

ALCALOIDES BISBENCILISOQUINOLINICOS AISLADOS DE LA ESPECIE NATIVA *Berberis glauca* (HBK) Y EVALUACION DE SU ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA

Bárbara Moreno-Murillo*, Consuelo M. de Morgensztérn*, J. Emilio Luque Z.** y Víctor Fajardo M.***

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias A.A. 43087 Santafé de Bogotá, Colombia.

**Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía A.A. 14490 Santafé de Bogotá, Colombia.

***Universidad de Magallanes, Facultad de Ciencias, Casilla 113D, Punta Arenas, Chile.

Keywords: Bioassays, insecticidal properties, antifeedant activity, *Spodoptera sunia* (Lepidoptera), *Berberis glauca* (Berberidaceae), bisbenziltetrahydroisoquinoline alkaloids, berbamine, isothalicerine, 7-O-demethylisothalicerine and O-methyl-isothalicerine.

RESUMEN

Durante el estudio de la potencial actividad tóxica del extracto alcohólico de los tallos de la especie nativa *Berberis glauca* (HBK) (Berberidaceae), se realizaron bioensayos con larvas del crustáceo *Artemia salina*, y de los insectos *Musca domestica* (Diptera) y *Spodoptera sunia* (Lepidoptera). La fracción alcaloidal soluble en CHCl_3 obtenida por extracción ácido-base del extracto etanólico mostró notable acción antialimentaria frente a larvas de 3° y 4° estadio de la polilla *S. sunia*. La separación cromatográfica guiada por bioensayos permitió aislar y purificar de la fracción de mayor actividad varios alcaloides benciltetrahydroisoquinolínicos. Por métodos espectroscópicos se identificaron berbamina, isotalicerina, O-metilisotalicerina y 7-O-demetilisotalicerina. Este es el primer reporte sobre la presencia de bases diméricas bisbenciltetrahydroisoquinolínicas (bbi) en especies de *Berberis* colombianas. Además se detectó la presencia de una base dimérica novedosa de PM 712 cuya elucidación estructural no se ha establecido en forma completa.

ABSTRACT

During the evaluation of the toxic activity of the alcoholic extracts of the columbian specie *Berberis glauca* (HBK) (Berberidaceae), through bioassays with larvae of *Artemia salina*, *Musca domestica* (Diptera) and *Spodoptera sunia* (Lepidoptera), the alcaloidal fraction have showed notable antifeedant action to 3th and 4th instar larvae of *S. sunia*. Bioassay guided chromatographic separation from the active fraction led to isolate and purify several bisbenziltetrahydroisoquinoline alkaloids. In this work we present the identification by spectroscopic technics of berbamine, isothalicberine, O-methylisothalicberine y 7-O-demetil-isothalicberine. This is the first report of these compounds in native columbian species of genus *Berberis*. Besides we have detected a novedous dimeric derivative which characterization will be describe later.

INTRODUCCION

En Colombia, los cultivos y cosechas, principales fuentes de divisas sufren la acción de diversas plagas generando grandes pérdidas económicas y severo deterioro al entorno ecológico. Durante la última década el descubrimiento de sustancias naturales vegetales con propiedades insecticidas, antiapetentes, inhibitorias de crecimiento o antagonistas de algunos biometabolitos, ha impulsado la búsqueda bioracional de agentes naturales de control, selectivos y específicos, por medio de bioensayos en laboratorio y de campo utilizando larvas de insectos reconocidos como plagas (1,2). La familia Berberidaceae es una reconocida fuente de alcaloides isoquinolínicos con estructuras novedosas como las bases diméricas bisbenziltetrahydroisoquinolínicas (bbi) y relacionadas las cuales presentan un amplio rango de acción farmacológica (3,4), citotóxica, antimalárica (5) y actividad fotosensibilizadora contra insectos, como lo reportado para *Berberis aristata* (6). En Colombia existen cerca de 70 especies nativas pertenecientes al género *Berberis*, único representante de la familia Berberidaceae en el Hemisferio sur (7,8), de las cuales se han descrito cerca de 50, utilizadas en medicina popular, en diversas regiones. La mayor parte son arbustos que crecen en los páramos entre 2500 y 3500 msnm y sobre ellas se han realizado algunos estudios preliminares en la especie *B. rigidifolia* (9,10). La especie *Berberis glauca* (HBK) conocida como "espuelo" se utiliza en terapéutica tradicional en la Sabana de Bogotá y no ha sido analizada desde el punto de vista de sus constituyentes químicos. Se seleccionaron larvas de *Spodoptera sunia* por ser un reconocido gusano trozador, cogollero del maíz y del arroz, cuyos cultivos se ven afectados seriamente por la presencia de esta plaga. Las larvas de *Musca domestica* se utilizaron en base a su reconocida resistencia y el ensayo con *Artemia salina* como prueba general de toxicidad. En este

trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación preliminar de la potencial acción antialimentaria e insecticida de la especie *B. glauca*, así como algunos de los alcaloides identificados en el extracto clorofórmico alcalino.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Los tallos y hojas de *B. glauca* (HBK) se colectaron en el Jardín Botánico José Celestino Mutis de la ciudad de Santafé de Bogotá en octubre de 1993 y la especie fue clasificada por el Pbro. Luis A. Camargo. Un ejemplar reposa en el Herbario Nacional Colombiano.

Extracción

La muestra seca y molida (970 gr) se extrajo con etanol del 96% por percolación en frío, de manera exhaustiva y los extractos se concentraron a presión reducida, obteniéndose un jarabe denominado extracto total ET (72 gr); una parte de ET (34 g.) por tratamiento ácido-base produjo los extractos clorofórmicos ácido (I) y alcalino (II) de alcaloides terciarios (2,45 gr); el residuo acuoso se acidificó a pH 3, por adición de un exceso de NaI y extracción con CHCl_3 se obtuvo el extracto orgánico (III) de las bases cuaternarias. Todos los extractos se probaron con el Bioensayo general de toxicidad con *A. salina* (11) (BGT-As), en el bioensayo de contacto forzado con larvas de *M. domestica* (BCF-Md) y en los ensayos de actividad antialimentaria e insecticida con larvas de la polilla *S. sunia* (BAA-Ss y BAI-Ss).

Separación cromatográfica

Se realizó por columna (CC) repetitiva de cada extracto con mezclas de CHCl_3 -MeOH de polaridad creciente, la cual permitió la separación de varios alcaloides, los cuales se purificaron por CC repetitiva y Cromatografía en Capa Delgada (CCD) preparativa. Por métodos espectroscópicos (UV, RMN¹H y EM) se identificaron los derivados bisbenciltetrahydroisoquinolínicos 1 a 4; del extracto III se aislaron una oxoaporfina y dos derivados protoberberínicos además de berberina.

Bioensayos

Para evaluar la acción tóxica general se aplicaron bioensayos con larvas (nauplii) del crustáceo *A. salina* (11) y larvas de 3^{er} y 4^o estadios de *M. domestica* (12). El bioensayo con las larvas de *S. sunia* se diseñó con el objetivo de determinar su actividad tóxica y/o antialimentaria (antifeedant). Para evaluar los efectos tóxicos por ingestión se utilizaron dietas artificial y natural. La dieta artificial se mezcló con los extractos según el método reportado por Kabir (13); se utilizaron soluciones al 2% en mezcla

hidrometanólica al 40% y un g. de dieta (I4) recién preparada se mezcló con cinco concentraciones (0.05% hasta 1%) de cada extracto, en 5 replicaciones y se depositaron en vasos plásticos, cubriéndolos con papel de Aluminio. Larvas de 3^{er} y 4^{to} estadio se dejaron en ayuno por 8 horas (h) y luego se colocaron 3 larvas por vaso, dejándolas alimentarse con la dieta artificial tratada; los vasos se trasladaron a un cuarto con T media de 20°C, HR del 90% y fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se elaboró un control con 3 larvas en dieta tratada con metanol al 40%, un testigo absoluto y como referencia se utilizó una solución de Methamidofos (MAP) a 10 ppm. Se realizaron observaciones cada 24 horas por diez días o hasta la iniciación del estado de pupa; las larvas se clasificaron como vivas o muertas y se anotó todo cambio de aspecto o conducta. Como dieta natural se utilizaron hojas frescas de higuierilla (*Ricinus comunis*, Euphorbiaceae), especie hospedera de esta polilla. En una caja de Petri se colocó un trozo rectangular (5cm x 4cm) de lámina foliar previamente sumergida en las distintas soluciones a probar, por triplicado. Se aplicaron 5 concentraciones de cada muestra a saber: 1%, 0,50%, 0,25%, 0,10% y 0,05%; el tiempo de inmersión fue de 50 a 60 seg y se dejó volatilizar el exceso de solvente durante 30 min; a cada caja de Petri se trasladaron 2 larvas de tamaño similar de 3^{er} estadio de *S. sunia*, en ayuno previo durante 8 h; cada 24 h se midió el % de consumo de lámina foliar (CLF) y se observó el comportamiento de cada larva. Como control se colocaron dos larvas en dieta sin muestra, tratada con el solvente utilizado (testigo relativo), además del testigo absoluto.

Análisis cromatográfico y espectroscópico

En este estudio se utilizaron adsorbentes y eluentes Merck analíticos o técnicos destilados. Los puntos de fusión se reportan sin corregir. Los espectros de RMN se registraron en un equipo Bruker WP80 y AMX 500 en CDCl₃. Los UV se registraron en un equipo Shimadzu modelo 9020 en Metanol con adición de reactivos de desplazamiento. Los espectros de masas se realizaron en equipo Finnigan en un rango entre 49 y 790 uma en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Karachi, Pakistán.

DISCUSION DE RESULTADOS

Evaluación de la actividad insecticida y antialimentaria

Los resultados de los bioensayos realizados al extracto etanólico total (ET) y a los extractos clorofórmicos alcaloidales, con larvas de *A. salina* (BGT-As) y *M. domestica* (BCF-Md) se presentan en la tabla 1 expresados como mortalidad media (M); se observó actividad significativa de los extractos ET y II frente a *A. salina* pero poco o ningún efecto sobre las larvas de *M. domestica*. La mayor actividad se concentró en el extracto alcalino II, el cual presentó el mayor efecto tóxico (tabla 2) así como la mayor acción

Tabla 1.- Mortalidad media (M) de larvas en los bioensayos con *Artemia salina* (BGT-As) y *Musca domestica* (BCF-Md) con los extractos total y alcaloidales (I,II,III) de la parte aérea de la especie *Berberis glauca*.

EXTRACTOS	CONCENTRACION (ppm)	BGT-As (M) ^a	BCF-Md (M) ^a
E. T.	1000	100	20
	100	60	12
	10	10	0
I	1000	65	10
	500	41	0
	50	32	0
II	1000	100	20
	500	100	8
	50	72	5
III	1000	100	4
	500	90	4
	50	54	0
Testigo absoluto	0	0	2
Patrón (MAP) ^b	10	100	100
Testigo relativo	-	0	1

^a Valores evaluados por análisis de varianza Probits y prueba múltiple de Duncan.

^b Methamidophos.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad media (M) de larvas de *Spodoptera sunia* en el Bioensayo de Actividad Insecticida y consumo de dieta artificial (CDA), tratada con el extracto II de *Berberis glauca*.

C (%)	1,00	0,50	0,25	0,10	0,05	Testigo	Tiempo
M (%) ^a	46	28	23	10	8	0	10
CDA(%)	5	8	15	20	22	30	5

^a: Datos evaluados por análisis de varianza y Prueba múltiple de Duncan.

C: concentración (% p/v). Tiempo en días.

Tabla 3 . Actividad antialimentaria del extracto alcaloidal II de *Berberis glauca* frente a larvas de *Spodoptera sunia*, con dieta natural a varias concentraciones, expresada como % de consumo de lámina foliar

C (%)	Consumo de lámina foliar (% CLF)					Promedio
	1	2	3	4	5	
1,00	5	8	7	5	8	6,6
0,50	8	10	11	12	10	10,2
0,25	15	18	12	15	16	15,2
0,10	25	24	32	25	30	27,2
0,05	45	50	60	50	48	50,6
Testigo	80	85	75	65	90	79,0

Datos evaluados por análisis de varianza Probits y prueba múltiple de Duncan.

antialimentaria (tabla 3) sobre las larvas de *S. sunia*, lo cual nos llevó al estudio químico de este extracto. La figura 1 compara el consumo de la dieta natural expresado como % de lámina foliar (CLF) y el porcentaje de dieta artificial (CDA) ingerida en 5 días a las concentraciones utilizadas, presentado por las larvas de *S. sunia* tratadas con el extracto alcaloidal II, indicativo de un efecto disuasivo del proceso alimenticio que correlaciona bien con la dosis aplicada. La figura 2 muestra la mortalidad media observada en el ensayo de acción tóxica con dieta artificial para el extracto II, observándose mortalidad significativa, además de diversos cambios cualitativos de comportamiento y morfológicos tales como aparición de manchas, inflamaciones a nivel abdominal y pérdida de fluidos cuticulares en las larvas tratadas con las mayores concentraciones, efectos similares a los observados cuando se aplican pesticidas sintéticos, observaciones que sugirieron el estudio de los constituyentes químicos de esta fracción alcaloidal.

Composición Química del Extracto Alcaloidal II.

Del extracto II se separó el compuesto mayoritario **1** (40 mg, Rf 0,30, CHCl₃-MeOH (85:15)) como cristales amarillos de p.f. 154-156°C. El espectro UV en MeOH mostró una banda intensa a 284 nm (log ϵ = 2,50), que desplaza a 310 nm por adición de bases, presentando fluorescencia azul al UV. El espectro IR en KBr presenta una absorción intensa a 2875 cm⁻¹ asignada a N-CH₃ y bandas típicas de aromaticidad. El espectro de RMN de ¹H (500 MHz) registra los desplazamientos anotados alrededor de la estructura **1**, característicos de alcaloides diméricos de la serie bisbenciltetrahydroisoquinolínica (bbi), con uniones cabeza-cabeza y éter difenilo a través de C8-C6' o C7-C6' y cola-cola entre C11 y C12' de los residuos N-metil-coclaurínicos. El espectro de masas por ie a 70 ev de baja resolución

ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA
Bioensayo con larvas de *S. sunia* - Extracto II *B. glauca*

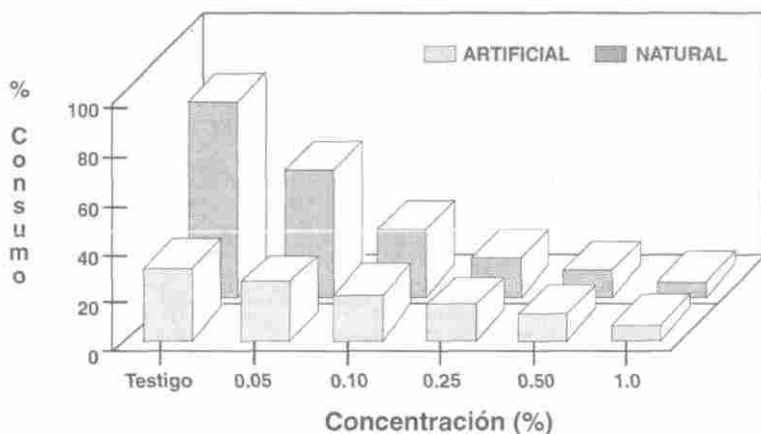


Figura 1.
 Porcentaje (%) de consumo de dieta artificial (CDA) y natural (CLF) ingerido en 5 días por larvas de *S. sunia* a 5 concentraciones.

ACTIVIDAD INSECTICIDA
Bioensayo con larvas de *S. sunia* - Extracto II *B. glauca*

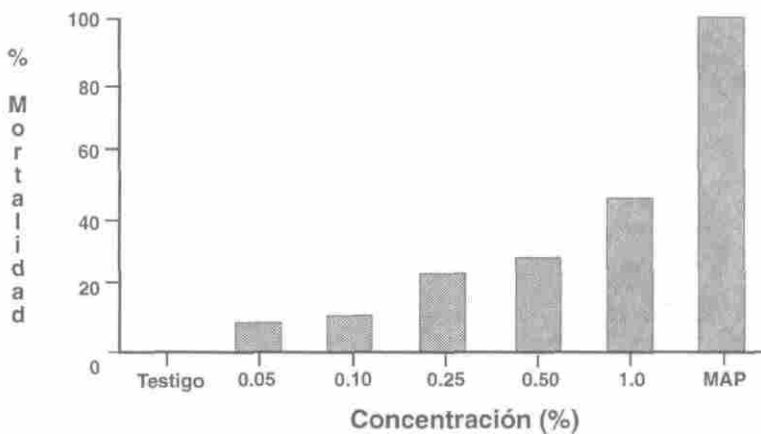


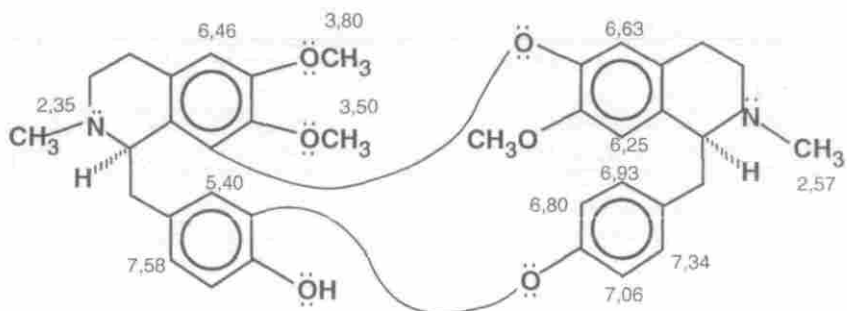
Figura 2.
 Porcentaje (%) de mortalidad de larvas de *S. sunia* en BAI-Ss con dieta artificial a 5 concentraciones, a los 10 días.

presentó un ión molecular a $m/z = 608,3$ (67) para $C_{37}H_{40}N_2O_6$ con PB a $m/z = 198,1$ (100) señal correspondiente al fragmento con doble carga típico de las bbi, formado por la pérdida de los anillos E y F (15,16). Así mismo se observó una señal intensa a $m/z = 396(66)$ que con el PB y el ión a $m/z = 501(M^+ - 107)$, dan evidencia del puente difeniléter entre las porciones isoquinolónicas las cuales permanecen unidas (15); el ión a $m/z = 577$ se asigna a la pérdida de un grupo $O-CH_3$. Los fragmentos formados por la ruptura benfílica con carga simple y doble confirman la presencia de 2 grupos N-Me, confirmados en el espectro de RMN 1H (δ 2,57 s, 2,35 s) así como tres grupos metoxilos a δ 3,50, 3,80 y 3,75 ppm. Además se observa una señal singulete a $\delta = 6,25$ asignada al H en C-8'. El análisis anterior lleva a proponer para **1** la estructura de la isotalicberina, base aislada previamente de *B. laurina* y *B. chilensis* (17,18).

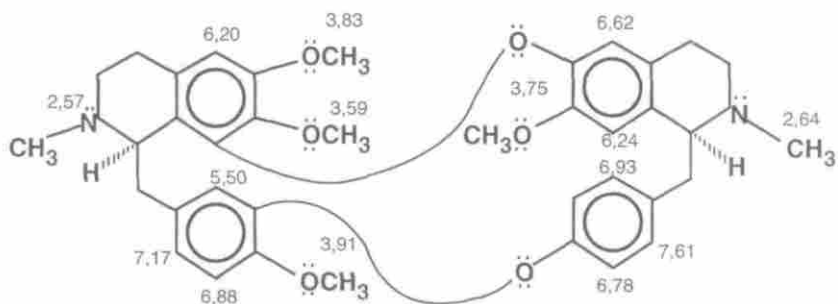
El compuesto **2** presentó un espectro de RMN 1H similar al del producto **1** con un singulete adicional para un grupo metoxilo a $\delta = 3,91$ y un espectro UV con máximo a 282 nm inalterable por adición de bases que lo caracteriza como no fenólico, con p. f. en el rango de 205-207°C; el espectro de masas por ic presenta M^+ a $m/z = 622$ (55) con PB a $m/z = 198$ (pérdida de los anillos E y F). Los datos del espectro de RMN 1H a 500 MHz del compuesto **2** se incluyen alrededor de la estructura **2**. Del análisis comparativo de los datos espectrales se propone para **2** la estructura de la O-metilisotalicberina reportada en *B. laurina* y *B. chilensis* (17,18).

Un tercer compuesto **3** presente en menor cantidad, mostró un M^+ a $m/z = 594$ (8) con un PB a $m/z = 381(100)$ por la pérdida de los anillos E y F. El ión de doble carga aparece a $m/z = 190$ y éste, pierde un grupo metilo y da origen al ión a $m/z = 175(98)$; la presencia del ión a $m/z = 563$ se asigna al fragmento ($M^+ - O-CH_3$). El espectro de RMN 1H es similar a los anteriores pero sólo aparecen dos señales atribuibles a grupos $O-CH_3$; el estudio comparativo de los espectros permitió asignar a **3** la estructura de la 7-O-desmetilisotalicberina (19).

El compuesto **4** (22mg) por sus datos espectrales y cromatográficos fue identificado como la (+)-berbamina base dimérica bbi, de PM 608,3 para una fórmula molecular $C_{37}H_{40}N_2O_6$ y PB a $m/z = 396$ por las rupturas benfílicas y la señal a $m/z = 198(95)$ asignable al ión de doble carga propio de estas bases. En el espectro de RMN 1H se ven 3 grupos O-Me a δ 3,72, 3,61 y 3,20. La señal a 2,57 ppm se asigna al grupo N- CH_3 del C-2' y el metilo C-2 aparece a 2,25 ppm. La señal múltiple para dos H a $\delta = 3,84$ se atribuye a los hidrógenos en C1 y C1' (19). Entre las bases menores se detectó un compuesto novedoso de PM = 712, el cual se altera al aire y a la luz, cuya estructura no ha sido definida completamente, y en la actualidad se adelanta la purificación de mayor cantidad de compuesto.



1



2

CONCLUSIONES

En el extracto cloroformico alcaloidal II separado por extracción ácido-base del extracto total etanólico de la especie nativa *B. glauca* se reporta la presencia de varios derivados hisbencilisoquinolónicos de la serie de la talicberina, identificados como isotalicberina, O-metil-isotalicberina y 7-O-desmetilisotalicberina, berbamina además de berberina. Estos compuestos forman parte del extracto II el cual presentó la mayor actividad antialimentaria frente a las larvas de *S. sunia*, así como notables efectos tóxicos. Estos resultados muestran preferencia por la dieta natural frente a la dieta artificial, hecho atribuible a las características de aspecto y textura de la misma y a posible menor absorción de los extractos en prueba. Cabe anotar que este es el primer informe sobre la composición química de la especie nativa *B. glauca*, de aplicación terapéutica, y se continúa el estudio de estos compuestos con el fin de determinar su selectividad frente a larvas de otros insectos.

Isotalicberina (**1**) sólido cristalino amarillo pf 154-156° C. UV a $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 284 (3,90); (MeOH+ OH⁻) 310 (1,5). PM 608,3 (M⁺, C₃₇H₄₀N₂O₆)(67), 501 (M⁺ -107)(8), 417 (9), 396(68), 198(100). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) 2,35 (s, 3H, N-Me C-2), 2,57 (s, 3H, N-Me C-2'), 3,50, 3,75, 3,80 (s, 3H, O-Me en C-7, C-7' y C-6) 5,40 (s, 1H, H-10), 6,25 (s 1H, H-8'), 6,46 (s, 1H, H-5), 6,63 (s, 1H, H-5'), 6,80 (dd, 1H, H-11'), 6,93 (dd, 1H, H-10'), 7,06 (dd, 1H, H-13'), 7,34 (dd, 1H, H-14'), 7,58 (dd, 1H, H-14).

O-Metilisotalicberina (**2**) sólido amorfo, p.f. 205-207°C. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 284(2.5), PM = 622, C₃₈H₄₂N₂O₆ (55), 396 (80), 198(100). RMN ¹H 500 MHz CDCl₃,) 2,57 (s, 3H, N-Me C-2), 2,64 (s, 3H, N-Me C-2'), 3,50, 3,78, 3,83 y 3,91 (s, 3H, O-Me en C-7, C-7', C-6 y C-12) 6,20 (s, 1H, H-5) 6,62 (s, 1H H-5'), 6,24 (s, 1H, H-8'), 5,50 (d, 1H, H-10), 6,78 (q, 2H, H-11' y 13'), 6,93 (d, 1H, H-10'), 7,61 (dd, 1H, H-14', Jo= 8Hz y Jm= 2Hz).

7-O-Desmetilisotalicberina (**3**) sólido de PM 594 (M⁺, C₃₆H₃₈O₆N₂) (10), 487(8), 381(100), 183(40). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃,) 2,50 (s, 3H, N-Me C-2), 2,55 (s, 3H, N-Me C2'), 3,78 3,85 (s, 3H, O-Me C-7' y C-6) 5,45 (s, 1H, H-10), 6,25 (s, 1H, H8'), 6,45 (s, 1H, H-5), 6,65 (s, 1H, H-5'), 6,75 (dd, 2H, H-11' y H-13'), 6,90 (d, 1H, H-10', Jo= 8Hz, Jm= 2Hz), 7,54 (dd, 1H, H-14').

(+) Berbamina (**4**). Sólido amorfo, PM 608,3 (M⁺, C₃₇H₄₀N₂O₆)(90), 594(25), 396(100), 382(56) 198(90), 175(50). $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 232(h), 284(4.0) NMR ¹H (500 MHz, CDCl₃,) 2,25 (s, N-CH₃ C-2), 2,57 (s, N-CH₃ C-2') 3,8 a 3,9 (m, 2H, H1 y H1'), 3,20 3,61 3,72 (s, 3H, O-Me de C-7, C-6' y C-6), 6,35

(s, 1H, H-5), 6,70 (s, 1H, H-5'), 3,47 (m, 4H, H y '), 6,89 (dd, 1H H-13), 6,80 (dd, 1H H-14 $J_o = 8$ Hz, $J_m = 2$ Hz) 7,09 (dd, 1H, H-13', $J_o = 8$ Hz, $J_m = 2$ Hz), 7,47 (dd, 1H, H-14', $J_o = 8$ Hz y $J_m = 2$ Hz) 6,50 (dd, 1H H-10', $J_o = 8$ Hz, $J_m = 2$ Hz) 6,70 (dd, 1H h-11'), 6,03 (s, 1H, H-10), 6,27 (s, 1H, H-8').

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de Colciencias 008-94, Cíndec 803209, Proyecto Fondecyt 1941117, a la Universidad de Magallanes y al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Karachi, Pakistán por el registro de los espectros de RMN y de Masas así como al Ing. Francisco Sánchez del Jardín Botánico por la muestra.

BIBLIOGRAFIA

1. Jacobson, M. Botanical pesticides. *In Insecticides of Plant Origin ACS Symposium Series 387* Arnason J.T., Philogène B. & Morand P., Eds, Washington D.C. **1989**. p 1.
2. Saxena R.C. Insecticides from Neem *In Insecticides of Plant origin ACS Symposium Series 387* Arnason J.T., Philogène B. & Morand P., Eds, Washington D.C. **1989**. p 110.
3. Fajardo, V. y Podestá, F. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1985**, 16, 59 y 66.
4. Kanyinda, B., Vanhaelen-Pastre, R. & Vanhaelen M. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 618.
5. Likitwitayawuid, C., Cordell, G., Pezzuto, J. & Ruangrunsi, C. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 30.
6. Secoy, D. M. & Smith, A. E. Use of Plants in Control of Agricultural and Domestic Pests. *Economic Botany* **1983**, 37, 28.
7. García-Barriga H. *Flora Medicinal de Colombia* **1972**, Vol 2, 308-317.
8. Camargo, L.A. *Caldasia*, **1981**, XIII, 203.
9. Young S. y Morgenstern, C. *Rev. Col. Quim.* **1990**, 19(1), 127.

10. Escobar, M., Young, S., Ramnussen, H. & Rodríguez, E. *Rev. Col. Quim.* **1990**, 19(2), 55.
11. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. & McLaughlin J. L. *Planta Medica* **1982**, 45, 31.
12. Calle J., Rivera A., Niemeyer, H. & Nathan P. J. *Rev. Col. Quim.* **1991**, 20, 94.
13. Kabir K. H., Chapman R.B. & Penman D. R. *Proc. 43th N.Z. Weed and Pest Control Conference* **1990**, 278.
14. López-Avila, A. M.Sc. Tesis ICA - Universidad Nacional de Colombia, **1984**.
15. Baldas J., Bick I. R., Ibuka T., Kapil, R. S. & Portyer Q. N. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions I*, **1972**, 592.
16. Baldas J., Bick I. R., Falco M. R. & Porter Q. N. *J. Chem Soc. Perkin Transactions I*. **1972**, 597.
17. Falco, M. R., De Vries, J. X., Brovetto, A. G., Maccio, Z. & Rebuffo S. *Tetrahedron Letters*. **1968**, 1953.
18. Torres R. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **1983**, 28(2), 381.
19. Fajardo M. Víctor, M.- *Estudio Químico de Berberis de Chile*. Tesis Doctoral Universidad de Chile. **1984**.