

ESTUDIO PRELIMINAR DE FOTOTOXICIDAD DEL SULFATO DE BERBERINA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Berberis Rigidifolia* H.B.K.

M. Escobar O., S. de Young*, H. Ranmussen**, S. Castaño M.**,
E. Rodríguez**

*Departamento de Química - Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia - A.A. 14490 Bogotá, Colombia

**Universidad de California, Irvine

Keywords: Berberine, phototoxicity, alkaloids.

RESUMEN

Se estudió la fototoxicidad del extracto etanólico de *B. rigidifolia* y del sulfato de berberina obtenido a partir de esta planta, empleando la luz U.V. cercana.

Con la bacteria *Streptococcus lactis* se hicieron ensayos de halo de inhibición y mediante turbidimetría se observó el efecto que tenían estos dos materiales sobre el crecimiento de la bacteria en presencia y en ausencia de oxígeno.

Se determinó la citotoxicidad de los dos materiales sobre células del ovario de hamster chino (CHO).

El ensayo turbidimétrico indicó que la fototoxicidad del sulfato de berberina es debida probablemente a la producción de oxígeno singulete y no por su unión al ADN.

De los ensayos realizados se encontró que el extracto etanólico es más fotoactivo que el sulfato de berberina.

ABSTRACT

The phototoxicity of the ethanol extract of *B. rigidifolia* and berberine sulfate, obtained from the berberine extracted from this plant, was studied in the near U.V. light.

Inhibition halo tests and turbidimetric assays were carried out using the bacterium *Streptococcus lactis*, the latter in the presence and absence of oxygen.

The cytotoxicity of both products was determined using CHO CELLS (Chinese Hamster Ovary Cells).

The turbidimetric experiments showed that the phototoxicity of the berberine sulfate probably depends on the generation of singlet oxygen and not on binding to DNA.

The ethanol extract is more phototoxic than berberine sulfate in these assays.

INTRODUCCION

Berberis rigidifolia es una planta endémica de Cundinamarca que ha sido estudiada en el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, dentro del Proyecto de Investigación "Estudio de los Alcaloides del Género *Berberis*". Gracias a esta investigación se conoce que esta planta presenta un alto contenido de alcaloides del tipo isoquinoleínico, siendo la berberina el más abundante (1). Este alcaloide tiene una diversidad de actividades biológicas: un amplio espectro como agente antibacteriano (2) y antiprotozoario (3), siendo útil en el tratamiento de enfermedades cutáneas, amibiasis (4), gastroenteritis (5) y se ha propuesto como un fármaco para combatir la malaria, aunque sin prueba experimental concluyente (6). Además es conocida su acción fototóxica contra el mosquito *Aedes atropalpus* y las células del ovario de hamster chino (7).

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron el extracto etanólico de *B. rigidifolia* y el sulfato de berberina, obtenido a partir de esta planta.

Se hicieron ensayos de fototoxicidad con cultivos de *Streptococcus lactis*. También se emplearon cultivos de células CHO (Chinese Hamster Ovary Cells).

Halo de Inhibición. Utilizando el medio tripticasa de soya (Sigma) al 30% y agar Difco, al 6% se prepararon 10 cajas de Petri y se sembraron con *Streptococcus lactis*. Posteriormente, en discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro se colocaron, en cada caja, 10 μ l de solución etanólica de sulfato de berberina 0,1; 1 y 10 mg/ml, 10 μ l de una solución etanólica de 8-Metoxipsoraleno (8-MOP) mg/ml y 10 μ l de etanol. Un procedimiento similar se siguió con el extracto etanólico de *B. rigidifolia*.

La mitad de las cajas de cada ensayo se expusieron a la luz U.V. (350 nm, 12 W/m²) por media hora a temperatura ambiente y se dejaron en incubación por 12 horas a 37°C, después de lo cual se comparó la amplitud del halo en el cual no crecían bacterias alrededor de cada disco (Tabla 1).

Ensayo Turbidimétrico. 100 ml de medio líquido tripticasa de soya 30% se inocularon con *Streptococcus lactis*. El cultivo se dejó a 37°C con una agitación de 1 RPM por 30 horas hasta alcanzar una absorbancia 100 veces mayor que la del medio de cultivo. De esta solución se tomaron 6 ml y se completaron a 600 ml con medio fresco. De aquí se tomaron luego 113 ml para hacer el ensayo con sulfato de berberina 300 μ g/ml, 8-MOP, 50 μ g/ml, un blanco y un control de etanol, pues debido a que el extracto etanólico no es soluble en agua, éste se

Tabla 1
HALO DE INHIBICIÓN EN PRESENCIA DE LUZ U.V.

Sulfato de Berberina mg/ml			Extracto Etanólico mg/ml		
0.1	1	10	0.1	1	10
Diámetro %					
0	1	10	0	1	11
0	0	9	0	4	17
0	0	14	0	2	15
0	1	8	0	1	18
0	0	11	0	0	18
Promedio					
0	0.4	10,4	0	1,6	15,8

Luz U. V. 350 nm, 12 w/m²

Los datos se reportan como diámetros del halo de inhibición relativo al producido por el 8-MOP, tomando este último como 100%.

En ausencia de luz U.V. ninguno de los ensayos presentó halo de inhibición. El etanol no presentó halo de inhibición ni en presencia ni en ausencia de luz U.V.

agregó disuelto en 2 ml de etanol. Con el fin de tener condiciones similares en todos los ensayos, se añadieron 2 ml de etanol a las alícuotas restantes excepto al blanco. Al ensayo con extracto etanólico se le añadieron 2 ml de medio fresco en vez de etanol.

Cada una de las alícuotas anteriores se dividió en dos porciones, una de 50 ml y otra de 55 ml. A la primera fracción se le burbujeó nitrógeno y se distribuyó en porciones de 5 ml, en tubos plásticos desechables Fisher estériles, los cuales se sellaron herméticamente con parafina. La otra fracción se dispuso en el mismo tipo de tubos desechables pero sin burbujeo de nitrógeno. De esta última fracción se tomaron 3 tubos correspondientes a cada uno de los experimentos y se dejaron en el congelador a 0°C para utilizarlos como blancos del respectivo experimento en las posteriores medidas densitométricas.

La mitad de los tubos de cada experimento se expusieron a la luz U.V. (350 nm, 12 W/m²) por media hora a temperatura ambiente y una agitación de 1 RPM, en tanto que la otra mitad se mantenía en la oscuridad en condiciones similares. Posteriormente, todos los tubos de dejaron 30 horas a 37°C con una agitación de 1 RPM. Finalmente, se midió la absorbancia de cada tubo a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman 125.

Toxicidad Hacia Células CHO. Se determinó la toxicidad del sulfato de berberina y del extracto etanólico sobre células CHO (8). El procedimiento fue el siguiente: las células fueron cultivadas en medio F-12K sin timidina ni hipoxantina, suplementado con 5% de suero fetal bovino, glutamina 2 mM y 50 µg/ml de gentamicina.

Tanto el sulfato de berberina como el extracto etanólico se disolvieron en dimetil sulfoxido (DMSO) en concentraciones de 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el sulfato de berberina y 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el extracto etanólico.

Los experimentos se realizaron en cajas de Petri plásticas Corning de 60 x 15 mm con 5 réplicas por cada ensayo. Cada una de las cajas se inoculó con 4 ml del cultivo inicial, en los que había 100 células, para lo cual se hizo un conteo en una cámara de Moss Bauer y luego la dilución adecuada. Posteriormente, las cajas se dejaron en la incubadora a 37°C por 4 horas.

Para el ensayo en la oscuridad, las células fueron tratadas con el sulfato de berberina y el extracto etanólico y se dejaron en incubación a 37°C por 1 hora.

En presencia de la luz U.V. las células fueron tratadas con las dos sustancias, se incubaron a 37°C por 52 minutos y luego se expusieron durante 8 minutos a la luz U.V. (350 nm, 12 W/m²).

En ambos casos se procedió a retirar el medio, se reemplazó por medio fresco y se continuó la incubación por una semana. Al completar el tiempo de incubación se retiró el medio, se adicionó metanol, dejándolo por 10 minutos para fijar las colonias y luego se sustituyó por cristal violeta 0,1% por 15 segundos para colorear las células. Finalmente, se lavó con agua y se procedió al conteo de las colonias.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el experimento de inhibición de crecimiento del *Streptococcus lactis* en cajas de Petri, se observó que a las concentraciones ensayadas tanto el sulfato de berberina como el extracto etanólico son fototóxicos desde 1 mg/ml. Sin embargo, la actividad del extracto etanólico fue aproximadamente 4 veces mayor que la del sulfato, a esta concentración, pero tan sólo 1,5 veces mayor a una concentración de 10 mg/ml. Además, no se observó toxicidad de ninguno de los compuestos en ausencia de luz U.V., como tampoco por parte del etanol ni en presencia ni en ausencia de luz U.V., Tabla 1.

En el ensayo turbidimétrico se observó que el sulfato de berberina es fototóxico en presencia de oxígeno, en tanto que el patrón 8-MOP es fototóxico tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Por las condiciones de este ensayo, el extracto etanólico precipitó, a pesar de haber estado soluble inicialmente, haciendo imposible la determinación turbidimétrica. No es recomendable el empleo de una mayor cantidad de etanol para disolver el extracto etanólico, pues aún a baja concentración presenta un detrimento en el crecimiento de la bacteria. Sería

más aconsejable el empleo de otro solvente como por ejemplo el DMSO. En este ensayo, no se observó ninguna toxicidad de estos compuestos en ausencia de luz U.V. Tabla 2.

Tabla 2
ENSAYO TURBIDIMETRICO*

		Porcentaje de Transmitancia						Promedio
CONTROL	N ₂	L	9,1	12,0	9,9	10,8	8,7	10,1
		O	8,0	9,8	10,1	10,1	10,8	9,8
	O ₂	L	8,0	12,2	11,6	10,6	10,5	10,2
		O	9,9	12,5	9,5	10,8	10,8	10,5
Etanol 1,7 %o v.v.	N ₂	L	11,5	11,8	13,6	18,7	18,1	14,6
	O ₂	L	11,0	11,5	12,9	16,2	12,9	12,9
8-MOP 80 µg/ml	N ₂	L	93,7	99,8	95,3	93,3	99,5	96,3
		O	13,2	12,6	16,3	13,8	16,4	14,5
Sulfato de Berberina 300 µg/ml	N ₂	L	92,5	99,5	100,0	100,0	95,3	97,5
		O	13,3	13,3	12,8	16,4	16,2	14,4
	O ₂	L	18,1	16,2	11,8	9,1	10,1	12,5
		O	12,9	13,8	16,2	17,1	11,8	14,4
	O ₂	L	18,7	29,6	32,4	26,9	24,7	26,5
		O	13,2	17,9	12,0	15,9	13,6	14,5

* L : U.V.
O : Oscuridad

Se ha comprobado que la berberina por acción de la luz U.V. genera oxígeno singulete (7), siendo esta la razón de su fototoxicidad. Sin embargo, otros autores (9) señalan que la berberina es capaz de unirse al ADN, asegurando que esta es la causa de su toxicidad. Debido a que por acción de la luz U.V., la berberina puede ser fototóxica bien por generar oxígeno singulete o por unirse al ADN o ambos (10), se diseñó el experimento con *Streptococcus lactis*, en el cual se hizo crecer la bacteria tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Los resultados de este experimento indican que la fototoxicidad del sulfato de berberina es debida probablemente a la generación de oxígeno singulete, Tabla 2. El caso contrario, se observó con el patrón 8-MOP, el cual fue fototóxico tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

A las concentraciones ensayadas no se observó toxicidad en la oscuridad.

A diferencia de los ensayos anteriores, con las células CHO se observó, que ambas soluciones presentaban cierto grado de citotoxicidad en la oscuridad, siendo esta incrementada drásticamente por acción de la luz U.V. Sin embargo, de la misma forma que en los otros ensayos, se hizo evidente una mayor fototoxicidad del extracto etanólico que del sulfato de berberina. Tabla 3.

Tabla 3
**CITOTOXICIDAD DEL SULFATO DE BERBERINA Y DEL
 EXTRACTO ETANOLICO HACIA CELULAS CHO**

Porcentaje de Supervivencia					
Sulfato de Berberina $\mu\text{g/ml}$			Extracto Etanólico $\mu\text{g/ml}$		
Dosis	Oscuridad	U. V.	Dosis	Oscuridad	U. V.
10	100	100	1	87	100
50	100	100	10	100	51
100	70	9	50	42	0
			100	0	0

En todos los ensayos realizados se observó que el extracto etanólico de *B. rigidifolia* era más activo que el sulfato de berberina. Esta es una muy importante característica, pues las sustancias activas en el extracto etanólico están diluidas por la gran cantidad de compuestos de la planta que pueden ser solubles en etanol, en tanto que el sulfato de berberina es un compuesto puro. Esto quiere decir, que o bien en el extracto etanólico hay una sustancia altamente fototóxica, diferente al sulfato de berberina; se dan interacciones sinérgicas entre los componentes del extracto que incrementan la fototoxicidad o quizás se presenta alguna combinación compleja de los factores anteriores. Para dilucidar la solución a este interrogante es indispensable continuar la investigación.

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de California, Irvine; al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y a los doctores: José Luis Villaveces, Manuel Arregullín y Bruce Cassels por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Aristizábal, C., Castro, D., Torres de Young, S., Revista Colombiana de Química, **1990**, **90**, 8234.
2. Chatterjee, S., Et al, Biochim Biophys Acta, **1975**, **402**, 161.
3. Subbaiah, T., Amin, H., Nature, **1967**, **15**, 527.
4. Dutta, N., Iyer, N., J. Indian Med. Ass., **1968**, **50**, 349.
5. Sharda, D., J. Indian Med. Ass., **1970**, **54**, 22.
6. Hanh, F., Clark, J., Antibiotics, S.P.B.H.: New York, **1975**, pp. 577-584.
7. Philogene, P., et al, J. Chemical Ecology, **1984**, **10**, 115.

8. Patrick, J., et al, *Mutation Research*, **1977**, 45, 91.
9. Maiti, M., Chaudhuri, K., *Indian J. Biochem. Biophys.*, **1981**, 18, 245.
10. Kendric, C., *The Science of Photobiology*, Plenum Press: New York, **1988**, pp. 83-85.