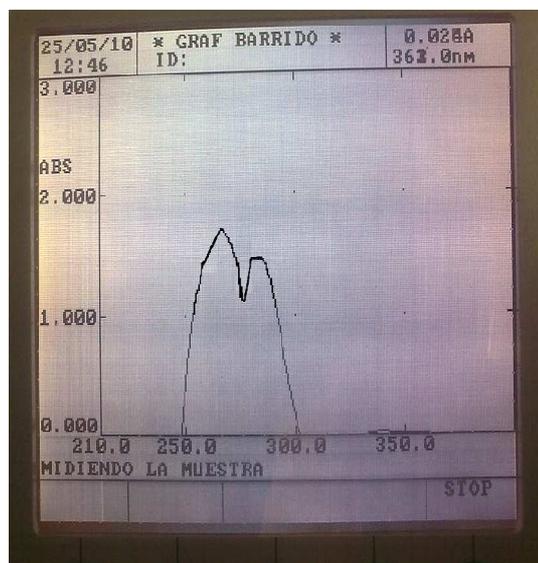
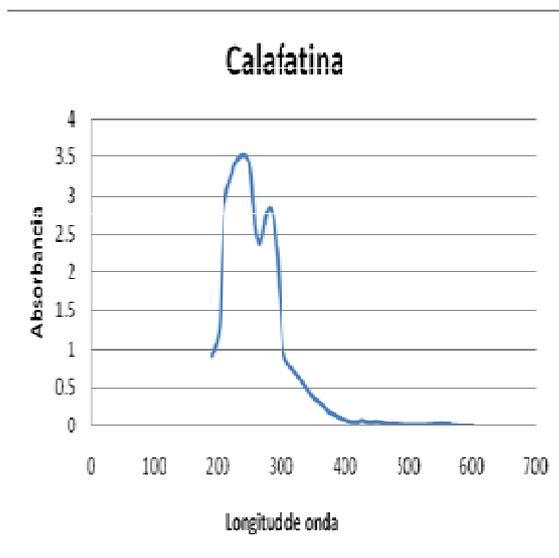
Espectro de Absorción UV de Berberina



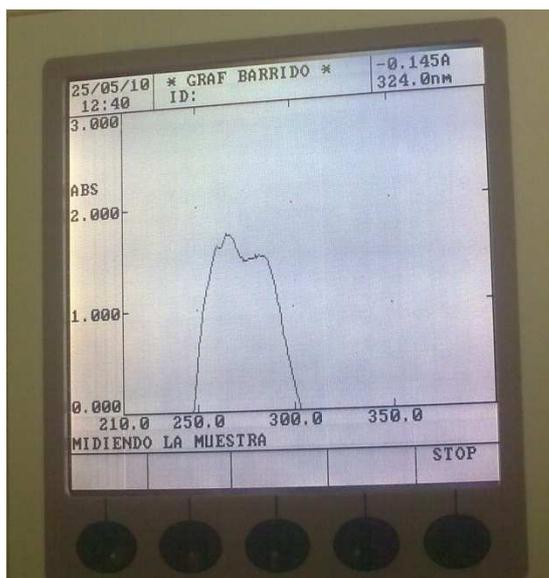
Fracciones de Berberina en B₂ sub 2



Espectro de Absorción UV de Calafatina



Espectro de Absorción UV de Lambertina



ANEXO N° 4. TABLAS DE WOODWARD – FIESER

Reglas para la Absorción de Dienos

Valor base para el dieno heteroanular	214
Valor base para el dieno homoanular	253
Incrementos por	
Doble enlace que extiende la conjugación	+ 30
Sustituyente alquilo o residuo anular	+ 5
Doble enlace exocíclico	+ 5
Agrupamientos polares: OAc	+ 0
OAlq.	+ 6
SAlq.	+ 30
Cl, Br	+ 5
N(Alq) ₂	+ 60
Corrección por solvente	+ 0
	<u>λ_{calc} = total</u>

Cálculo de la Banda Principal de los derivados del Benceno

ArCOR/ArCHO/ArCO ₂ H/ArCO ₂ R	EtOH λ _{máx} (nm)
Carbóforo padre: Ar = φ	
G = alquilo o residuo anular (por ejemplo, ArCOR)	246
G = H ₂ (ArCHO)	250
G = OH, OAlq, (ArCO ₂ H, ArCO ₂ R)	230
Incremento por cada sustituyente en Ar:	
—Alquilo o residuo anular	o ⁻ , m ⁻ + 3
	p ⁻ + 10
—OH, —OMe, —OAlq	o ⁻ , m ⁻ + 7
	p ⁻ + 25
—O (oxianión)	o ⁻ + 11
	m ⁻ + 20
	p ⁻ + 78 ^a
—Cl	o ⁻ , m ⁻ + 0
	p ⁻ + 10
—Br	o ⁻ , m ⁻ + 2
	p ⁻ + 15
—NH ₂	o ⁻ , m ⁻ + 13
	p ⁻ + 58
—NHAc	o ⁻ , m ⁻ + 20
	p ⁻ + 45
—NHMe	p ⁻ + 73
—NMe ₂	o ⁻ , m ⁻ + 20
	p ⁻ + 85

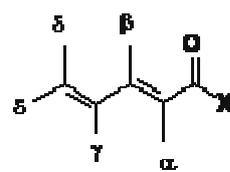
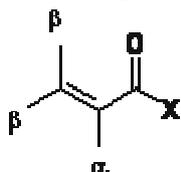
Reglas para Carbonilos (α , β - insaturados)

$\begin{array}{c} \beta \quad \alpha \\ \quad \\ \beta - C = C - C = O \\ \text{Enona} \end{array}$		<p>y</p>	$\begin{array}{c} \delta \quad \gamma \quad \beta \quad \alpha \\ \quad \quad \quad \\ \delta - C = C - C = C - C = O \\ \text{Dienona} \end{array}$	
<i>Valores básicos</i>				
cetonas acíclicas α, β -insaturadas				215
cetonas α, β -insaturadas cíclicas de seis miembros				215
cetonas α, β -insaturadas cíclicas de cinco miembros				202
aldehídos α, β -insaturados				210
ácidos y ésteres carboxílicos α, β -insaturados				195
<i>Incrementos por</i>				
Doble enlace que extiende la conjugación				+ 30
Grupo alquilo, residuo anular				+ 10
		α		+ 12
		β		+ 18
		γ y superior		+ 35
Agrupamientos polares: —OH		α		+ 30
		β		+ 50
		δ		+ 6
	—OAc	α, β, δ		+ 35
	—OMe	α		+ 30
		β		+ 17
		γ		+ 31
		δ		+ 85
	—SAlq.	β		+ 15
	—Cl	α		+ 12
		β		+ 25
	—Br	α		+ 30
		β		+ 95
	—NR ₂	β		+ 5
Doble enlace exo				+ 39
Componente homodieno				
Corrección por solvente (véase la tabla siguiente)				variable
				$\lambda_{calc} = \text{total}^a$
<p>^a Los valores calculados generalmente quedan dentro de ± 3 nm de los valores observados. Las absorptividades molares de las enonas <i>cisoides</i> generalmente son menores de 10 000, mientras que las absorptividades molares de las enonas <i>transoides</i> son mayores de 10 000.</p>				
<u>Correcciones por solvente</u>				
Solvente	Corrección (nm)			
Etanol	0			
Metanol	0			
Dioxano	+ 5			
Cloroformo	+ 1			
Éter	+ 7			
Agua	- 8			
Hexano	+ 11			
Ciclohexano	+ 11			

Absorciones típicas UV/Vis para Cromóforos aislados

Cromóforo	Transición	λ_{\max}	$\log(\epsilon)$
Nitrilo	$\eta \rightarrow \pi^*$	160	<1.0
Alquino	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	3.0
Alqueno	$\pi \rightarrow \pi^*$	175	3.0
Alcohol	$\eta \rightarrow \sigma^*$	180	2.5
Éter	$\eta \rightarrow \sigma^*$	180	3.5
Cetona	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	3.0
	$\eta \rightarrow \pi^*$	280	1.5
Aldehído	$\pi \rightarrow \pi^*$	190	2.0
	$\eta \rightarrow \pi^*$	290	1.0
Amina	$\eta \rightarrow \sigma^*$	190	3.5
Ácido	$\eta \rightarrow \pi^*$	205	1.5
Éster	$\eta \rightarrow \pi^*$	205	1.5
Amida	$\eta \rightarrow \pi^*$	210	1.5
Tiol	$\eta \rightarrow \sigma^*$	210	3.0
Nitro	η to π^*	271	<1.0
Azo	$\eta \rightarrow \pi^*$	340	

Reglas de Woodward para Compuestos Carbonílicos Conjugados



Valores básicos:

X = R

Enona de partida con anillo de seis miembros o acíclica

$\lambda=215$ nm

Enona de partida en anillo de cinco miembros

$\lambda=202$ nm

Dienona acíclica

$\lambda=245$ nm

X = H

$\lambda=208$ nm

X = OH, OR

$\lambda=193$ nm

Incrementos para

Doble enlace conjugado adicional

30

Doble enlace exocíclico

5

Doble enlace endocíclico en un anillo de 5- o 7- miembros para X = OH, OR		5
Componente diénico homocíclico		39
Sustituyente alquilo o resto de anillo	α	10
	β	12
	γ o superior	18
Grupos polares		
-OH	α	35
	β	30
	δ	50
-OC(O)CH ₃	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	6
-OCH ₃	α	35
	β	30
	γ	17
	δ	31
-Cl	α	15
	β, γ, δ	12
-Br	β	30
	α, γ, δ	25
-NR ₂	β	95
Corrección por disolvente		<u>variable</u>
	λ_{\max} (calc'd)	total

Fuente: Copyright © 2002 Recursos Educativos de Química Orgánica (QUIORED) Última modificación:
agosto de 2002 (quioired@ugr.es)