



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Tabernaemontana alba Y *T. arborea*: PRESENCIA DE
ALCALOIDES Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA

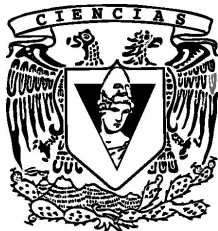
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FELIX KRENGEL



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Krengel
Apellido materno	
Nombre(s)	Felix
Teléfono	59 15 19 35
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	409490097
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dra.
Nombre(s)	Josefina
Apellido paterno	Herrera
Apellido materno	Santoyo
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	Eva
Apellido paterno	Aguirre
Apellido materno	Hernández
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Dra.
Nombre(s)	Ana María
Apellido paterno	García
Apellido materno	Bores
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	M. en C.
Nombre(s)	Rubén
Apellido paterno	San Miguel
Apellido materno	Chávez
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	M. en C.
Nombre(s)	Beatriz
Apellido paterno	Zúñiga
Apellido materno	Ruiz
7. Datos del trabajo escrito	7. Datos del trabajo escrito
Título	<i>Tabernaemontana alba</i> y <i>T. arborea</i> : Presencia de
Subtítulo	alcaloides y su actividad biológica
Número de páginas	52 p
Año	2013

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado una formación académica y humana de excelencia.

A la Dra. Josefina Herrera Santoyo por la dirección de la presente tesis y su incondicional apoyo durante los últimos años.

A la Dra. Patricia Guevara Fefer por todo el apoyo, la confianza y las enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio de fitoquímica.

A la Dra. Eva Aguirre Hernández y la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz por el apoyo en el trabajo de laboratorio y sus valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

Al M. en C. Rubén San Miguel Chávez por el análisis por HPLC y sus acertados comentarios que ayudaron a enriquecer esta tesis.

Al M. en C. Álvaro Campos Villanueva por la identificación taxonómica del material vegetal y el gran apoyo durante mi estancia en la Estación de Biología Los Tuxtlas.

Al M. en C. Roberto Enrique Llanos Romero por el apoyo técnico y los consejos durante el desarrollo del análisis por TLC.

A la Dra. Ana María García Bores por sus valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

A la Q. A. Verónica Muñoz Ocotero por el apoyo, los consejos y las enseñanzas durante los últimos años.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo **a mi esposa Nayhely** y **mi hija Inda Jani** quienes han contribuido más que nadie a mi desarrollo humano y espiritual, convirtiéndome en un mejor ser humano.

RESUMEN

El género *Tabernaemontana* comprende un gran número de especies vegetales con un importante registro de uso etnobotánico y actividades biológica y farmacológica, debido principalmente a la presencia de una amplia variedad de alcaloides indólicos. En el presente trabajo se realizó un análisis fitoquímico de las diferentes estructuras vegetales de dos especies mexicanas, *T. alba* y *T. arborea*, basado en las técnicas de Cromatografía en Capa Fina (TLC, por sus siglas en inglés) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Además, se probó la actividad citotóxica de los extractos crudos de alcaloides obtenidos de cada estructura y especie mediante el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*, determinando asimismo la capacidad de inhibir el crecimiento de seis líneas celulares de carcinoma humano de los dos extractos más activos. Ambas especies mostraron perfiles de alcaloides indólicos complejos en todas sus estructuras vegetales, presentándose los mayores rendimientos alcaloideos en las cortezas de raíz y de tronco de *T. arborea*. En el análisis por HPLC se identificaron cinco alcaloides (ibogamina, estemadina, isovoacangina, estemadenina y estemadonelina) en diferente composición y concentración en las dos especies. Se observaron diferentes grados de actividad citotóxica en la mayoría de las estructuras vegetales de ambas especies. Los porcentajes de mortalidad más altos registrados correspondieron a las semillas de *T. alba* (100%) y las hojas de *T. arborea* (87.5%), estructuras que también resultaron altamente eficaces en el bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano. No se observó ninguna relación evidente entre los perfiles cromatográficos obtenidos y las actividades citotóxicas registradas.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Ubicación taxonómica y descripción botánica del género <i>Tabernaemontana</i> L.....	4
2.2. Distribución del género a nivel global y en México.....	5
2.3. Metabolitos secundarios presentes en el género.....	5
2.4. Usos etnobotánicos del género a nivel global y en México.....	8
2.5. Farmacología de extractos y alcaloides obtenidos del género.....	9
2.6. Bioensayos de citotoxicidad realizados.....	13
III. OBJETIVOS.....	14
IV. JUSTIFICACIÓN.....	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1. Diagrama general de trabajo.....	16
5.2. Recolecta, identificación taxonómica y preparación del material vegetal.....	17
5.3. Obtención de extractos.....	17
5.4. Análisis cromatográfico.....	18
5.4.1. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos por TLC.....	18
5.4.2. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos e identificación y cuantificación de alcaloides individuales por HPLC.....	18
5.5. Pruebas biológicas.....	19
5.5.1. Bioensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i>	19
5.5.2. Bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano.....	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1. Preparación del material vegetal.....	21
6.2. Rendimiento de los extractos orgánicos de las estructuras vegetativas y reproductivas.....	23
6.3. Análisis cromatográfico.....	26
6.3.1. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos por TLC.....	26

6.3.2. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos e identificación y cuantificación de alcaloides individuales por HPLC.....	36
6.4. Pruebas biológicas.....	40
6.4.1. Bioensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i>	40
6.4.2. Bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano.....	43
VII. CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXOS.....	50
A. Curvas de calibración de HPLC.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Ejemplar de T. alba.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2: Ejemplar de T. arborea.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3: Copa de T. alba.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 4: Copa de T. arborea.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 5: Estructura química de la triptamina.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 6: Estructura química de la secologanina.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 7: Estructura química de la apodina (tipo plumerano).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 8: Estructura química de la serpentina (tipo corinanteano).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 9: Estructura química de la ibogaína (tipo ibogano).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 10: Diseño experimental.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 11: Material vegetal recolectado de T. alba.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 12: Material vegetal recolectado de T. arborea.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 13: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y un estándar (CHCl₃:CH₃OH (9:1)) vista a 254 nm.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 14: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y un estándar (CHCl₃:CH₃OH (9:1)) vista a 365 nm.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 15: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares (CHCl₃:CH₃OH (9:1)) revelada con sulfato cérico.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 16: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares (CHCl₃:CH₃OH (9:1)) revelada con Dragendorff.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 17: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares (CHCl₃:CH₃OH (95:5)) revelada con Dragendorff.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 18: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares (CHCl₃:CH₃OH (9:1)) revelada con van Urk-Salkowski.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 19: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares (CHCl₃:CH₃OH (99:1)) revelada con van Urk-Salkowski.....</i>	<i>32</i>

<i>Figura 20: Cromatograma obtenido del análisis densitométrico de una placa desarrollada no revelada leída entre 200 y 380 nm.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 21: Cromatograma obtenido del análisis densitométrico de una placa desarrollada revelada con Dragendorff y leída entre 395 y 800 nm.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 22: Cromatograma obtenido del análisis por HPLC del extracto alcaloideo de la corteza de raíz de T. alba.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 23: Cromatograma obtenido del análisis por HPLC del extracto alcaloideo de la corteza de tronco de T. arborea.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 24: Porcentajes de mortalidad registrados para los extractos crudos de alcaloides de T. alba y T. arborea a una concentración de 1000 ppm y después de 48 horas. Los porcentajes se calcularon con base en la media de cinco repeticiones por tratamiento. Las barras representan la desviación estándar.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura A.1: Curva de calibración de la ibogamina.</i>	<i>50</i>
<i>Figura A.2: Curva de calibración de la estemadina.</i>	<i>50</i>
<i>Figura A.3: Curva de calibración de la estemadonelina.</i>	<i>51</i>
<i>Figura A.4: Curva de calibración de la isovoacangina.</i>	<i>51</i>
<i>Figura A.5: Curva de calibración de la estemadenina.</i>	<i>52</i>

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1: Rendimiento de los extractos orgánicos de las estructuras vegetativas y reproductivas de T. alba.....</i>	<i>23</i>
<i>Cuadro 2: Rendimiento de los extractos orgánicos de las estructuras vegetativas y reproductivas de T. arborea.....</i>	<i>24</i>
<i>Cuadro 3: Concentración de alcaloides identificados en las estructuras vegetativas y reproductivas de T. alba.</i>	<i>36</i>
<i>Cuadro 4: Concentración de alcaloides identificados en las estructuras vegetativas y reproductivas de T. arborea.....</i>	<i>36</i>
<i>Cuadro 5: Inhibición del crecimiento de diferentes líneas celulares de carcinoma humano para los extractos crudos de alcaloides de las semillas de T. alba y las hojas de T. arborea.....</i>	<i>43</i>

I. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son compuestos biosintetizados por plantas – y en menor grado por hongos y microorganismos – que no influyen directamente en el crecimiento y el desarrollo de los organismos como lo hacen los metabolitos primarios. Sin embargo, dichos compuestos suelen cumplir funciones favorables a la sobrevivencia y reproducción de sus productores, como proporcionarles mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos, fungir como atrayentes de polinizadores y animales dispersores de semillas o jugar un papel en interacciones alelopáticas. De distribución más restringida que los metabolitos primario, algunos productos del metabolismo secundario aparecen únicamente en taxones bien delimitados, a nivel de especie, género y en ocasiones de familia (Taiz *et al.*, 2006).

Por su biogénesis, existen tres grupos principales de metabolitos secundarios: Los terpenos, los fenoles y los compuestos nitrogenados. Los primeros y los terceros a menudo brindan protección contra patógenos y herbívoros (tanto invertebrados como vertebrados) mediante actividad tóxica o disuasiva de la alimentación. Los fenoles, en cambio, cubren una mayor cantidad de funciones, sirviendo de agentes estructurales y estabilizadores, atrayentes y protectores contra la radiación UV, herbívoros o patógenos (Taiz *et al.*, 2006).

El interés particular en este estudio se basa en el grupo más amplio y fascinante de los compuestos nitrogenados: los alcaloides. Definiendo 'alcaloide' como un compuesto de origen vegetal – aunque también puede ser de origen fúngico y animal – con uno o varios anillos heterocíclicos nitrogenados, de estructura molecular compleja y con actividad fisiológica significativa (Bhat *et al.*, 2005), existen al menos 15000 diferentes sustancias de este tipo, distribuidas entre el 15 y 20% de las plantas vasculares (Taiz *et al.*, 2006). En total, más de 150 familias producen alcaloides, siendo de particular importancia las familias dicotiledóneas Apocynaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Lauraceae, Fabaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Papilionaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae y Solanaceae (Bhat *et al.*, 2005).

Dependiendo del taxón, los alcaloides pueden presentarse en uno, varios o todos los órganos y estructuras vegetativas y reproductivas (siendo o no éstos los sitios de biosíntesis) en combinaciones y concentraciones que varían según la fase de crecimiento de la planta en cuestión y los factores ambientales existentes. En general, los alcaloides estructuralmente simples pueden aparecer en diferentes especies vegetales sin parentesco directo, mientras que los alcaloides con una estructura compleja se encuentran a nivel de especie o género (Bhat *et al.*, 2005).

Por su marcada actividad biológica y fisiológica, los alcaloides representan una fuente importante de drogas y fármacos. Muchas plantas que producen dichos compuestos tienen una larga historia de uso etnobotánico y siguen siendo objetos de estudio de la industria farmacéutica (Bhat *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se analizaron los alcaloides de dos especies del género *Tabernaemontana*: *T. alba* y *T. arborea*. La selección de las especies se basó en una combinación de características intrínsecas y condiciones asociadas que – a través de los ojos del investigador fitoquímico – les confieren una naturaleza única a dichas plantas. Primero, ambas especies son nativas de México y abundan en las zonas tropicales que están entre las más biodiversas del país. Segundo, suelen formar elementos dominantes de la vegetación secundaria en áreas perturbadas, permitiendo un acceso relativamente fácil a ellas y la cosecha sustentable de sus estructuras vegetativas y reproductivas, incluso a mediana escala. Tercero, pertenecen a la familia Apocynaceae – famosa por su gran diversidad de alcaloides altamente bioactivos – y a un género con un impresionante registro de uso etnobotánico y presencia de alcaloides indólicos de actividad farmacológica comprobada. En otras palabras, *T. alba* y *T. arborea*, criaturas surgidas de la interminable y despiadada lucha de sobrevivencia en las selvas tropicales, son los objetos de estudio perfectos para una investigación preliminar de nuevas fuentes de compuestos potencial y farmacológicamente valiosos, con un interés determinadamente nacional.

La pretensión del presente estudio es contribuir en el conocimiento básico y aplicado del género *Tabernaemontana* y sus alcaloides que estuvieron sujetos a un gran número de estudios fitoquímicos y farmacológicos en los años de 1980, comprobando una amplia gama de efectos biológicos y farmacológicos. La actividad citotóxica en líneas celulares de carcinoma humano, puesta a prueba en el presente estudio, es solamente un ejemplo de un sinfín de potenciales aplicaciones.

No obstante, de mayor interés tal vez para nuestra realidad actual, podría resultar la actividad antiadictiva de algunos alcaloides de *Tabernaemontana* y otros géneros cercanos. Reportada por primera vez en los años de 1960, fue hasta 30 años después que dicha actividad empezó a ser objeto de estudio de investigaciones científicas consistentes. Hoy día, y a pesar de un progreso sustancial logrado, falta mucho para aprovechar de forma segura y responsable el potencial antiadictivo de los alcaloides (o sus derivados) mencionados. Sin embargo, el escenario actual, caracterizado por la transición de México como un país de tránsito de drogas en un país consumidor, así como por la problemática actual de la “guerra” contra el narcotráfico del gobierno mexicano recientemente concluido, acompañadas por un número creciente de adictos (sobre todo a la cocaína, las metanfetaminas, los opiáceos y los inhalables) en las calles, parece propicio al fomento de

investigaciones que busquen nuevos tratamientos de las adicciones más eficaces y adaptados a las condiciones reales del país. La detección de alcaloides con actividad antiadictiva en plantas nativas de México podría facilitar el desarrollo y la producción de fitomedicamentos y fármacos que aumenten la eficacia de los tratamientos ya existentes en el país.

II. ANTECEDENTES

2.1. Ubicación taxonómica y descripción botánica del género *Tabernaemontana* L.

El género *Tabernaemontana* pertenece a la tribu Tabernaemontaneae, la subfamilia Rauvolfioideae y la familia Apocynaceae (Sennblad *et al.*, 2002), y comprende aproximadamente 100 especies (Van Beek *et al.*, 1984).



Figura 1: Ejemplar de *T. alba*.



Figura 2: Ejemplar de *T. arborea*.



Figura 3: Copa de *T. alba*.



Figura 4: Copa de *T. arborea*.

(Todas las imágenes fueron tomadas en las inmediaciones de la Estación de Biología Los Tuxtlas del Instituto de Biología de la UNAM)

Estas plantas son arbustos o árboles perennifolios que alcanzan entre 1 y 15 m de altura. La corteza contiene un látex blanco o amarillento. Las hojas son lanceoladas y opuestas, miden de 3 a 25 cm y

contienen una savia lechosa. Las flores presentan forma de estrella con 5 puntas, tienen un diámetro entre 1 y 5 cm y desprenden un olor fragante. Los frutos reniformes muestran una segmentación que los divide simétricamente en dos partes (EOL; Rättsch, 2007), son carnosos y contienen semillas ariladas que se dispersan por zoocoria (Simoes *et al.*, 2010).

2.2. Distribución del género a nivel global y en México

Tabernaemontana se encuentra ampliamente distribuido en las zonas tropicales y subtropicales de la Tierra, sobre todo en las selvas de Centro y Sudamérica y África (Rättsch, 2007).

En México, existen cuatro especies pertenecientes a este género: *T. alba* (Fig. 1 y 3), *T. amygdalifolia* y *T. arborea* (Fig. 2 y 4) son especies nativas del país, mientras que *T. divaricata* es una especie introducida. Las primeras tres se distribuyen de manera natural en las selvas altas perennifolias, las selvas bajas caducifolias y los matorrales xerófilos de los estados de Campeche (*T. alba*, *T. amygdalifolia*), Chiapas (*T. alba*, *T. amygdalifolia*, *T. arborea*), Durango, Guerrero, Jalisco (*T. amygdalifolia*), Michoacán (*T. alba*, *T. amygdalifolia*), Nayarit (*T. amygdalifolia*), Oaxaca, Puebla, Queretaro, Quintana Roo (*T. alba*, *T. amygdalifolia*), San Luis Potosí (*T. alba*), Sinaloa (*T. amygdalifolia*), Tabasco (*T. alba*, *T. arborea*), Tamaulipas (*T. alba*), Veracruz (*T. alba*, *T. amygdalifolia*, *T. arborea*), Yucatán (*T. alba*, *T. amygdalifolia*) y Zacatecas (*T. amygdalifolia*) (Juárez-Jaimes *et al.*, 2007).

Varias especies del género abundan en zonas perturbadas donde forman componentes comunes de la vegetación secundaria (BDMTM, 2009). En el caso de *T. alba* y *T. arborea*, la presencia de un látex rico en metabolitos secundarios las hace no apetecibles para el ganado, y a causa del consecuente forrajeo selectivo, suelen ser especies dominantes de la vegetación secundaria de los potreros inducidos de la región veracruzana de Los Tuxtlas (Guevara *et al.*, 1997).

2.3. Metabolitos secundarios presentes en el género

Todos los alcaloides biosintetizados por *Tabernaemontana* se derivan del triptofano (y más específicamente de la triptamina (Fig. 5)) y la secologanina (Fig. 6). El primero proporciona la parte estructural indólica, mientras que la segunda aporta la base de la estructura monoterpénica (Danieli *et al.*, 1986). Según van Beek *et al.*, 1984, los alcaloides producidos por el género se dividen en 11 grupos con base en su esqueleto:

- el tipo vincosano,
- el tipo corinanteano,
- el tipo vallesiacotamano,
- el tipo estrichnano,
- el tipo aspidospermatano (todos con esqueleto de secologanina intacto, de clase I),
- el tipo plumerano,
- el tipo eburnano (todos con esqueleto de secologanina reestructurado, de clase II),
- el tipo ibogano,
- el tipo tacamano (todos con esqueleto monoterpénico aún más reestructurado, de clase III),
- los alcaloides cuyas rutas de biogénesis se ignoran y
- los alcaloides bis-indólicos.

Los alcaloides más frecuentemente presentes en *Tabernaemontana* son de los tipos plumerano (Fig. 7), corinanteano (Fig. 8) y – siendo el tipo más común – ibogano (Fig. 9) (Danieli *et al.*, 1986).

En 2009, Mansoor *y col.* aislaron las taberninas A-C de las hojas de *T. elegans*, comprobando por primera vez la presencia de alcaloides del tipo beta-carbolina en el género. En el mismo año, Lim y Kam obtuvieron conoliferina, isoconoliferina y las conomicidinas A y B de *T. corymbosa*. Estos compuestos presentan estructuras anteriormente desconocidas, consistiendo los primeros dos alcaloides de la unión de un alcaloide del tipo ibogano y un lignano, mientras que los últimos son una combinación de la ibogaína (Fig. 9) y un alcohol hidroxicinamílico.

Además de alcaloides, se han aislado de algunas especies de *Tabernaemontana* compuestos triterpénicos (sobre todo amirinas y lupeol) y otras sustancias (como los ácidos salicílico y benzoico, varios flavonoides, una enzima bacteriolítica y dos glicósidos cardiotónicos). Cabe destacar que las partes vegetales más ricas en alcaloides suelen ser las cortezas de la raíz y (en menor grado) del tronco, mientras que las hojas y el látex tienden a presentar proporciones mayores de otros compuestos (Van Beek *et al.*, 1984).

Al contrario de especies de *Tabernaemontana* en otros países, las especies mexicanas de este género han sido poco o no validadas química y farmacológicamente (BDMTM, 2009). En las semillas de algunos especímenes de *T. alba* provenientes de México se encontraron los alcaloides coronaridina y tabersonina (Van Beek *et al.*, 1984), mientras que de las raíces de ejemplares colombianos de *T. amygdalifolia* se aislaron cilindrocarpidina, 12-dimetoxicilindrocarpidina, 17-

dimetoxicilindrocarpidina, homocilindrocarpidina, 5-oxocilindrocarpidina, 10-oxocilindrocarpidina, coronaridina, (+)-dimetil-aspidospermina, o-dimetilpalosina, voacangina e hidroxindolenina voacangina (Achenbac, 1966, 1967; Van Beek *et al.*, 1984). También se reportó la presencia de N-acetil-12-dimetoxicilindrocarina en esta última especie (Zhu *et al.*, 1990).

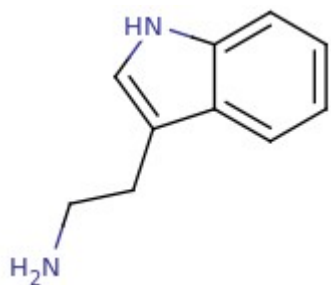


Figura 5: Estructura química de la triptamina

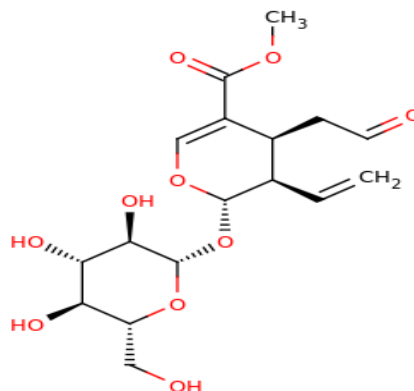


Figura 6: Estructura química de la secologanina

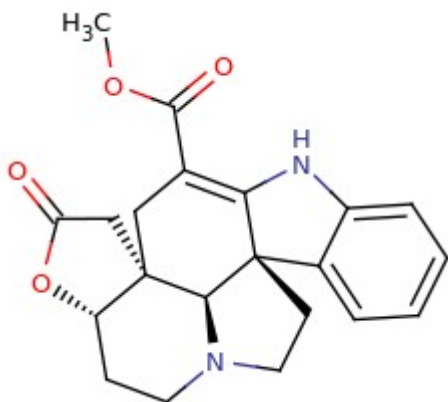


Figura 7: Estructura química de la apodina (tipo plumerano)

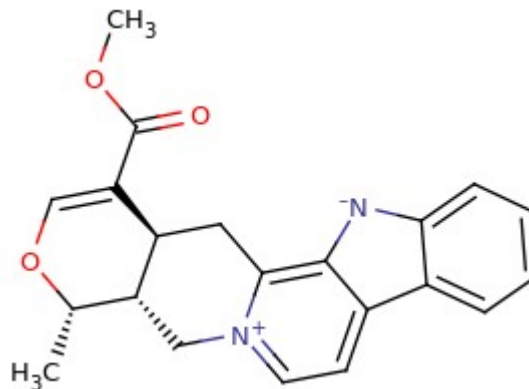


Figura 8: Estructura química de la serpentina (tipo corinanteano)

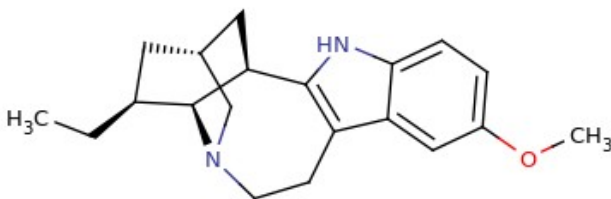


Figura 9: Estructura química de la ibogaína (tipo ibogano)

(Todas las estructuras fueron tomadas de chemicalize.org)

En la savia de *T. arborea* se detectaron epivoacorina, voacamina y voacangina (Kingston, 1978), y en las semillas, voacangina, isovoacangina y tabersonina (Chaverri *et al.*, 1980).

De *T. divaricata*, en cambio, cuya área de distribución original se encuentra fuera de México, se han realizado estudios fitoquímicos mucho más amplios, analizando raíces, tallos, corteza (tanto de tallo como de raíz), hojas, flores y semillas. Los ejemplares examinados se recolectaron en países tan distintos como Bangla Desh, Brasil, Cuba, Egipto, Estados Unidos, India, Japón y Pakistán, entre otros, y los alcaloides identificados fueron aparicina, conodusarina, conofilina, conofilinina, conofolina, conolidina, conolobinas A-B, coronaridina, (3S)-3-cianocoronaridina, 3-oxocoronaridina, 5-oxocoronaridina, 6-oxocoronaridina, 5-hidroxi-6-oxocoronaridina, 3-(2-oxopropil)-coronaridina, hidroxiindolenina coronaridina, dregamina, 19,20-dihidroervahanina, (+)-heyneanina, (-)-heyneano, (-)-ibogamina, lirofolinas A-B, lochnericina, N1-metilvoafilina, taberhanina, tabernaemontanina, 19,20-dihidrotabernamina, tabersonina, 3,14,4,19-tetrahidro-olivacina, voacamina, voacangina, isovoacangina, (3S)-3-cianoisovoacangina, (3R/3S)-3-etoxivoacangina, voacristina, isovoacristina, voafilina, voafinidina, voafinina, N-metilvoafinina, voalenina y vobasina (Van Beek *et al.*, 1984; Kam *et al.*, 2003, 2004; Ingkaninan *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2009; Low *et al.*, 2010).

2.4. Usos etnobotánicos del género a nivel global y en México

La compleja variedad de alcaloides indólicos presentes en *Tabernaemontana* explica el amplio uso etnobotánico que se le ha dado a este género a nivel mundial. A menudo, el uso incluye el tratamiento de heridas, enfermedades dermatológicas y gastrointestinales, pero también se han aprovechado las propiedades analgésicas, diuréticas, laxantes, eméticas, antiinflamatorias, antipiréticas, antihemorrágicas, antimicrobianas y antiparasíticas del género (Van Beek *et al.*, 1984).

Algunas especies sirven de base para la elaboración de hipnóticos, narcóticos, tónicos y estimulantes, otras se han utilizado en la producción de toxinas y para el tratamiento de intoxicaciones por picaduras o mordidas de insectos y víboras (Van Beek *et al.*, 1984).

El género también se ha apreciado por la actividad hormonal de algunas preparaciones, induciendo ésta efectos afrodisíacos, abortivos, galactagogos y reguladores de los desórdenes menstruales. Entre las enfermedades específicas que se han tratado con *Tabernaemontana* spp destacan la sífilis, la lepra, la gonorrea, la malaria, la filiriasis, la nefrolitiasis, el beriberi, la epilepsia y la 'locura'. Otra área de aplicación ha sido el tratamiento y alivio de dolores intensos y/o crónicos (Van Beek *et al.*, 1984).

El material vegetal utilizado varía según el uso etnobotánico, pero la mayoría de las preparaciones con fines medicinales requieren de la corteza de la raíz de alguna especie específica de *Tabernaemontana*, seguido por el látex, las hojas, la corteza del tronco y las ramas. Los frutos, las semillas, las flores y la savia se usan de manera mucho menos común (Van Beek *et al.*, 1984).

Las preparaciones se utilizan tanto interna como externamente. En el primer caso, predominan las infusiones, maceraciones, decocciones, suspensiones, baños de vapor, mezclas masticables y enjuagues bucales. En el segundo caso, es común observar los cataplasmas, lavados y ungüentos. Las soluciones y los polvos se usan en ambas formas de aplicación (Van Beek *et al.*, 1984).

Dentro de la medicina tradicional mexicana, *T. alba* y *T. amygdalifolia* se utilizan para tratar enfermedades e infecciones dermatológicas (mediante la aplicación local de infusiones de látex o ramas), diarrea, fiebre y diferentes tipos de dolores como los de cabeza y de muelas (aplicando localmente látex o semillas machacadas). También se usan para el lavado y la cicatrización de heridas (por medio de la aplicación local directa de látex, savia u hojas sancochadas) (BDMTM, 2009), la remoción de verrugas (aplicando localmente látex o resina) y como laxante (a través de la ingestión de látex o resina diluidos en agua caliente y azucarada) (Van Beek *et al.*, 1984).

2.5. Farmacología de extractos y alcaloides obtenidos del género

Los extractos crudos (tanto de alta como de mediana y baja polaridad) de algunas especies de *Tabernaemontana* se han asociado con actividad hipotensora, espasmolítica, sedativa, proteolítica, tóxica, citotóxica, antitumoral, anticancerígena y bacteriostática en diferentes modelos experimentales (Van Beek *et al.*, 1984).

Asimismo, algunos extractos de ciertas especies indujeron reducciones de la actividad motriz y de la médula ósea, del tono muscular y de la bradicardia, así como aumentos de la tasa de respiración (y reducciones de la misma a dosis altas) y de la acción hipertensiva de la adrenalina. Otros efectos inducidos fueron relajación muscular, leucopenia, convulsiones y la muerte (Van Beek *et al.*, 1984).

Entre las propiedades farmacológicas de los extractos crudos de *Tabernaemontana* spp que se descubrieron durante la última década destacan la actividad antioxidativa (Pereira *et al.*, 2005; Thambi *et al.*, 2006) y la acción inhibitoria tanto sobre la actividad miotóxica del veneno de *Bothrops jararacussu* (Veronese *et al.*, 2005) como sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (Chattipakorn *et al.*, 2006, 2007; Pratchayasakul *et al.*, 2010).

De las especies mexicanas del género, un extracto clorofórmico obtenido de un extracto acuoso crudo del tronco de *T. arborea* mostró tener actividad citotóxica contra líneas celulares P388 (leucemia linfocítica), debido a la presencia de voacangina, voacamina y 19-epivoacorina (Van Beek *et al.*, 1984).

De los más de 200 alcaloides aislados de *Tabernaemontana* spp., varios han sido objeto de estudio de investigaciones farmacológicas. En muchos se ha detectado actividad citotóxica y antitumoral, como es el caso de la camptotecina, la 9-metoxicamptotecina, la coronaridina, la olivacina y la N4-dimetilvoacamina (Van Beek *et al.*, 1984).

La mayoría de los alcaloides del tipo ibogano inducen bradicardia e hipotensión, además de actuar sobre el sistema nervioso central (Van Beek *et al.*, 1984).

Otros tipos de actividad farmacológica observada en los alcaloides incluyen propiedades antivirales, antimicrobianas, antiprotozoarias, antipsoriásicas, anticonvulsivas, convulsivas, analgésicas, espasmolíticas, cardiotónicas y simpaticolíticas (Van Beek *et al.*, 1984).

Algunos alcaloides son estimulantes o depresores de la respiración o inhiben la fertilidad en animales.

En un estudio, la (+)-vincamina alivió algunas síntomas de la esclerosis cerebral (Van Beek *et al.*, 1984).

En 2006, Ingkaninan *et al.* lograron aislar e identificar dos alcaloides bis-indólicos con acción inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa (19,20-dihidrotabernamina y 19,20-dihidroervahanina) de la raíz de *Tabernaemontana divaricata*. Kojima *et al.*, 2006, y Fujii *et al.*, 2009, vincularon la conofilina con efectos antidiabéticos a raíz de la inducción de la diferenciación de células pancreáticas beta.

La vobasina y la tabernaemontanina pueden inducir apoptosis en células del hepatocarcinoma humano del tipo HuH-7 (Mansoor *et al.*, 2009), mientras que la voacangina y la isovoacangina tienen un efecto similar en células leucémicas humanas del tipo THP-1 (Figueiredo *et al.*, 2010).

Una de las líneas de investigación más recientes e interesantes revisa la actividad antiadictiva que varios alcaloides del tipo ibogano ejercen en animales (incluyendo al humano) dependientes de algunas drogas de abuso. Ejemplos de dichos alcaloides son la ibogaína, la ibogamina, la coronaridina y la tabernantina que presentan actividad fisiológica significativa en animales. En los

años 90 del siglo pasado se empezó a investigar las propiedades antiadictivas de estas sustancias, sobre todo de la ibogaína (cuya fuente natural más importante es *Tabernanthe iboga*, un arbusto africano de la familia Apocynaceae) (Spinella, 2001).

La ibogaína interactúa con varios tipos de receptores, entre los cuales destacan los acetilcolinérgicos (nicotínicos y muscarínicos), los dopaminérgicos, los serotoninérgicos (5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}), los NMDA, los opioides (kappa, mu y delta) y los sigma (1 y 2). La combinación de efectos agonistas y antagonistas sobre dichos receptores parece ser responsable de la actividad antiadictiva de la ibogaína en animales, principalmente mediante la reducción o eliminación de los efectos placenteros y/o los síndromes de abstinencia causados por las drogas de abuso. Esta actividad antiadictiva se ha observado en ratas y humanos adictos a la cocaína, la morfina, las anfetaminas, la nicotina y el alcohol (Spinella, 2001).

Un posible mecanismo antiadictivo de los alcaloides del tipo ibogano mencionados consiste en la reducción de las respuestas dopaminérgica y serotoninérgica a ciertas drogas de abuso, así como la alteración de la actividad de estos neurotransmisores en general. La ibogaína, por ejemplo, bloquea la captura de dopamina y causa la liberación de dopamina citoplasmática en el cuerpo estriado, a la vez de reducir la liberación de dopamina inducida por la nicotina, la cocaína y la morfina. Los efectos de la ibogaína sobre los niveles de dopamina pueden perdurar por una semana después de la eliminación de la droga. De manera similar, la ibogaína puede aumentar y disminuir los niveles de serotonina en diferentes áreas del cerebro mediante la liberación o inhibición de recaptura de dicho neurotransmisor. La interacción de la ibogaína con los receptores 5-HT_{1B} parece jugar un papel en el bloqueo de la liberación de dopamina inducida por la serotonina. En el caso de la cocaína, la ibogaína y su metabolito la noribogaína se unen al sitio de este alcaloide tropánico en el transportador de serotonina y evitan que cause aumentos del nivel cerebral del neurotransmisor (Spinella, 2001).

Respecto de los opiáceos, la reducción de los síndromes de abstinencia producida por algunos alcaloides del tipo ibogano parece deberse sobre todo a los efectos agonistas y antagonistas que estos compuestos ejercen sobre los receptores opioides kappa y los receptores NMDA, respectivamente. Los receptores opioides kappa regulan la actividad inhibitoria de la ibogaína sobre la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y cuerpo estriado. Otros tipos de receptores opioides podrían contribuir al efecto antiadictivo de los alcaloides del tipo ibogano, ya que la noribogaína y la coronaridina tienen afinidad micromolar por los receptores opioides de los tipos mu, kappa y delta, la ibogaína por los tipos kappa y mu, la tabernantina por los tipos delta y kappa, y la ibogamina por el tipo kappa. La ibogaína y la noribogaína son además antagonistas competitivos de

los receptores NMDA, uniéndose al sitio MK-801 que afecta la tolerancia a opiáceos, alcohol (reduciéndola) y estimulantes (invirtiéndola) (Spinella, 2001).

Se sabe que la ibogaína bloquea los receptores nicotínicos (pero se desconoce su acción sobre los muscarínicos) a nivel micromolar. También tiene afinidad por los receptores sigma, posiblemente causando la neurotoxicidad del alcaloide a dosis altas, debido a la excitación de neuronas en el núcleo olivar inferior y la liberación de glutamato, resultando finalmente en la degeneración de las células de Purkinje. Varios alcaloides del tipo ibogano tienen afinidad micromolar por los canales de Na⁺ regulados por voltaje. La tabernantina es capaz de bloquear los canales de Ca⁺ (Spinella, 2001).

Adicionalmente, la ibogaína y la noribogaína incrementan la inhibición de la adenil ciclasa causada por los efectos de la morfina y la serotonina sin alterar los niveles basales. El primer alcaloide puede incrementar los niveles de neurotensina en varias zonas cerebrales salvo el lóbulo frontal, pero inhibe la liberación de este neuropéptido inducida por la cocaína. La tabernantina aumenta la síntesis y eliminación de catecolaminas en el cerebro, con excepción del hipotálamo (Spinella, 2001).

En el caso de las anfetaminas, se ha comprobado que la ibogaína es capaz de modificar directamente los niveles cerebrales de éstas (Spinella, 2001). Asimismo, en 2011, Kitajima *et al.* observaron que la voacamina, la 3,6-oxidovoacangina y la 5-hidroxi-3,6-oxidovoacangina presentaban actividad antagonista sobre los receptores cannabinoides CB1.

Después de la ibogaína, la R-ibogamina mostró tener la actividad antiadictiva más marcada de todos los alcaloides del tipo ibogano validados farmacológicamente. Además, existen compuestos sintéticos relacionados como la 18-metoxicoronaridina que fueron diseñados para proporcionar un compuesto antiadictivo eficaz que no presente los efectos secundarios alucinógenos y neurotóxicos de la ibogaína (Spinella, 2001).

En la actualidad existen varias clínicas y centros en territorio mexicano que ofrecen terapias contra adicciones a drogas de abuso basadas en el uso de la ibogaína pura y/o un extracto crudo de la raíz de *Tabernanthe iboga* (conteniendo este último ibogaína, ibogamina, coronaridina y tabernantina, entre otras) (Spinella, 2001).

2.6. Bioensayos de citotoxicidad realizados

Considerando la gran variedad de las actividades biológicas mostradas por los alcaloides de *Tabernaemontana* en relación con el alcance de la presente tesis, queda claro que por razones de tiempo, espacio y economía, se tuvo que enfocar un número limitado de tipos de actividad biológica y seleccionar una cantidad igualmente moderada de ensayos biológicos afines. Se optó por evaluar la citotoxicidad de los extractos crudos de alcaloides de *T. alba* y *T. arborea*, y, en caso de resultados positivos, determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares de carcinoma humano. Un método conveniente para probar la primera actividad es el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* por ser rápido, barato y de fácil ejecución. Dicho ensayo ha sido una herramienta importante para el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos naturales con propiedades antitumorales y pesticidas, y como regla general, la Dosis Efectiva 50 (ED50) para la actividad citotóxica de cualquier extracto, fracción o compuesto tiende a corresponder a la décima parte de la Concentración Letal 50 (LC50) registrados en el ensayo de *Artemia salina* (McLaughlin *et al.*, 1998).

La determinación del efecto que una sustancia tiene sobre el crecimiento de líneas celulares de carcinoma humano requiere de un método y equipo más sofisticados y por lo tanto, los ensayos biológicos correspondientes consumen considerablemente más tiempo y dinero que el ensayo de citotoxicidad mencionado arriba. Es una práctica común en la búsqueda de productos naturales de utilidad farmacológica evaluar primero la actividad citotóxica de los distintos extractos, fracciones y compuestos mediante bioensayos simples como el de *Artemia salina*, y realizar los ensayos más específicos y costosos de líneas celulares de carcinoma humano únicamente con las muestras que presentaron la mayor actividad citotóxica. El Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) estadounidense propone que un extracto crudo posea un grado de citotóxicidad significativo cuando presente una Concentración Máxima Inhibitoria 50 (IC50) menor o igual a 30 µg/mL (Suffness *et al.*, 1990).

III. OBJETIVOS

- Obtener extractos crudos de alcaloides a partir de diferentes estructuras vegetativas y reproductivas de las especies *T. alba* y *T. arborea*
- Comparar los perfiles de alcaloides de las estructuras vegetativas y reproductivas de ambas especies por medio de Cromatografía en Capa Fina (TLC, por sus siglas en inglés) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)
- Determinar las estructuras vegetativas y reproductivas con la mayor concentración de alcaloides
- Evaluar y correlacionar la actividad citotóxica de los extractos crudos de alcaloides en dos sistemas biológicos
- Realizar un análisis de los perfiles cromatográficos de alcaloides y correlacionarlos con la actividad citotóxica

IV. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios fitoquímicos relacionados con el género *Tabernaemontana* se han llevado a cabo en países e instituciones extranjeros y con especies diferentes a las nativas de México. Los pocos estudios que se han hecho acerca de *T. alba*, *T. amygdalifolia* y *T. arborea* consideran solamente algunas estructuras vegetativas y/o reproductivas de estas especies. Es por esto que se realizó un análisis del perfil cromatográfico de los alcaloides de *T. alba* y *T. arborea*, analizando la mayor cantidad posible de estructuras vegetativas y reproductivas, y contribuir así al conocimiento fitoquímico acerca de las especies nativas de *Tabernaemontana* de México.

Además, se evaluó la actividad citotóxica de los extractos crudos de alcaloides de las diferentes estructuras vegetativas y reproductivas de ambas especies, con la finalidad de aportar información útil para la búsqueda de nuevos compuestos – o para la reevaluación de compuestos ya conocidos – con propiedades anticancerosas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diagrama general de trabajo

A continuación se ilustra el diseño experimental que se siguió para lograr los objetivos planteados:

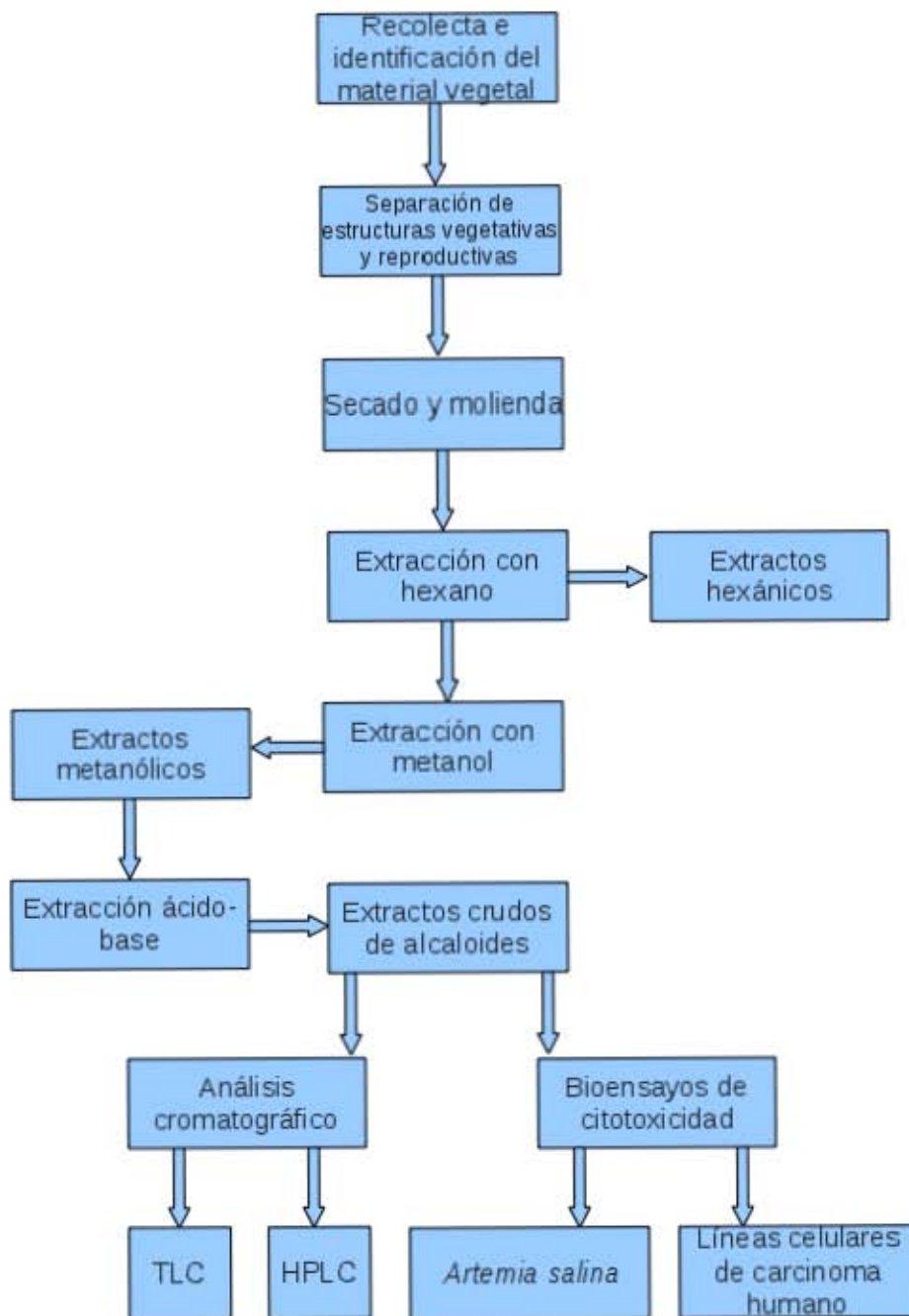


Figura 10: Diseño experimental.

5.2. Recolecta, identificación taxonómica y preparación del material vegetal

El material vegetal se recolectó en las inmediaciones de la Estación de Biología Los Tuxtlas del Instituto de Biología de la UNAM (cerca del Km 30 de la carretera Catemaco-Montepío) los días 8 y 9 de octubre de 2011. Se tomaron muestras de las raíces, tallos (corteza de tronco y ramas enteras), hojas y frutos con semillas de las especies *T. alba* y *T. arborea*. Las cantidades se indican en las *Tablas 1* y *2* en la sección de resultados. Las plantas *in situ* y el material vegetal recolectado fueron identificados por el M. en C. Álvaro Campos Villanueva, taxónomo de la Estación de Biología.

El secado se llevó a cabo en estufas a temperatura constante de 35°C (raíces, cortezas de tronco, ramas y hojas) o a temperatura ambiente (frutos con semillas) en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Posteriormente, se depositó un ejemplar de herbario de cada especie en la Facultad de Ciencias de la UNAM (*T. alba*: número de voucher 132793; *T. arborea*: número de voucher 133359).

5.3. Obtención de extractos

El material vegetal se extrajo siguiendo la metodología propuesta por Bhat *et al.* (2005):

- El material seco se molió a mano (hojas) o en un molino *Retsch SM 2000* (cortezas de raíz y de tronco, ramas, frutos y semillas).
- El material molido se desengrasó con hexano tres veces, macerándolo durante varios días bajo agitación constante y filtrando las soluciones al vacío.
- El material desengrasado se secó y se extrajo de la misma manera con metanol.
- Los disolventes se eliminaron por evaporación a presión reducida.
- El extracto metanólico seco se mezcló con una solución acuosa de ácido clorhídrico (pH 4), la disolución se calentó en baño María durante unos minutos y se filtró al vacío.
- El filtrado se alcalinizó con una disolución acuosa de hidróxido de sodio a pH 10.
- La disolución alcalina se extrajo tres veces con cloroformo en un embudo de separación. Se separó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro.
- El disolvente se eliminó por evaporación a presión reducida.

5.4. Análisis cromatográfico

Los alcaloides extraídos se analizaron mediante las técnicas de TLC y HPLC, comparando sus factores y tiempos de retención, respectivamente, con los de diez estándares de alcaloides puros provenientes del género *Stemmadenia*, siendo éste taxonómica y químicamente cercano a *Tabernaemontana*. Dichos estándares fueron la estemadenina, la estemadina, la estemadonelina, la ibogaína, la ibogamina, la isovoacangina, la quebrachamina, la tabersonina, la voacamina y la voacangina, y se obtuvieron del archivo de la Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón.

5.4.1. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos por TLC

Las muestras a analizar se prepararon disolviendo los extractos crudos de alcaloides y los estándares en cloroformo, en proporción de 5 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente. De cada una de las disoluciones resultantes se aplicaron 10 µL en una placa cromatográfica de sílica gel de 20 x 10 cm (Merck, sin indicador de fluorescencia y con un espesor de capa de 0.25 mm), haciendo uso de un equipo *CAMAG automatic TLC Sampler 4*. De esta manera se aplicaron varias placas que se desarrollaron en diferentes sistemas de elución, secándolas posteriormente a temperatura ambiente. Los sistemas consistieron de una mezcla de cloroformo y metanol, en proporción 9:1, 95:5 y 99:1, respectivamente. Las placas se observaron bajo luz UV (254 y 365 nm), y posteriormente se revelaron con los reactivos de Dragendorff, sulfato cérico y van Urk-Salkowski (Ehmann, 1977) para identificar los compuestos alcaloideos. En los últimos dos casos, las placas cromatográficas se colocaron sobre una parrilla calefactora a 100°C inmediatamente después de aplicar el revelador. Las placas reveladas se retiraron de la parrilla en cuanto los colores tuvieran la intensidad deseada y – en el caso del revelador de van Urk-Salkowski – se sumergieron en agua destilada para remover los excesos de ácido.

Las placas cromatográficas obtenidas se sometieron a un análisis densitométrico, examinándolas antes y después de la aplicación del revelador mediante un *Scanner 3 CAMAG TLC*, usando diferentes longitudes de onda oscilando entre los 200 y 600 nm. Los datos resultantes se analizaron con el programa *WinCats-Planar Chromatography versión 1.2.0*.

5.4.2. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos e identificación y cuantificación de alcaloides individuales por HPLC

El análisis por HPLC se llevó a cabo por el M. en C. Rubén San Miguel-Chávez en el Colegio de Postgraduados, haciendo uso de un equipo *Agilent serie 1100* equipado con inyector automático *serie 1200* y detector de arreglo de diodos. Se utilizó una columna marca *Hewlett Packard Hypersil ODS* de 125 mm x 4mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula. Los extractos crudos de alcaloides se disolvieron en cloroformo (1 mg/mL), se filtraron en acrodisco marca *Titan 2* de nylon y 0.45 µm de poro y se inyectaron en dosis de 20 µL al equipo. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo: 10 mM de fosfato monobásico de potasio (45:55) a pH 7, siendo el análisis isocrático con una velocidad de flujo de 0.7 mL/ min. La detección fue a 215 y 244 nm.

Para identificar y cuantificar los alcaloides se hicieron curvas estándar de los siguientes compuestos de referencia: la estemadenina, la estemadina, la estemadonelina, la ibogamina y la isovoacangina. Para la construcción de las curvas se utilizaron concentraciones desde 10 hasta 40 µg, usando cinco puntos para cada curva.

5.5. Pruebas biológicas

Respecto de la actividad biológica de los extractos crudos de alcaloides, se probó su citotoxicidad mediante dos ensayos diferentes, descritos a continuación.

5.5.1. Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*

Se preparó una solución acuosa salina y se colocó una cantidad suficiente de quistes de *Artemia salina* en la misma. La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 48 horas para inducir la eclosión de los quistes.

Los tratamientos se prepararon en tres concentraciones (10, 100 y 1000 ppm) de los 12 extractos crudos de alcaloides, respectivamente, dando un total de 36 tratamientos y 12 grupos de control. Cada tratamiento y grupo de control tuvo cinco repeticiones distribuidas entre igual número de tubos de ensaye a los cuales se les agregó la misma cantidad de solución acuosa salina y diez artemias vivas.

Se contaron las artemias vivas por tubo después de 24 y 48 horas, y se calcularon el promedio y la desviación estándar para cada tratamiento. La tasa de mortalidad de los mismos se calculó mediante

la siguiente fórmula (Meyer *et al.*, 1982):

$$\%mortalidad = \frac{\text{número de individuos vivos del control} - \text{número de individuos vivos del tratamiento}}{\text{número de individuos vivos del control}} * 100$$

5.5.2. Bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano

Se comprobó la actividad citotóxica de dos de los extractos crudos de alcaloides (los obtenidos a partir de las semillas de *T. alba* y de las hojas de *T. arborea*, respectivamente) en seis líneas celulares de cáncer humano (U251 (glía del sistema nervioso central), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), HCT-15 (colón), MCF-7 (mama) y SKU1 (pulmón)). Las pruebas correspondientes se llevaron a cabo en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, siguiendo el método de la sulforrodamida B, descrito por Skehan *et al.* (1990). El extracto de las semillas de *T. alba* se probó a una concentración de 50 µg/mL y el extracto de las hojas de *T. arborea* a una concentración de 25 µg/mL. En ambos casos, se realizaron tres experimentos independientes y se calcularon el porcentaje promedio de inhibición del crecimiento y el error estándar de la media por línea celular.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Preparación del material vegetal

El secado de las diferentes estructuras vegetativas y reproductivas de cada especie (*Fig. 11 y 12*) se realizó hasta alcanzar peso constante. Las semillas se sacaron de los frutos en cuanto éstos habían madurado lo suficiente para permitir su apertura, y posteriormente las dos estructuras se secaron de manera separada. Por lo tanto, los datos respectivos de los frutos en los *Cuadros 1 y 2* se refieren al fruto sin semilla. Cabe destacar que en el caso de las semillas se removió el arilo antes de proceder al secado y la molienda.

Revisando los valores del peso seco del material vegetal, indicados en los *Cuadros 1 y 2*, se hace evidente que se recolectaron cantidades considerablemente mayores de las estructuras vegetativas y reproductivas de *T. arborea* que de *T. alba*. Lo anterior se debe a varias razones: Primero, *T. arborea* da origen a individuos más grandes que *T. alba*, presentando así, en promedio, mayores superficie y volumen foliares y de corteza, además de contar con un mayor número de ramas y frutos. Segundo, la relación entre los pesos fresco y seco del material vegetal fue distinta en el caso de *T. alba* y de *T. arborea*: Las estructuras de la primera especie presentaron un contenido de agua promedio 13% mayor que el valor correspondiente a la segunda especie.

Dos excepciones a la tendencia cuantitativa expuesta arriba merecen una mención especial: La cantidad de corteza de tronco recolectada de *T. alba*, expresada en peso fresco, fue superior a la cantidad recolectada de la misma estructura de *T. arborea*. No obstante, al comparar las cantidades de corteza recolectada expresadas en peso seco, la relación se invierte, debido al hecho ya mencionado de que el porcentaje del peso seco con respecto del peso fresco del material vegetal obtenido fue menor en el caso de *T. alba* que de *T. arborea*.

La otra excepción se refiere a los frutos y semillas de ambas especies: Aunque se recolectaron menos frutos de *T. alba* que de *T. arborea* (conteniendo los frutos de las dos especies el mismo número promedio de semillas), tanto en número como en pesos fresco y seco, los *Cuadros 1 y 2* muestran una mayor cantidad de semillas – expresada en peso seco – para la primera especie que para la segunda. Esto se debió a la eliminación de semillas de *T. arborea* que se contaminaron durante el proceso de secado.



Figura 11: Material vegetal recolectado de *T. alba*.



Figura 12: Material vegetal recolectado de *T. arborea*.

6.2. Rendimiento de los extractos orgánicos de las estructuras vegetativas y reproductivas

Después de haber concluido los procesos de secado y molienda, se procedió a la extracción de las estructuras vegetativas y reproductivas. A continuación se presentan los rendimientos de los diferentes pasos de extracción según los disolventes utilizados:

Cuadro 1: Rendimiento de los extractos orgánicos de las estructuras vegetativas y reproductivas de *T. alba*.

Estructura vegetativa o reproductiva	Peso (g) {Peso por peso seco del material vegetal (mg/g)} [Concentración por material vegetal seco (%)]				
	Material vegetal fresco	Material vegetal seco	Extracto hexánico	Extracto metanólico	Extracto crudo de alcaloides
Raíz	1800	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Corteza de raíz		35.35	2.50 {70.72} [7.07]	1.22 {34.51} [3.45]	0.33 {9.33} [0.93]
Corteza de tronco	820.5	251.36	11.68 {46.47} [4.65]	10.80 {42.97} [4.30]	2.05 {8.15} [0.81]
Ramas	1076.5	282.54	11.28 {39.92} [3.99]	22.52 {79.70} [7.97]	0.45 {1.59} [0.16]
Hojas	1666.5	400.85	17.55 {43.78} [4.38]	50.10 {124.98} [12.50]	0.50* {1.25} [0.12]
Frutos	963.5	78.21	22.57 {288.58} [28.86]	5.35 {68.40} [6.84]	0.13 {1.66} [0.17]
Semillas		43.89	6.80 {154.93} [15.49]	3.76 {85.67} [8.57]	0.09 {2.05} [0.20]

n. d. = no determinado

* Pérdida por emulsión

Cuadro 2: Rendimiento de los extractos orgánicos de las estructuras vegetativas y reproductivas de *T. arborea*.

Estructura vegetativa o reproductiva	Peso (g) {Peso por peso seco del material vegetal (mg/g)} [Concentración por material vegetal seco (%)]				
	Material vegetal fresco	Material vegetal seco	Extracto hexánico	Extracto metanólico	Extracto crudo de alcaloides
Raíz		n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Corteza de raíz	6220	211.01	13.30 {63.03} [6.30]	12.98 {61.51} [6.15]	5.50 {26.06} [2.61]
Corteza de tronco	646.5	293.54	2.60 {8.86} [0.88]	20.04 {68.27} [6.83]	7.32 {24.94} [2.49]
Ramas	1795.5	727.79	9.00 {12.37} [1.24]	27.17 {37.33} [3.73]	3.45 {4.74} [0.47]
Hojas	2187	632.36	16.89 {26.71} [2.67]	79.22 {125.28} [12.53]	1.92 {3.04} [0.30]
Frutos	1383	180.56	52.18 {288.99} [28.90]	12.39 {68.62} [6.86]	0.21* {1.16} [0.12]
Semillas		35.30	8.07 {228.61} [22.86]	2.25 {63.74} [6.37]	0.02* {0.57} [0.06]

n. d. = no determinado

* Pérdida por emulsión

En los casos de los frutos y semillas y, en menor medida, de las cortezas de raíz de ambas especies, se registraron mayores rendimientos de los extractos hexánicos que de los extractos metanólicos. Además, de la corteza de tronco de *T. alba* – pero no de *T. arborea* – se obtuvo una cantidad ligeramente mayor de extracto hexánico que de extracto metanólico. La observación anterior destacó como un hecho no esperado, ya que generalmente los extractos metanólicos obtenidos a partir de material vegetal suelen presentar rendimientos superiores a los de los extractos hexánicos. Sin embargo, es muy probable que las estructuras vegetativas y reproductivas mencionadas contengan una gran cantidad de ceras y aceites de baja polaridad responsables del alto rendimiento de los extractos hexánicos.

Una serie de pruebas de solubilidad mostró que los arilos de las semillas de ambas especies contenían compuestos de baja polaridad responsables del color anaranjado a rojo de dichas

coberturas carnosas. Posiblemente, se trató de carotenoides.

Ciertamente, hacen falta estudios que evalúen con mayor detalle los perfiles de los compuestos de baja polaridad que forman parte del complejo de metabolitos secundarios biosintetizados por *T. alba* y *T. arborea*, así como por otras especies del mismo género. Estudios afines podrían ampliar el conocimiento que actualmente se tiene sobre aspectos ecológicos, etnobotánicos y farmacológicos de *Tabernaemontana*, considerando especialmente la frecuente actividad biológica de los terpenoides, los metabolitos secundarios de baja polaridad más representativos.

El análisis del rendimiento de los extractos crudos de alcaloides reveló que en ambas especies las estructuras con el mayor rendimiento de estos compuestos nitrogenados fueron las cortezas de raíz y de tronco. Respecto a los extractos alcaloideos de las hojas, los frutos y las semillas de cada especie, se determinaron rendimientos semejantes entre sí, todos menores a las encontradas en las cortezas. Lo anterior concuerda en términos generales con lo reportado para otras especies de *Tabernaemontana* (Van Beek *et al.*, 1984). Además, *T. arborea* tendió a presentar rendimientos de alcaloides más altas que *T. alba* en todas las estructuras vegetativas y reproductivas (*Cuadros 1 y 2*).

6.3. Análisis cromatográfico

6.3.1. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos por TLC

Los extractos crudos de alcaloides obtenidos se analizaron mediante la técnica de TLC. Al exponer las placas cromatográficas desarrolladas a luz UV se detectó un gran número de bandas claramente delimitadas por sus distintas características fluorescentes (Fig. 13 y 14). Después de tratar las placas con cualquiera de los tres reveladores, las bandas distinguibles se redujeron a entre cinco y trece por muestra de mezcla cruda de alcaloides, dependiendo el número de bandas sobre todo del sistema de elución y no tanto de la estructura o especie vegetales de la cual se obtuvo el extracto alcaloideo. De hecho, todos los extractos produjeron un número similar de bandas en el análisis cromatográfico de capa fina.

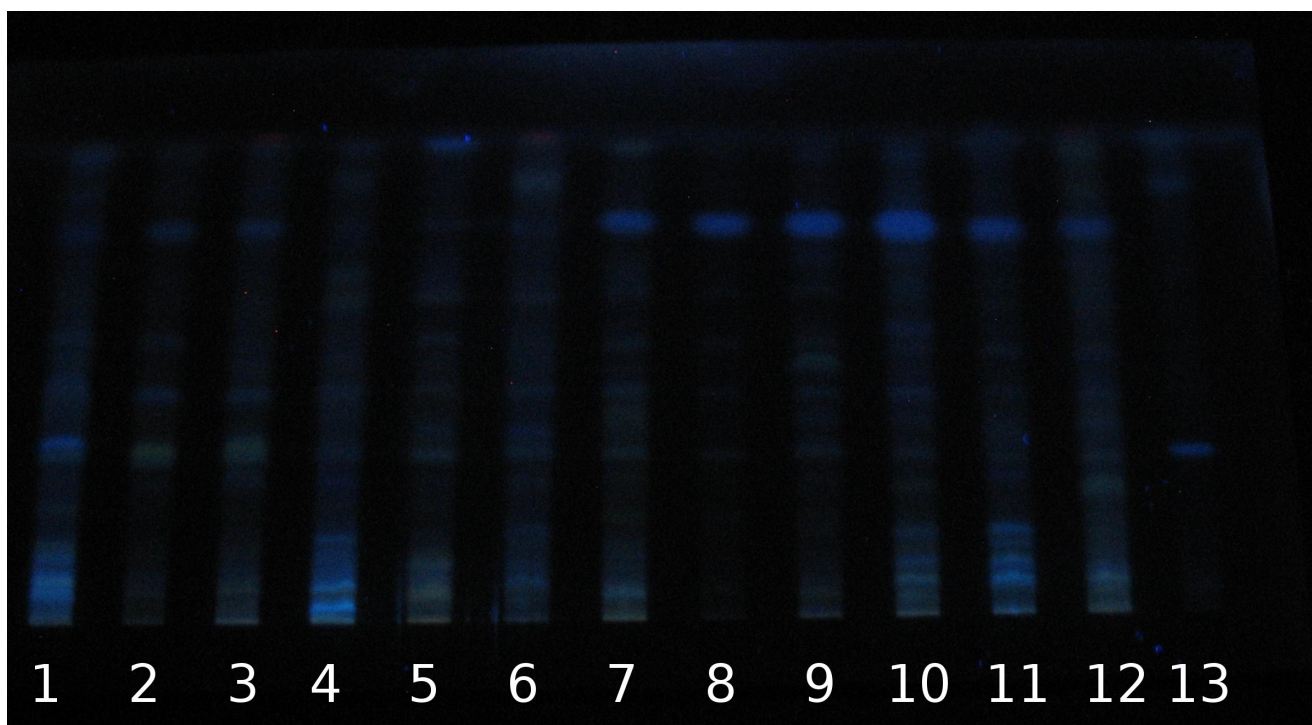


Figura 13: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y un estándar ($CHCl_3:CH_3OH$ (9:1)) vista a 254 nm.

1, 7 = corteza de raíz; 2, 8 = corteza de tronco; 3, 9 = ramas; 4, 10 = frutos; 5, 11 = semillas; 6, 12 = hojas (1 a 6 = *T. alba*; 7 a 12 = *T. arborea*); 13 = estemadonelina

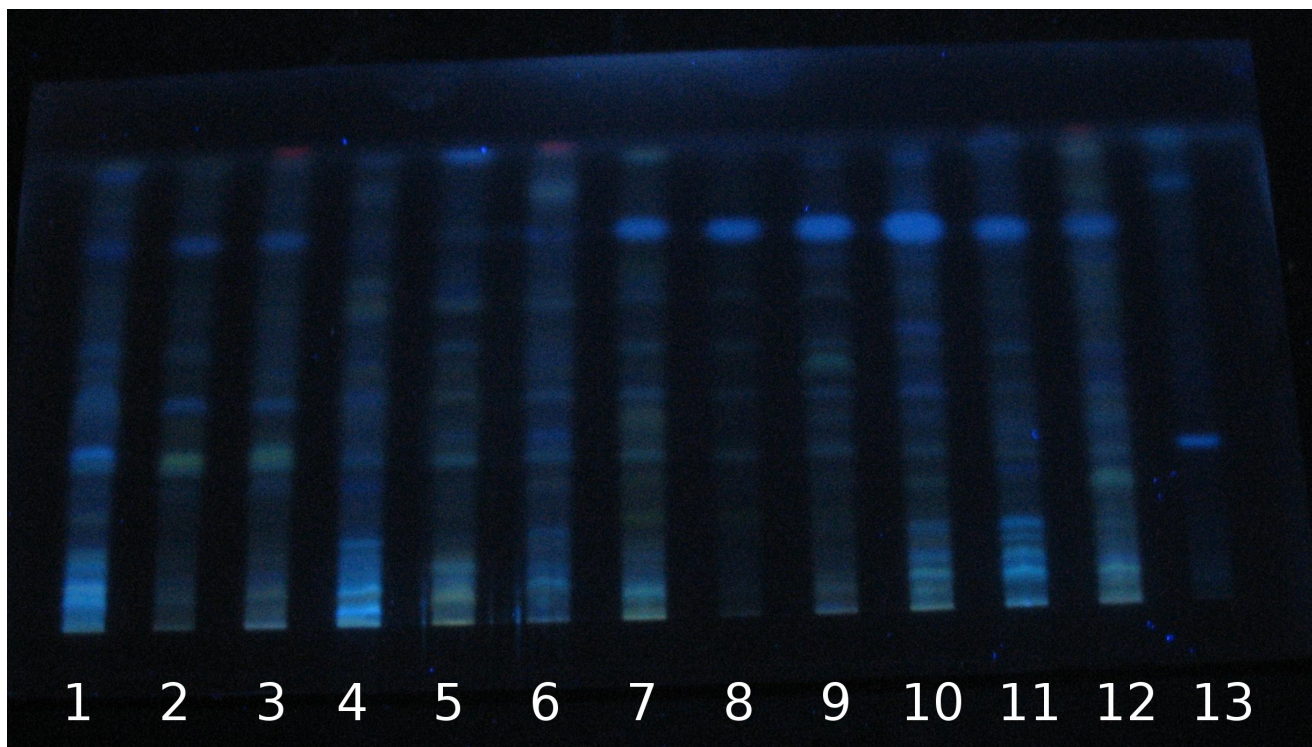


Figura 14: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y un estándar ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1)) vista a 365 nm.

1, 7 = corteza de raíz; 2, 8 = corteza de tronco; 3, 9 = ramas; 4, 10 = frutos; 5, 11 = semillas; 6, 12 = hojas (1 a 6 = *T. alba*; 7 a 12 = *T. arborea*); 13 = estemadonelina

Cabe destacar que los tres reveladores utilizados se escogieron con base en su nivel de especificidad, yendo de lo general a lo particular: el revelador de sulfato cérico sirve para la detección de compuestos orgánicos en general (Fig. 15); el reactivo de Dragendorff determina todo tipo de alcaloides (Fig. 16 y 17); y el revelador de van Urk-Salkowski es específico para alcaloides indólicos (Fig. 18 y 19). Como el número de bandas reveladas fue idéntico o muy similar en los tres casos, se dedujo lo siguiente:

1. Un número importante de los compuestos observados bajo luz UV y todos los compuestos visibles después de revelar corresponden a compuestos con esqueleto indólico.
2. Los porcentajes de alcaloides por peso seco de material vegetal indicados en los Cuadros 1 y 2 representan los contenidos alcaloideos de las diferentes estructuras y especies.

La mejor separación de los alcaloides individuales de cada extracto (y consecuentemente el mayor número de bandas claramente distinguibles por muestra) se logró con el sistema de elución de cloroformo:metanol (9:1) (Fig. 13 a 16 y 18). La disminución de la polaridad del sistema de elución fue

proporcional a la compactación del conjunto de bandas.

En dicho sistema y a simple vista – tanto antes como después de revelar – se hizo evidente que los perfiles de alcaloides eran más parecidos entre las diferentes estructuras vegetativas y reproductivas de la misma especie que entre las mismas estructuras de las dos especies, aunque algunos alcaloides aparentemente se detectaron en varias o todas las estructuras de las dos especies (*Fig. 13 a 19*). Como se mencionó antes, los alcaloides del género *Tabernaemontana* son compuestos complejos consistiendo de una parte estructural indólica y otra monoterpénica cuya ocurrencia se tiende a restringir a una especie o un género (Bhat *et al.*, 2005). Por eso, no fue sorprendente que cada una de las dos especies – aunque comparten un número importante de alcaloides – tuviera un perfil de alcaloides particular, reconocible en todas sus estructuras vegetativas y reproductivas.

Las estructuras que mostraron el mayor grado de similitud en su composición alcaloidea fueron la corteza de tronco y las ramas de la misma especie, respectivamente. Eso era de esperar, sabiendo que en las plantas, los alcaloides suelen acumularse en sitios estratégicos como las inflorescencias, los tejidos meristemáticos y las capas celulares periféricas de raíz y tronco, y no en estructuras interiores menos expuestas a ataques de herbívoros (Roberts *et al.*, 1998). Por lo tanto, los alcaloides contenidos en las ramas debieron concentrarse en la corteza y no en el tejido vascular o la médula, y debido a la unidad anatómica entre la corteza de tronco y la de las ramas, los perfiles de alcaloides de ambas estructuras vegetativas debieron ser muy similares o incluso idénticos.

En ambas especies, el perfil alcaloideo de la corteza de raíz se pareció más al perfil de la corteza de tronco que a cualquier otra estructura, probablemente a causa de las semejanzas anatómica, metabólica y fisiológica entre las dos estructuras vegetativas. En el caso de las estructuras reproductivas (frutos y semillas), éstos fueron más afines entre sí respecto de su composición de alcaloides, lo que se atribuyó a su interdependencia anatómica, metabólica y fisiológica. Las hojas mostraron tanto similitudes como evidentes diferencias en comparación con las otras estructuras. Siendo la función principal de las hojas llevar a cabo la fotosíntesis – y no la protección o la reproducción – lo que implica un desarrollo y una diferenciación anatómica muy diferente a las demás estructuras mencionadas, se puede argumentar que las características únicas del perfil de alcaloides foliar se deban efectivamente a estas diferencias anatómicas y fisiológicas.

No obstante y a pesar de que pueden fungir de productos finales de reacciones de detoxificación, depósitos y fuentes de nitrógeno y otros elementos y moléculas esenciales para el desarrollo vegetal, factores de crecimiento similares a las hormonas, así como subproductos metabólicos, no hay que

perder de vista que los alcaloides de origen vegetal suelen ser primordialmente compuestos de defensa contra insectos y herbívoros (Bhat *et al.*, 2005), y en consecuencia y términos generales, cumplen la misma función en todas las estructuras vegetativas y reproductivas donde se acumulan. Por lo tanto, es importante señalar lo siguiente cuando se intenten explicar las semejanzas y diferencias entre los perfiles alcaloideos de distintas estructuras de la misma especie con base en sus semejanzas y diferencias anatómicas y fisiológicas: La composición y concentración de alcaloides de una estructura vegetativa o reproductiva no depende *per se* de su anatomía o función fisiológica sino de los patrones de desarrollo y diferenciación que posibilitan la adquisición de sus aspectos anatómicos y fisiológicos característicos. En otras palabras, si dos estructuras con diferente anatomía y función fisiológica presentan distintas composiciones y concentraciones de alcaloides, esto no se debe a las particularidades anatómicas y fisiológicas de cada estructura, más bien a las diferentes vías de desarrollo y diferenciación que dieron origen a dichas particularidades. Ambas estructuras planteadas siguen la misma estrategia evolutiva de protegerse contra herbívoros mediante la acumulación de alcaloides cuya composición y concentración varía según patrones de desarrollo y diferenciación intrínsecos surgidos de un continuo proceso de presión evolutiva. Así, la ocurrencia de diferentes alcaloides en distintas estructuras vegetativas y reproductivas bien puede deberse a la exposición de éstas a diferentes insectos y herbívoros – siendo ciertos alcaloides más eficaces contra ciertos organismos – y/o a la no coincidencia de los patrones de desarrollo y diferenciación de las estructuras, lo que a su vez implica diferencias en las vías metabólicas involucradas en la biosíntesis, transformación, transporte y almacenamiento de los alcaloides, o bien, distintas ubicaciones de las estructuras dentro de la misma vía metabólica, resultando en la acumulación de diferentes metabolitos intermediarios (Ziegler *et al.*, 2008).

Respecto de los estándares, el sistema de elución de cloroformo:metanol (9:1) mostró ser el más apropiado en el caso de la ibogamina, la ibogaína y la estemadenina (*Fig. 15, 16 y 18*). No obstante, los demás estándares (la tabersonina, la voacangina, la voacamina, la estemadina, la estemadonelina, la isovoacangina, y la quebrachamina) requirieron de un sistema de menor polaridad y arrojaron los mejores resultados en una proporción de cloroformo:metanol (99:1) (*Fig. 19*). La marcada compactación del conjunto de bandas de cada muestra de los extractos crudos de alcaloides desarrollados en este sistema dificultó la asociación directa de los estándares con las bandas individuales, imposibilitando la identificación de algunos de los alcaloides contenidos en los extractos crudos.

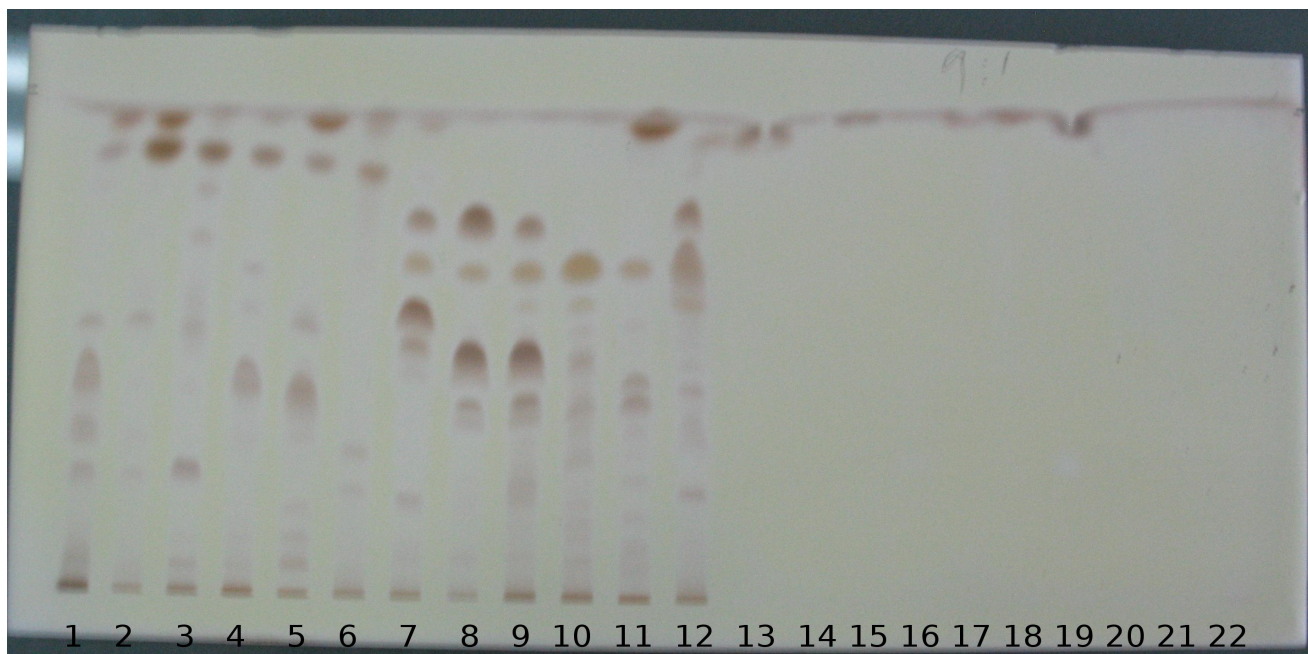


Figura 15: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1)) revelada con sulfato cérico.

1, 7 = corteza de raíz; 2, 8 = corteza de tronco; 3, 9 = ramas; 4, 10 = frutos; 5, 11 = semillas; 6, 12 = hojas (1 a 6 = *T. alba*; 7 a 12 = *T. arborea*); 13 = tabersonina; 14 = voacangina; 15 = voacamina; 16 = ibogamina; 17 = estemadina; 18 = estemadonelina; 19 = ibogaína; 20 = isovoacangina; 21 = estemadenina; 22 = quebrachamina

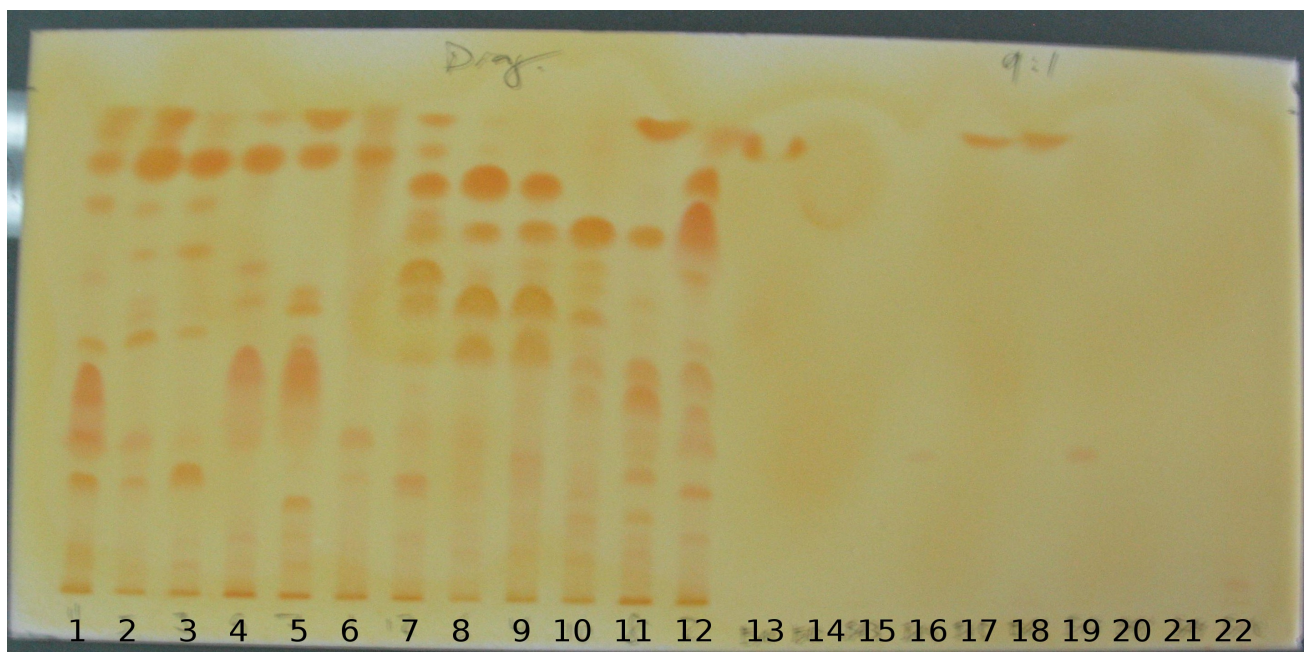


Figura 16: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1)) revelada con Dragendorff.

1, 7 = corteza de raíz; 2, 8 = corteza de tronco; 3, 9 = ramas; 4, 10 = frutos; 5, 11 = semillas; 6, 12 = hojas (1 a 6 = *T. alba*; 7 a 12 = *T. arborea*); 13 = tabersonina; 14 = voacangina; 15 = voacamina; 16 = ibogamina; 17 = estemadina; 18 = estemadonelina; 19 = ibogaína; 20 = isovoacangina; 21 = estemadenina; 22 = quebrachamina

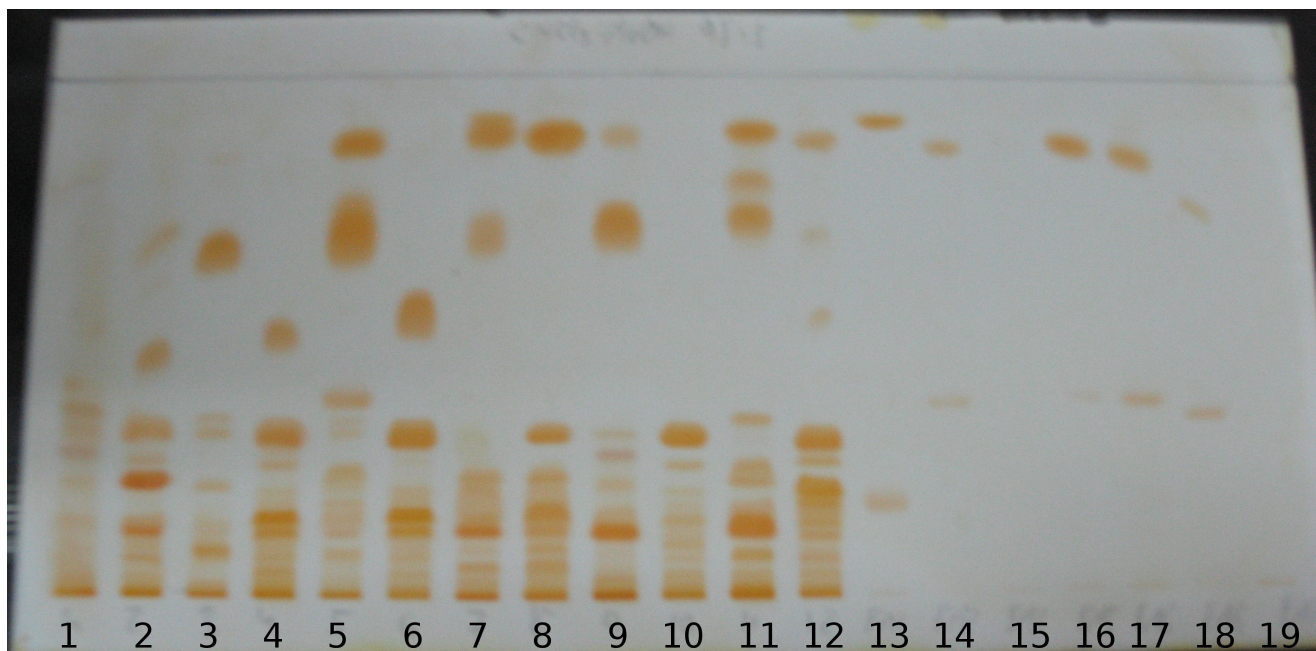


Figura 17: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5)) revelada con Dragendorff.

1, 2 = hojas; 3, 4 = ramas; 5, 6 = corteza de tronco; 7, 8 = semillas; 9, 10 = frutos; 11, 12 = corteza de raíz (números impares = *T. alba*; números pares = *T. arborea*); 13 = tabersonina; 14 = voacangina; 15 = voacamina; 16 = estemadina; 17 = estemadonelina; 18 = isovoacangina; 19 = quebrachamina

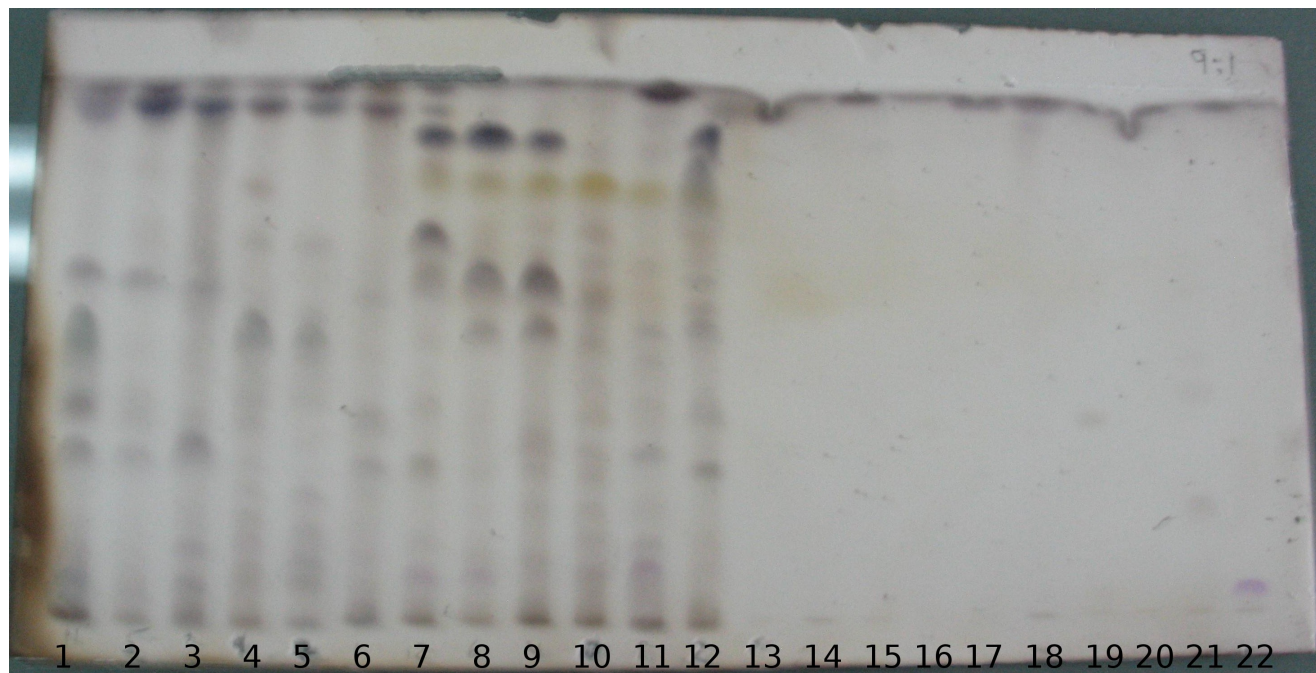


Figura 18: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1)) revelada con van Urk-Salkowski.

1, 7 = corteza de raíz; 2, 8 = corteza de tronco; 3, 9 = ramas; 4, 10 = frutos; 5, 11 = semillas; 6, 12 = hojas (1 a 6 = *T. alba*; 7 a 12 = *T. arborea*); 13 = tabersonina; 14 = voacangina; 15 = voacamina; 16 = ibogamina; 17 = estemadina; 18 = estemadonelina; 19 = ibogaína; 20 = isovoacangina; 21 = estemadenina; 22 = quebrachamina

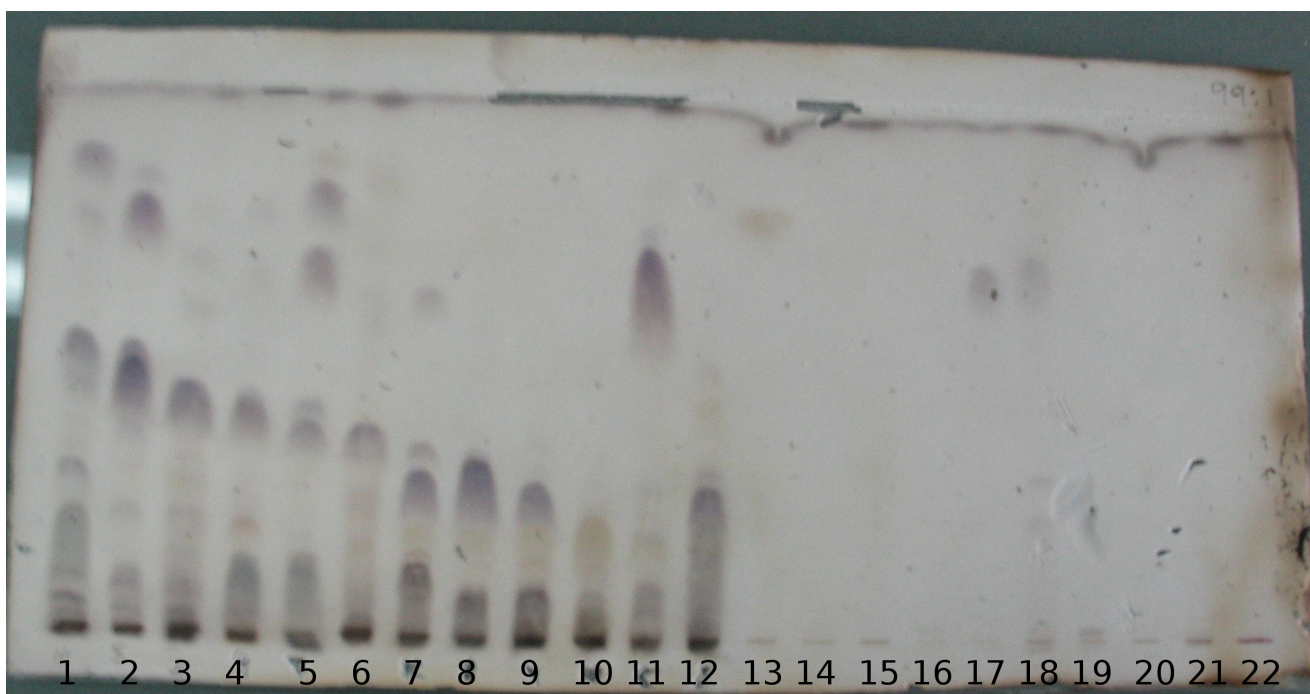


Figura 19: Placa cromatográfica de los extractos crudos alcaloideos y estándares (CHCl₃:CH₃OH (99:1)) revelada con van Urk-Salkowski.

1, 7 = corteza de raíz; 2, 8 = corteza de tronco; 3, 9 = ramas; 4, 10 = frutos; 5, 11 = semillas; 6, 12 = hojas (1 a 6 = *T. alba*; 7 a 12 = *T. arborea*); 13 = tabersonina; 14 = voacangina; 15 = voacamina; 16 = ibogamina; 17 = estemadina; 18 = estemadonelina; 19 = ibogaína; 20 = isovoacangina; 21 = estemadenina; 22 = quebrachamina

En el análisis densitométrico se observó que cuando las placas no reveladas fueron escaneadas entre los 200 y 400 nm, la mayor cantidad de manchas se registró a 220 nm (130 detectadas), siendo ésta la longitud de onda adecuada para el análisis en el UV (*Fig. 20*).

Cuándo las placas fueron reveladas con reactivo de Dragendorff y el análisis se realizó entre los 395 a los 800 nm (*Fig. 21*), se observó que el número de manchas detectadas por el equipo a los 395, 400 y 445 nm fue muy parecido, sin embargo, a partir de los 530 nm el número de manchas empezó a disminuir drásticamente, por lo que se sugiere que la mejor longitud de onda en el visible sea a 445 nm (con 208 manchas detectadas). Lo anterior resulta lógico si se toma en cuenta que la reacción entre el reactivo de Dragendorff – o cualquiera de los otros dos reveladores utilizados – y los compuestos contenidos en los extractos crudos de alcaloides produjo colores visibles a simple vista, y por lo tanto, dentro del espectro visible de la luz.

Debido a la semejanza en la estructura química de los estándares y por consiguiente el factor de retención (Rf), no fue posible la identificación inequívoca de estos compuestos en las diferentes muestras. Por otro lado, la gran complejidad mostrada en estos cromatogramas impidieron un análisis

de presencia de compuestos en las diferentes muestras, ya que una mancha puede ser uno o varios compuestos muy semejantes, por lo que se requiere de procesos de separación de los extractos para realizar un análisis densitométrico mas profundo (Fig. 20 y 21).

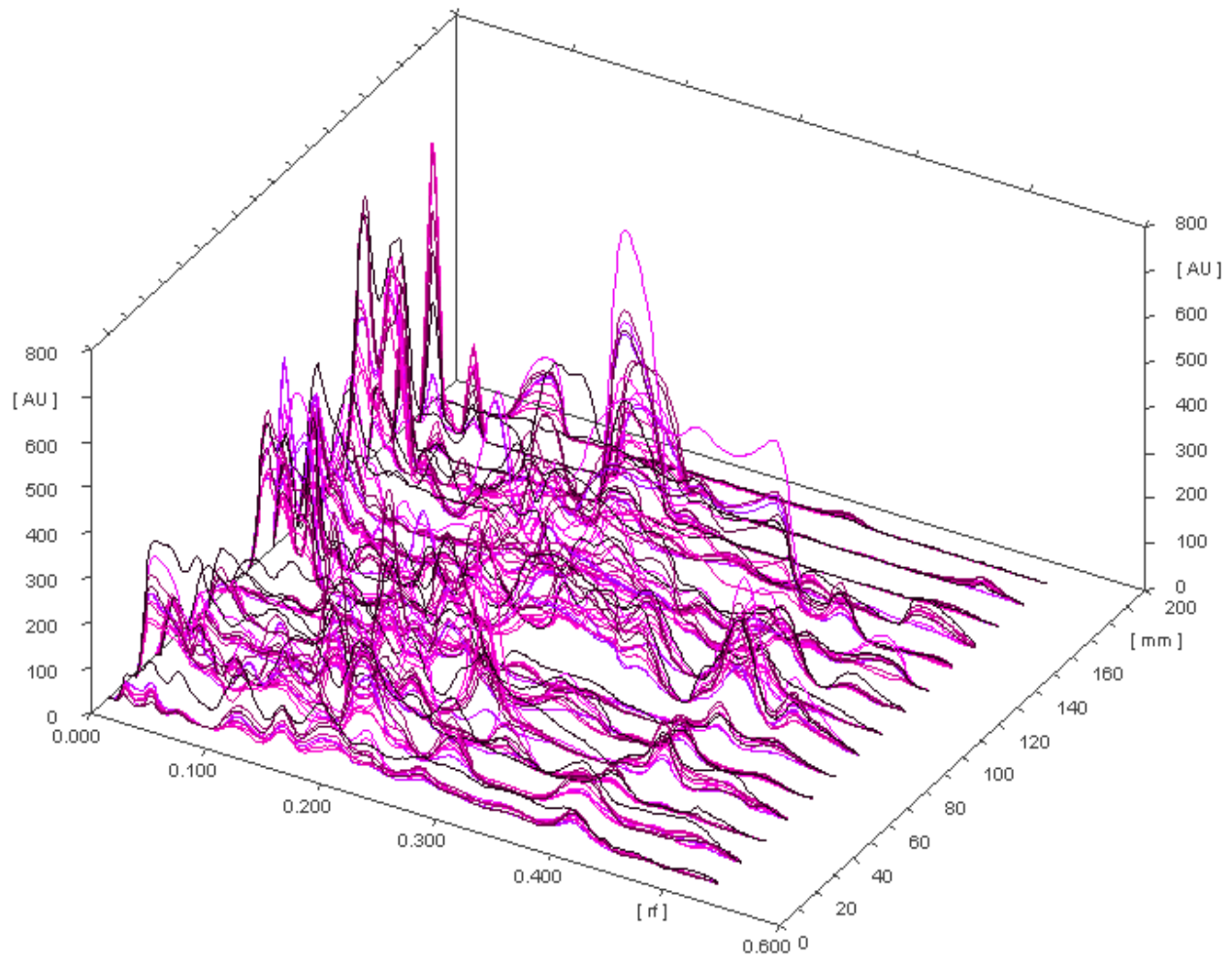


Figura 20: Cromatograma obtenido del análisis densitométrico de una placa desarrollada no revelada leída entre 200 y 380 nm.

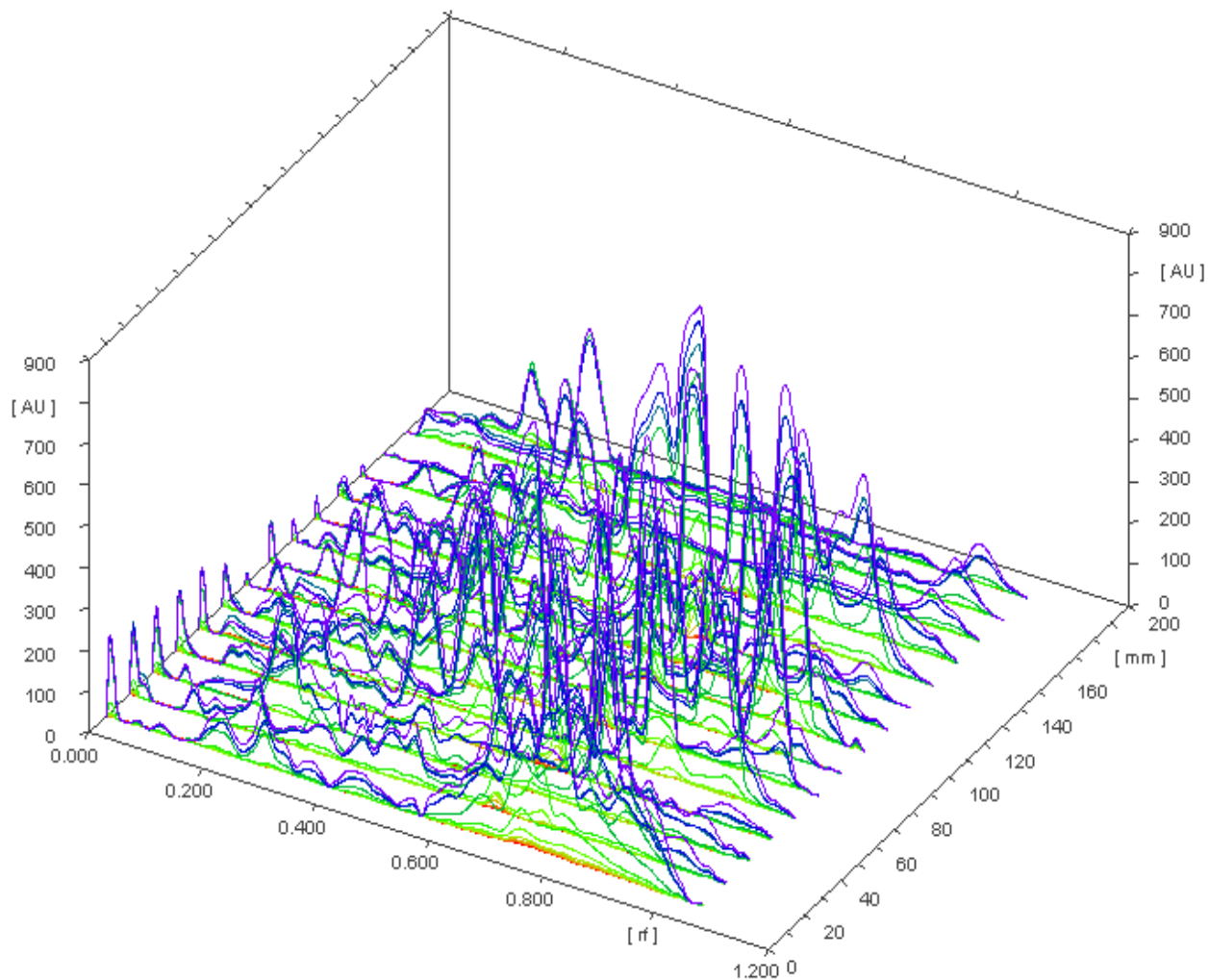


Figura 21: Cromatograma obtenido del análisis densitométrico de una placa desarrollada revelada con Dragendorff y leída entre 395 y 800 nm.

En consecuencia, la determinación de los alcaloides individuales contenidos en las mezclas crudas de este tipo de compuestos no fue contundente, solamente sugiriendo la presencia de la ibogamina y tal vez la ibogaína en algunos o todos de los extractos crudos de alcaloides, sobre todo en placas desarrolladas en los sistemas de elución de cloroformo:metanol (9:1) y, en menor medida, (95:5) (Fig. 17). También resultó probable la ocurrencia de la estemadina y/o la estemadonelina en las semillas de ambas especies, aplicando un sistema de elución de cloroformo:metanol (99:1). Posiblemente presentes estuvieron la voacangina (particularmente en las cortezas de raíz y tronco, y las semillas de ambas especies; sistema de elución cloroformo:metanol 95:5), la isovoacangina (posiblemente en las semillas de ambas especies; sistema de elución cloroformo:metanol 95:5), y la estemadenina

(hipotéticamente en todas las estructuras vegetativas y reproductivas, pero más evidentemente en las semillas de ambas especies; sistemas de elución de cloroformo:metanol (9:1) y (95:5)). Aunque bastante improbable, no se pudo excluir con seguridad la ocurrencia de la tabersonina (sistema de elución cloroformo:metanol (99:1)) y la quebrachamina (sistema de elución cloroformo:metanol (9:1)) en los diferentes extractos crudos de alcaloides. La presencia de la voacamina no se pudo confirmar ni refutar, debido a que no se logró visualizar de manera satisfactoria en ningún sistema de elución. Sin embargo, existen antecedentes que documentan la detección de este alcaloide en la savia de *T. arborea* (Kingston, 1978), haciendo probable que se encuentre en alguno o varios de los extractos analizados. También documentada está la ocurrencia de la isovoacangina y la voacangina en las semillas de *T. arborea* (Chaverri *et al.*, 1980), mientras que la tabersonina se encontró en dichas estructuras reproductivas de ambas especies (Chaverri *et al.*, 1980; Van Beek *et al.*, 1984). Otros alcaloides reportados para *T. alba* y *T. arborea* son la coronaridina y la epivoacarina, respectivamente (Van Beek *et al.*, 1984; Kingston, 1978), pero a raíz de la no disponibilidad de los estándares correspondientes en el presente trabajo, no se pudo hacer ninguna manifestación al respecto.

El revelador más útil fue el de van Urk-Salkowski, ya que produjo varias bandas individuales de diferentes colores, proporcionando así un segundo indicador de identificación aparte del Rf. Lo anterior resultó sumamente valioso en el caso de los sistemas de elución menos polares, debido a la considerable compactación de las bandas de cada muestra.

6.3.2. Análisis de los perfiles alcaloideos de los extractos e identificación y cuantificación de alcaloides individuales por HPLC

La segunda técnica de cromatografía a la que fueron sometidos los extractos crudos de alcaloides fue HPLC. Después de hacer las pruebas de corrimiento de los extractos y de construir las curvas de calibración, se realizaron los cálculos para identificar y cuantificar cinco estándares en cada extracto:

Cuadro 3: Concentración de alcaloides identificados en las estructuras vegetativas y reproductivas de T. alba.

Estructura	Alcaloides por peso seco del material vegetal (µg/g)*				
	<i>Ibogamina</i>	<i>Estemadina</i>	<i>Isovoacangina</i>	<i>Estemadenina</i>	<i>Estemadonelina</i>
Corteza de raíz	6.40	7.30	n. d.	50.50	n. d.
Corteza de tronco	12.58	7.92	4.33	175.59	n. d.
Ramas	0.24	0.33	0.21	24.86	n. d.
Hojas	2.66	1.14	1.87	0.76	0.26
Frutos	0.06	0.06	n. d.	27.50	n. d.
Semillas	2.20	2.48	1.02	19.77	n. d.

n. d. = no determinado

** Cada dato representa la media de tres repeticiones.*

Cuadro 4: Concentración de alcaloides identificados en las estructuras vegetativas y reproductivas de T. arborea.

Estructura	Alcaloides por peso seco del material vegetal (µg/g)*				
	<i>Ibogamina</i>	<i>Estemadina</i>	<i>Isovoacangina</i>	<i>Estemadenina</i>	<i>Estemadonelina</i>
Corteza de raíz	13.04	15.33	34.31	286.99	6.19
Corteza de tronco	5.72	7.08	n. d.	374.36	7.51
Ramas	n. d.	n. d.	n. d.	65.06	0.29
Hojas	4.40	2.29	0.57	35.79	n. d.
Frutos	0.87	1.10	0.01	17.78	n. d.
Semillas	3.23	4.04	0.58	7.41	n. d.

n. d. = no determinado

** Cada dato representa la media de tres repeticiones.*

Se registraron entre 10 y 20 picos por muestra de los extractos crudos de alcaloides, todos detectados dentro de un intervalo de uno a 12 minutos después de iniciar el análisis (*Fig. 22 y 23*). Tomando en cuenta que la columna utilizada era específica para alcaloides indólicos, se propone que

los picos corresponden a este grupo de compuestos orgánicos.

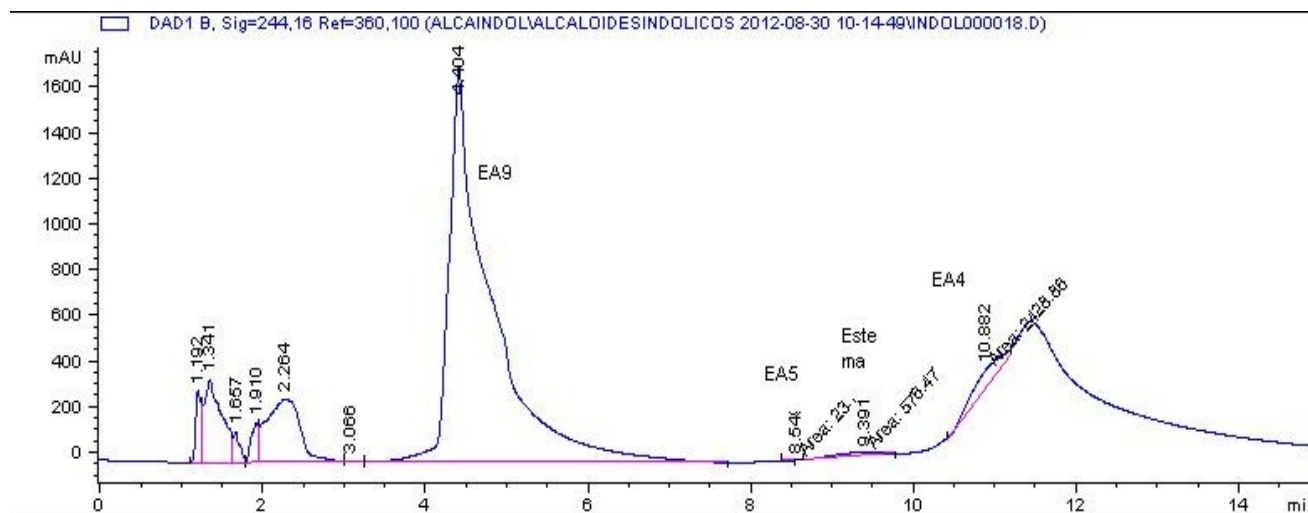


Figura 22: Cromatograma obtenido del análisis por HPLC del extracto alcaloideo de la corteza de raíz de *T. alba*.

EA4 = ibogamina; EA5 = estemadina, EA9 = estemadenina; Estema = estemadonelina

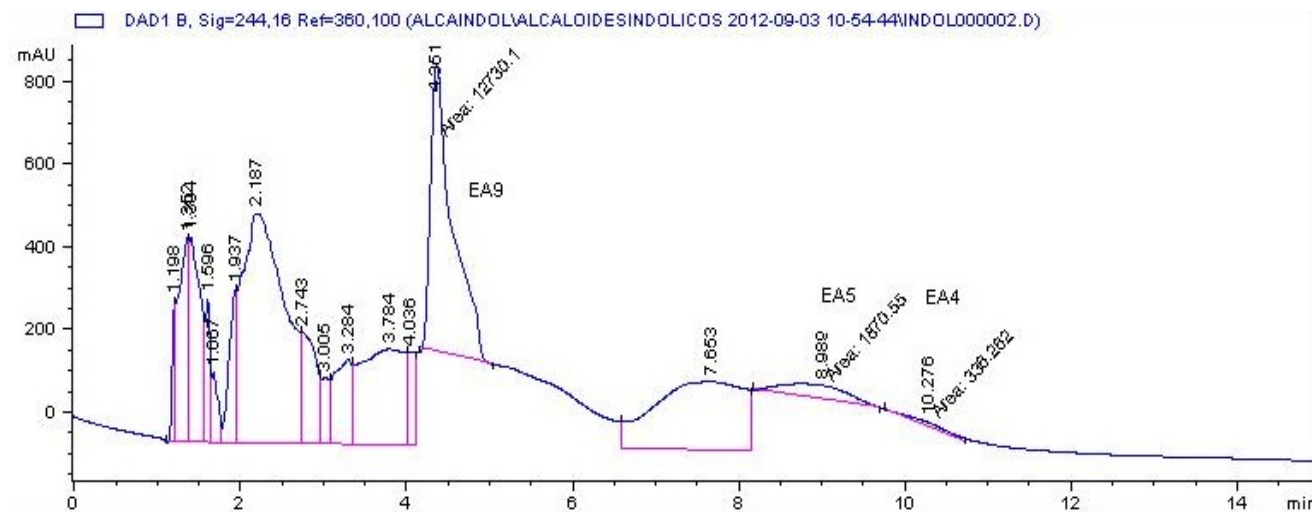


Figura 23: Cromatograma obtenido del análisis por HPLC del extracto alcaloideo de la corteza de tronco de *T. arborea*.

EA4 = ibogamina; EA5 = estemadina, EA9 = estemadenina

La cantidad de picos detectados por HPLC coincidió con el número de bandas obtenidas en el análisis por TLC, atribuyendo el moderado exceso cuantitativo de los picos en comparación con las bandas a la precisión superior de la técnica de HPLC.

Solamente cinco de los estándares utilizados – correspondiendo a la ibogamina, la estemadina, la isovoacangina, la estemadenina y la estemadonelina – mostraron grados de pureza aceptables, presentando un solo pico en los cromatogramas respectivos y sirviendo así como referencia para la identificación de algunos de los alcaloides contenidos en los extractos crudos. Dichos estándares se encontraron en conjunto y diferentes concentraciones y proporciones en casi todas las muestras (Cuadros 3 y 4). Cabe destacar que anteriormente al presente trabajo y con excepción de la isovoacangina – que solamente se había encontrado en las semillas de *T. arborea* (Chaverri *et al.*, 1980) – ninguno de los alcaloides detectados había sido reportado para las dos especies de *Tabernaemontana* revisadas.

A nivel de planta completa, *T. arborea* presentó rendimientos de los cinco alcaloides identificados considerablemente mayores que *T. alba*, tomando en cuenta tanto el contenido total (suma de las cantidades de los cinco alcaloides) como los rendimientos individuales (la cantidad de cada alcaloide por separado). A nivel de estructura, esta relación no se cumplió en el caso de los frutos y las semillas, teniendo *T. alba* cantidades alcaloideas totales ligeramente más grandes que *T. arborea*.

En las dos especies, las estructuras vegetativas y reproductivas que mostraron el mayor rendimiento de los cinco alcaloides en conjunto fueron las cortezas de raíz y de tronco, seguidas por los frutos y las semillas en el caso de *T. alba* y las hojas en el caso de *T. arborea*. Generalmente, los alcaloides individuales siguieron el mismo patrón, concentrándose en mayor cantidad en las cortezas.

El alcaloide detectado con más abundancia fue con mucho la estemadenina (con un rendimiento máximo más de 10 veces mayor que el valor correspondiente al segundo alcaloide más abundante), seguida por la isovoacangina, la estemadina, la ibogamina y la estemadonelina.

La estemadenina se encontró en mayor cantidad en las cortezas de raíz y tronco de *T. arborea*, mientras que el mayor rendimiento de la isovoacangina se detectó en la corteza de raíz de *T. arborea*, siguiendo su ocurrencia en las demás estructuras de ambas especies un patrón irregular de valores bajos o nulos. La estemadina se registró sobre todo en la corteza de raíz de *T. arborea*, mientras que la ibogamina se encontró en cantidades muy semejantes en dicha estructura vegetativa y especie, y la corteza de tronco de *T. alba*. La presencia de la estemadonelina se limitó a los dos tipos de corteza de *T. arborea*, dejando a un lado las hojas de *T. alba* cuyo contenido de este alcaloide fue muy bajo.

Comparando las concentraciones de los cinco compuestos detectados por HPLC con los rendimientos de las mezclas alcaloideas completas por peso seco de material vegetal mencionados

en los *Cuadros 1 y 2*, se hizo evidente que los primeros eran significativamente inferiores a los últimos. Para explicar lo anterior, se establecieron dos hipótesis no excluyentes:

1. Los extractos alcaloideos crudos consistieron tanto de componentes minoritarios (entre ellos los cinco alcaloides detectados), presentes en magnitudes de μg por g de material vegetal seco, como mayoritarios (no identificados), apareciendo en cantidades de mg por g de material vegetal seco.
2. Los extractos crudos de alcaloides consistieron de muchísimos componentes minoritarios de los cuales solamente se lograron identificar los cinco alcaloides mencionados.

La primera hipótesis estuvo acorde con la observación de que en las placas cromatográficas desarrolladas durante el análisis por TLC, las bandas de las mezclas alcaloideas crudas que posiblemente correspondieran a algunos de los estándares usados, presentaron grosores e intensidades bajos a medianos en comparación con las demás bandas. Siguiendo la misma lógica, las bandas más intensas y gruesas de las placas cromatográficas debieron corresponder a los compuestos mayoritarios.

No obstante, también se podría argumentar que el gran número de picos observados tanto en el análisis por TLC como en el por HPLC respalda la segunda hipótesis, sabiendo además que ninguno de los dos métodos analíticos puede garantizar la separación, detección e identificación de absolutamente todos los componentes contenidos en una muestra; cualquier placa cromatográfica desarrollada o cromatograma obtenido únicamente permite visualizar resultados específicos dentro de un sistema, tiempo y espacio determinados, y cualquier modificación de estas variables puede proporcionar resultados muy distintos.

6.4. Pruebas biológicas

6.4.1. Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*

Posterior al análisis fitoquímico, se probó la actividad biológica de los extractos alcaloideos crudos. Primero, se hizo un ensayo de citotoxicidad general, observando el efecto de los extractos sobre la sobrevivencia de *Artemia salina*. El siguiente diagrama resume los resultados obtenidos:

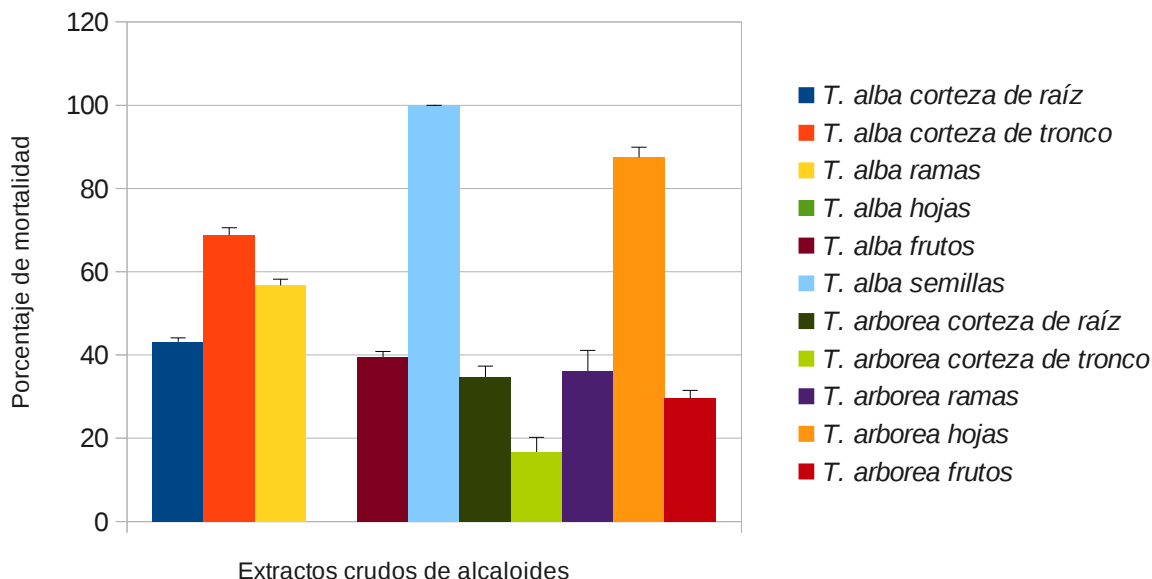


Figura 24: Porcentajes de mortalidad registrados para los extractos crudos de alcaloides de *T. alba* y *T. arborea* a una concentración de 1000 ppm y después de 48 horas. Los porcentajes se calcularon con base en la media de cinco repeticiones por tratamiento. Las barras representan la desviación estándar.

En general, los extractos alcaloideos de *T. alba* presentaron una mayor citotoxicidad que los extractos de *T. arborea*, con excepción de los extractos de las hojas de cada especie. El extracto de las semillas de *T. alba* mostró la actividad citotóxica más marcada, pero como el extracto de las semillas de *T. arborea* no se incluyó en los bioensayos por falta de material, no se pudieron extrapolar los resultados del primer extracto a las semillas en general. Lo mismo fue cierto para las hojas, ya que en el caso de *T. arborea* éstas resultaron ser la estructura más citotóxica, mientras que en *T. alba*, la tasa de mortalidad determinada para el extracto foliar fue nula. Los frutos y las cortezas de raíz y de tronco de ambas especies ostentaron tasas de mortalidad bajas o medianas – oscilando entre 16 y 44% – salvo en el caso del extracto de la corteza del tronco de *T. alba*.

Debido a que se midió la citotoxicidad de los extractos alcaloideos, y no la de los extractos metanólicos o acuosos, los rendimientos totales de alcaloides de los *Cuadros 1 y 2* no son relevantes para el análisis de los resultados del ensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*. En otras palabras, en el presente trabajo se asociaron únicamente los perfiles alcaloideos (las mezclas de alcaloides individuales) de las distintas estructuras pero no el rendimiento total de alcaloides por peso seco de material vegetal con la citotoxicidad de cada estructura. Si el mismo bioensayo se hubiera hecho con los extractos metanólicos de ambas especies, posiblemente *T. arborea* hubiera mostrado una mayor actividad citotóxica que *T. alba*, debido a que el rendimiento total de alcaloides era más alta en la primera que en la segunda especie. Siguiendo la misma lógica y de forma general, tal vez los extractos de las cortezas de raíz y tronco hubieran resultado los de mayor citotoxicidad bajo las condiciones experimentales hipotéticas descritas anteriormente.

Los rendimientos totales de alcaloides determinados fueron relativamente altos en todas las estructuras y especies examinadas, justificando una hipotética explotación farmacéutica de las partes vegetales cuyos perfiles alcaloideos presentaran la actividad citotóxica más conveniente para tratamientos médicos afines.

Cabe destacar que no se logró asociar ninguno de los cinco alcaloides identificados por HPLC directamente con la actividad citotóxica de los extractos crudos. Al comparar las concentraciones de dichos alcaloides contenidas en las diferentes estructuras entre sí, se destaca que los dos extractos que presentaron las mayores tasas de mortalidad en el ensayo realizado (correspondientes a los extractos de las semillas de *T. alba* y de las hojas de *T. arborea*), tenían concentraciones intermedias o, en el caso de la estemadonelina, nulas de los alcaloides identificados. De igual manera, los extractos que contenían estos alcaloides en mayor cantidad, obtenidos a partir de los dos tipos de corteza de ambas especies, se asociaron con tasas de mortalidad medianas o bajas. Por lo tanto, es poco probable que la citotoxicidad de los extractos se deba principalmente a alguno o varios de los alcaloides listados en los *Cuadros 3 y 4*. Sin embargo, especialmente la ibogamina y la isovoacangina podrían contribuir a la actividad citotóxica total de los extractos, ya que varios estudios han demostrado su efecto inhibitorio del crecimiento de líneas celulares de carcinoma humano como THP-1 (leucemia), SKBR-3 (mama), C-8161 (melanoma) y/o A2780 (ovario) (Figueiredo *et al.*, 2010; Pereira *et al.* 2008; Prakash Chaturvedula *et al.*, 2003).

De lo anterior se desprende que muy probablemente los alcaloides determinados por HPLC no son los principales causantes de la actividad citotóxica de los extractos alcaloideos, conteniendo éstos otros alcaloides indólicos en mayor cantidad o variedad que sean los responsables de dicha actividad.

En lo que concierne al extracto de semillas de *T. alba*, no se puede descartar que su alta citotoxicidad estuviera relacionada con alguno o varios de los alcaloides tentativamente detectados mediante TLC, pero no HPLC, ya que fueron efectivamente las semillas de ambas especies que parecían presentar la mayor variedad de los diez estándares probados. Por lo tanto, sin tener la certeza de que realmente formen parte de la composición química de las semillas de *T. alba*, es posible que la ibogaína, la voacangina, la tabersonina y/o la quebrachamina jueguen un papel importante en la actividad citotóxica de alguno o varios de los extractos alcaloideos crudos probados. En los casos de la voacangina y la tabersonina, existen publicaciones que comprueban su eficacia contra varias líneas celulares de carcinoma humano como SW480 (colon), SMMC-7721 (hígado), HL-60 (leucemia), MCF-7 (mama), A-549 (pulmón), THP-1 (leucemia) y/o A2780 (ovario) (Cai *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2010; Prakash Chaturvedula *et al.*, 2003).

De los alcaloides reportados para *T. alba* y/o *T. arborea* pero no detectados en el presente trabajo, la coronaridina tiene registros de ser citotóxicamente activa contra la línea celular A2780 (ovario) (Prakash Chaturvedula *et al.*, 2003).

Ciertamente, la identificación de los principales alcaloides responsables de la citotoxicidad observada de los extractos crudos no será posible sin estudios más amplios y detallados, comprendiendo en particular la obtención de compuestos puros cuya actividad citotóxica podrá posteriormente ser probada en bioensayos similares a las realizadas en el presente trabajo. También habría que aclarar si la citotoxicidad observada está asociado o no con efectos sinérgicos y/o antagonistas.

6.4.2. Bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano

El segundo ensayo acerca de la actividad biológica de los extractos crudos de alcaloides fue más específico que el primero, y consistió en probar la capacidad de los extractos de inhibir el crecimiento de seis líneas celulares de carcinoma humano. Cabe destacar que esta parte experimental se llevó a cabo únicamente con los extractos alcaloideos de las semillas de *T. alba* y de las hojas de *T. arborea*, debido a la marcada actividad citotóxica que éstos habían mostrado en el bioensayo de *Artemia salina*. Los resultados se presentan en el Cuadro 5:

Cuadro 5: Inhibición del crecimiento de diferentes líneas celulares de carcinoma humano para los extractos crudos de alcaloides de las semillas de *T. alba* y las hojas de *T. arborea*.

	Inhibición del crecimiento por línea celular (en % con error estándar de la media)					
Extracto alcaloideo	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Semillas de <i>T. alba</i>	69.5±5.5	89.1±4.3	100	76.4±4.6	93.6±2.9	86.4±0.8
Hojas de <i>T. arborea</i>	61.6±3.9	92.9±3.0	100	79.7±5.5	69.4±4.1	64.9±1.2

U251 = glía de sistema nervioso central, PC-3 = próstata, K562 = leucemia, HCT-15 = colon, MCF-7 = mama, SKLU = pulmón

Los resultados del primer bioensayo de citotoxicidad coincidieron con los resultados del segundo ensayo, ya que en este último, el porcentaje de inhibición del crecimiento fue superior a 60% en todas las líneas celulares probadas. Ambos extractos mostraron su máxima eficacia inhibidora de crecimiento en líneas celulares de leucemia, alcanzando porcentajes del 100%. Respecto de las líneas celulares del sistema nervioso central, de la próstata y del colon, los resultados fueron relativamente similares para ambos extractos. No obstante, el porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares de carcinoma de mama y de pulmón fue considerablemente más alto en el caso del extracto de las semillas de *T. alba* que en el de las hojas de *T. arborea*. Hay que recordar que el primer extracto se probó a una concentración dos veces mayor que la concentración del segundo, y por lo tanto, es posible que la mayor eficacia del extracto de semillas de *T. alba* en el caso de las líneas celulares mencionadas, se debiera a dicha diferencia de concentración.

Como en el caso del bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*, no se pudo asociar la capacidad de los extractos de inhibir el crecimiento de las seis líneas celulares con alguno o algunos alcaloides en particular, y las especulaciones hechas en el apartado anterior acerca de los principios activos responsables de la actividad citotóxica de los extractos, también se pueden aplicar a los resultados del bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares.

En resumen y a raíz de lo observado, es probable que todas las estructuras vegetativas y reproductivas de las dos especies de *Tabernaemontana* presenten actividad citotóxica a niveles significativos, y la utilidad de cada estructura como inhibidor del crecimiento de líneas celulares de carcinoma humano podría persistir más en su respectivo grado de selectividad que en su citotoxicidad total o promedio. Es decir, aunque en este trabajo se probó la capacidad inhibidora del crecimiento celular de los dos extractos de alcaloides más activos en el bioensayo de *Artemia salina* (bajo el supuesto que éstos también iban a ser los más eficaces en el ensayo de las líneas celulares), los demás extractos alcaloideos podrían presentar un efecto inhibidor igualmente alto sobre una línea celular específica, pero efectos significativamente menos marcados sobre las demás líneas celulares, lo que elevaría su valor como potencial fármaco anticancerígeno selectivo. Obviamente y con base en los resultados del Cuadro 5, los campos de tratamiento más prometedores de posibles fármacos derivados a partir de *T. alba* y *T. arborea* parecen estar vinculados a la leucemia y en menor medida al cáncer de próstata, así como, en el caso de *T. alba*, a los cánceres de mama y de pulmón. No obstante, la actividad inhibidora del crecimiento celular fue significativa en todas las líneas probadas, y por lo tanto, valdría la pena llevar a cabo experimentos más detallados para determinar el valor terapéutico potencial de los alcaloides biosintetizados por las dos especies. Investigaciones de este tipo deberían considerar tanto extractos alcaloideos crudos como fracciones y alcaloides individuales obtenidos a partir de los primeros, ya que los dos últimos pueden presentar una actividad mayor o menor que las mezclas naturales.

VII. CONCLUSIONES

- Las diferentes estructuras vegetativas y reproductivas de las dos especies de *Tabernaemontana* mostraron presencia de alcaloides indólicos.
- Los perfiles de alcaloides fueron complejos en todas las estructuras y en ambas especies.
- Los perfiles alcaloideos mostraron semejanzas en el número y la composición de alcaloides detectados entre las diferentes estructuras vegetativas y reproductivas de una especie y entre especies, presentando no obstante más afinidades entre las diferentes estructuras de la misma especie que entre las mismas estructuras de las diferentes especies.
- Tanto a nivel de planta completa como de estructura, *T. arborea* presentó mayores rendimientos de alcaloides que *T. alba*.
- Las estructuras con las mayores concentraciones de alcaloides fueron los dos tipos de corteza en ambas especies.
- Se encontraron la ibogamina, la estemadina, la isovoacangina, la estemadenina y la estemadonelina en la mayoría de las estructuras de las dos especies.
- Con excepción de las hojas de *T. alba*, todas las estructuras vegetativas y reproductivas de ambas especies presentaron actividad citotóxica en el modelo de *Artemia salina*.
- Los mayores niveles de citotoxicidad se detectaron en las semillas de *T. alba* y las hojas de *T. arborea* en el modelo de *Artemia salina*.
- Dichas estructuras también mostraron una alta eficacia en inhibir el crecimiento de seis líneas celulares de carcinoma humano.
- No se observó ninguna relación evidente entre los perfiles cromatográficos obtenidos y las actividades citotóxicas registradas.

REFERENCIAS

- Achenbac, H. 1966. O-Demethylpalosin: Ein neues Alkaloid aus *Tabernaemontana amygdalifolia*. *Tetrahedron Letters*, (19): 5027-5030.
- Achenbac, H. 1967. 10-Oxo-Cylindrocarpidin: Ein neues Alkaloid aus *Tabernaemontana amygdalifolia*. *Tetrahedron Letters*, (19): 1793-1797.
- Achenbac, H. 1967. Homocylindrocarpidin und 17-Demethoxy-Cilindrocarpidin: Zwei neue Alkaloide aus *Tabernaemontana amygdalifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung*, B 22 (9): 955-957.
- Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A. & Sivakumar, M. 2005. *Chemistry of Natural Products*. Narosa Publishing House, New Delhi.
- Cai, X. H., Jiang, H., Li, Y., Cheng, G. G., Liu, Y. P., Feng, T. & Luo, X. D. 2011. Cytotoxic Indole Alkaloids from *Melodinus fusiformis* and *M. morsei*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9 (4): 259-263.
- Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K. & Chattipakorn, N. 2006. *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE) inhibits rats' cortical AchE activity and enhances neuronal activity. *Neuroscience Research*, 55 (1): S101.
- Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K. & Chattipakorn, N. 2007. *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110 (1): 61-68.
- Chaverri-Chaverri, C. G. & Cicció-Alberti, J. F. 1980. Seed alkaloids of *Tabernaemontana arborea* (Apocynaceae). *Revista Latinoamericana de Química*, 11: 64.
- Danieli, B. & Palmisano, G. 1986. Chapter 1. Alkaloids from *Tabernaemontana*. En: Brossi, A. (Ed.). *The Alkaloids*. Vol. 27. Academic Press, Inc., Orlando, Florida, pp 1-124.
- Fatima, T., Crank, G. & Wasti, S. 1988. Alkaloids from *Trachelospermum jasminoides*. *Planta Medica*, 54 (4): 364.
- Ehmann, A. 1977. The van Urk-Salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography*, 132: 267-276.
- Figueiredo, E. R., Vieira, I. J. C., De Souza, J. J., Braz-Filho, R., Mathias, L., Kanashiro, M. M., Cortes, F. H. 2010. Isolation, identification and antileukemic activity of the monoterpene indole alkaloids from *Tabernaemontana salzmannii* A. DC., Apocynaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20 (1): 75-81.
- Fujii, M., Takei, I. & Umezawa, K. 2009. Antidiabetic effect of orally administered conophylline-containing plant extract on streptozotocin-treated and Goto-Kakizaki rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63 (10): 710-716.

- Guevara, S., Laborde, J., Liesenfeld, D. & Barrera, O. 1997. Potrereros y ganadería. En: González Soriano, E., Dirzo, R. & Vogt, R. C. (Eds.). *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Instituto de Biología, UNAM, CONABIO, Instituto de Ecología, UNAM, México, D. F., pp. 43-58.
- Hernández Ortiz, V. 1997. Tephritidae (moscas de la fruta). En: González Soriano, E., Dirzo, R. & Vogt, R. C. (Eds.). *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Instituto de Biología, UNAM, CONABIO, Instituto de Ecología, UNAM, México, D. F., pp. 311-317.
- Ingkaninan, K., Changwijit, K. & Suwanborirux, K. 2006. Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58 (6): 847-852.
- Juárez-Jaimes, V., Alvarado Cárdenas, L. O. & Villaseñor, J. L. 2007. La familia Apocynaceae *sensu lato* en México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78: 459-482.
- Kam, T. S., Pang, H. S. & Lim, T. M. 2003. Biologically active indole and bisindole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Chemistry & Biodiversity*, 1 (4): 646-656.
- Kam, T. S., Pang, H. S., Choo, Y. M. & Komiyama, K. 2004. Biologically active ibogan and vallesamine derivatives from *Tabernaemontana divaricata*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1 (8): 1292-1297.
- Kam, T. S. & Pang, H. S. 2004. Conoduserine, a new biologically active bisindole alkaloid from *Tabernaemontana divaricata*. *Heterocycles*, 63 (4): 845-850.
- Kingston, D. G. I. 1978. Plant anticancer agents VI: Isolation of voacangine, voacamine and epivoacorine from *Tabernaemontana arborea* sap. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67: 271-272.
- Kitajima, M., Iwai, M., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Iida, M., Yabushita, H. & Takayama, H. 2011. Discovery of indole alkaloids with cannabinoid CB1 receptor antagonistic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 (7): 1962-1964.
- Kojima, I. & Umezawa, K. 2006. Conophylline: A novel differentiation inducer for pancreatic beta cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38 (5-6): 923-930.
- Lim, K. H. & Kam, T. S. 2009. Conoliferine and isoconoliferine, structurally novel-alkaloid-lignan conjugates from *Tabernaemontana corymbosa*. *Tetrahedron Letters*, 80 (27): 3756-3759.
- Lim, K. H. & Kam, T. S. 2009. Conomicidines A and B, unusual alkaloid-hydroxycinnamyl alcohol conjugates from *Tabernaemontana corymbosa*. *Helvetica Chimica Acta*, 92 (9): 1895-1902.
- Low, Y. Y., Lim, K. H., Choo, Y. M., Pang, H. S., Etoh, T., Hayashi, M., Komiyama, K. & Kam, T. S. 2010. Structure, biological activity, and a biomimetic partial synthesis of the lirofolines, novel pentacyclic indole alkaloids from *Tabernaemontana*. *Tetrahedron Letters*, 51 (2): 269-272.
- Mansoor, T. A., Ramalho, R. M., Mulhovo, S., Rodrigues, C. M. & Ferreira, M. J. 2009. Induction of apoptosis in HuH-7 cancer cells by monoterpene and beta-carboline indole alkaloids isolated from the leaves of *Tabernaemontana elegans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (15): 4255-4258.

- Mansoor, T. A., Ramalheite, C., Molnár, J., Mulhovo, S. & Ferreira, M. J. 2009. Tabernines A-C, beta-carbolines from the leaves of *Tabernaemontana elegans*. *Journal of Natural Products*, 72 (6): 1147-1150.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L. & Anderson, J. E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32: 513-524.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. & McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45 (5): 31-34.
- Pereira, C. G., Leal, P. F., Sato, D. N. & Meireles, M. A. 2005. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. *Journal of Medicinal Food*, 8 (4): 533-538.
- Pereira, P. S., De Castro Franca, S., De Oliveira, P. V. A., De Souza Breves, C. M., Pereira, S. I. V., Sampaio, S. V., Nomizo, A. & Dias, D. A. 2008. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: A brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. *Química Nova*, 31 (1): 20-24.
- Prakash Chaturvedula, V. S., Sprague, S., Schilling, J. K. & Kingston, D. G. 2003. New cytotoxic indole alkaloids from *Tabernaemontana calcarea* from the Madagascar rainforest. *Journal of Natural Products*, 66 (4): 528-531.
- Pratchayasakul, W., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N. & Chattipakorn, S. C. 2010. Reversible acetylcholinesterase inhibitory effect of *Tabernaemontana divaricata* extract on synaptic transmission in rat CA1 hippocampus. *Indian Journal of Medical Research*, 131 (3): 411-417.
- Rätsch, C. 2007. *Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen*. 8a ed. AT Verlag, Aarau, Suiza.
- Roberts, M. F. & Wink, M. 1998. Chapter 1. Introduction. En: Roberts, M. F. & Wink, M. (Eds.). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press, New York, pp. 1-7.
- Sennblad, B. & Bremer, B. 2002. Classification of Apocynaceae s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. *Systematic Biology*, 51 (3): 389-409.
- Simoes, A. O., Endress, M. E. & Conti, E. Systematics and character evolution of *Tabernaemontana* (Apocynaceae, Rauvolfioideae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon*, 59 (3): 772-790.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M. R. 1990. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 82 (13): 1107-1112.
- Spinella, M. 2001. *The Psychopharmacology of Herbal Medicine: Plant Drugs That Alter Mind, Brain and Behavior*. MIT Press, USA.
- Suffness, M. & Pezzuto, J. M. 1990. Assays related to cancer drug discovery. En: Hostettmann, K.

(Ed.). *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, London, pp. 71-133.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.

Thambi, P. T., Kuzhivelil, B., Sabu, M. C. & Jolly, C. I. 2006. Antioxidant and antiinflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R.BR. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68 (3): 352-355.

Van Beek, T. A., Verpoorte, R., Svendsen, A. B., Leeuwenberg, A. J. & Bisset, N. G. 1984. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 10 (1): 1-156.

Veronese, E. L., Esmeraldino, L. E., Trombone, A. P., Santana, A. E., Bechara, G. H., Kettelhut, I., Cintra, A. C., Giglio, J. R. & Sampaio, S. V. 2005. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). *Phytomedicine*, 12 (1-2): 123-130.

Zhu, J. P., Guggisberg, A., Kalt-Hadamowsky, M. & Hesse, M. 1990. Chemotaxonomic study of the genus *Tabernaemontana* (Apocynaceae) based on their indole alkaloid content. *Plant Systematics and Evolution*, 172: 13-34.

Ziegler, J. & Facchini, P. J. 2008. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 735-769.

Medios electrónicos:

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Monografías de plantas medicinales*. Disponible en URL [Online]:

http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cojón_de_gato&id=7163

Acceso julio 24, 2011.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Monografías de plantas medicinales*. Disponible en URL [Online]:

http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Jasmín_de_perro&id=7860

Acceso julio 24, 2011.

Chemicalize.org. *Properties Viewer*. Disponible en URL [Online]:

<http://www.chemicalize.org/>

Acceso febrero 01, 2013.

Encyclopedia of Life (EOL). *Tabernaemontana*. Disponible en URL [Online]:

http://eol.org/data_objects/12618091

Acceso septiembre 23, 2011.

ANEXOS

A. Curvas de calibración de HPLC

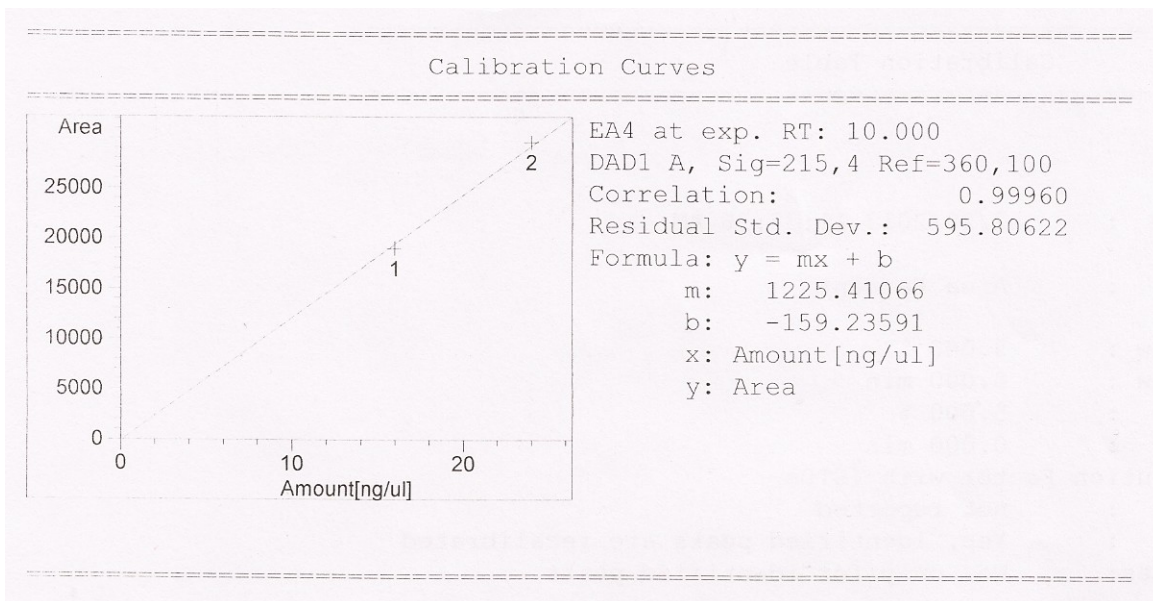


Figura A.1: Curva de calibración de la ibogamina.

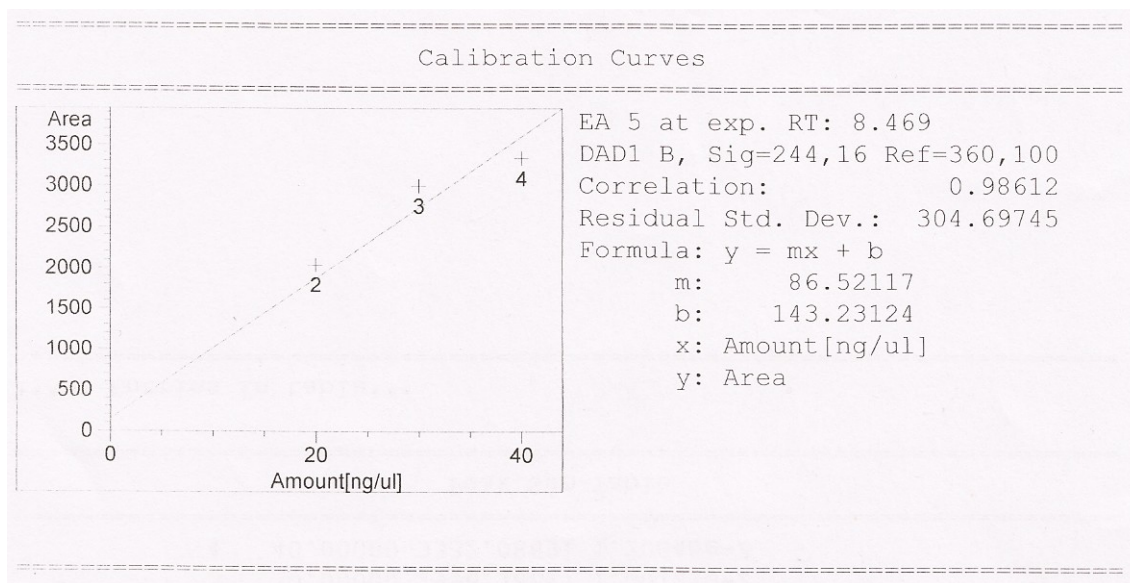


Figura A.2: Curva de calibración de la estemadina.

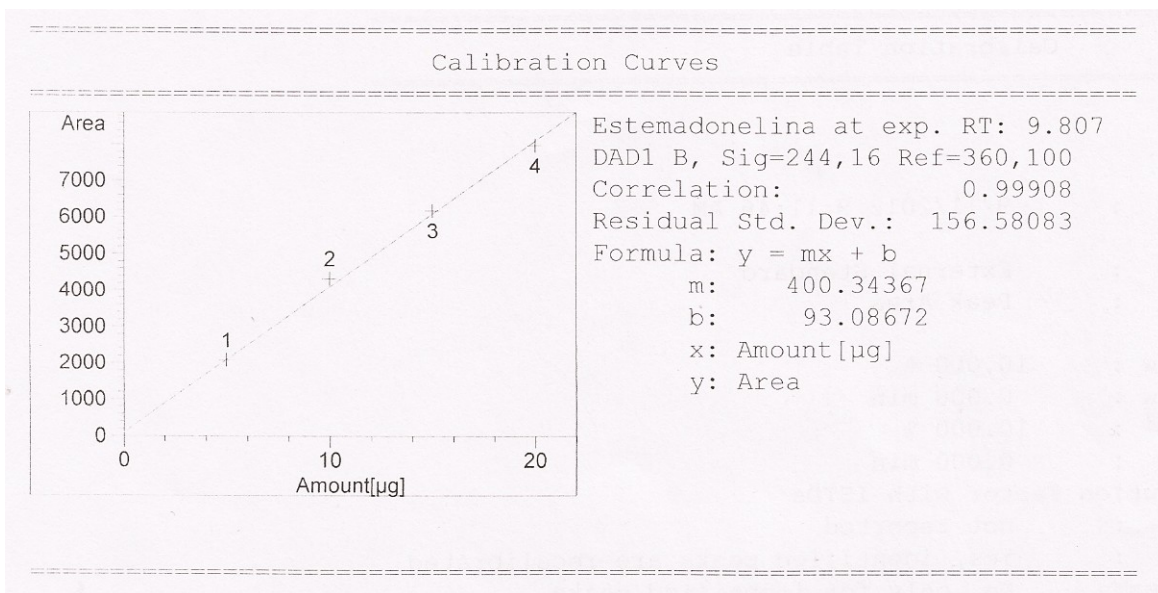


Figura A.3: Curva de calibración de la estemadonelina.

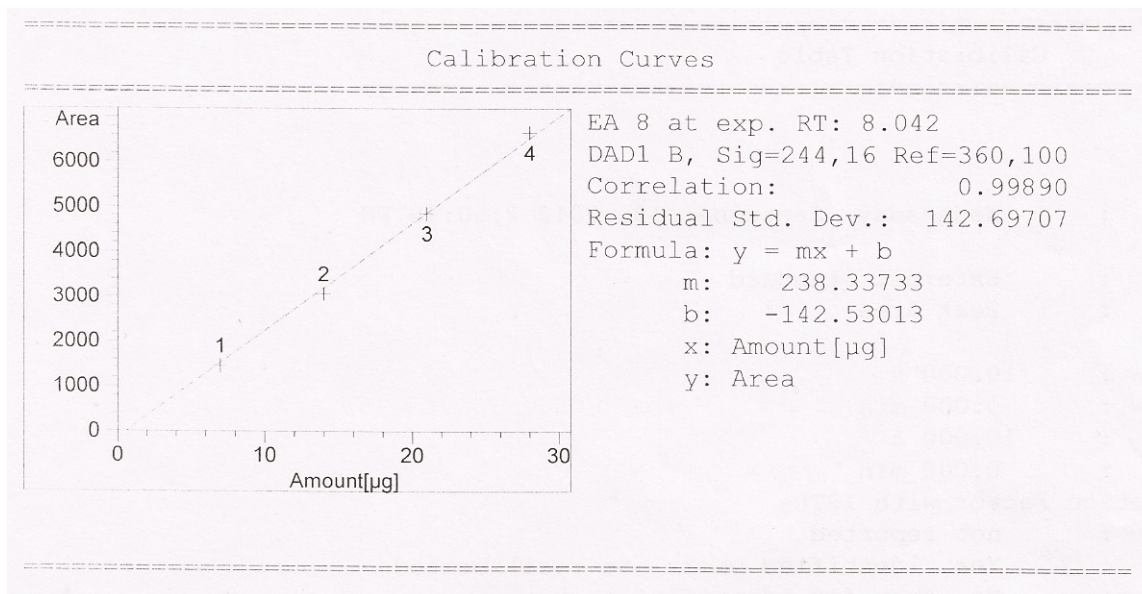


Figura A.4: Curva de calibración de la isovoacangina.

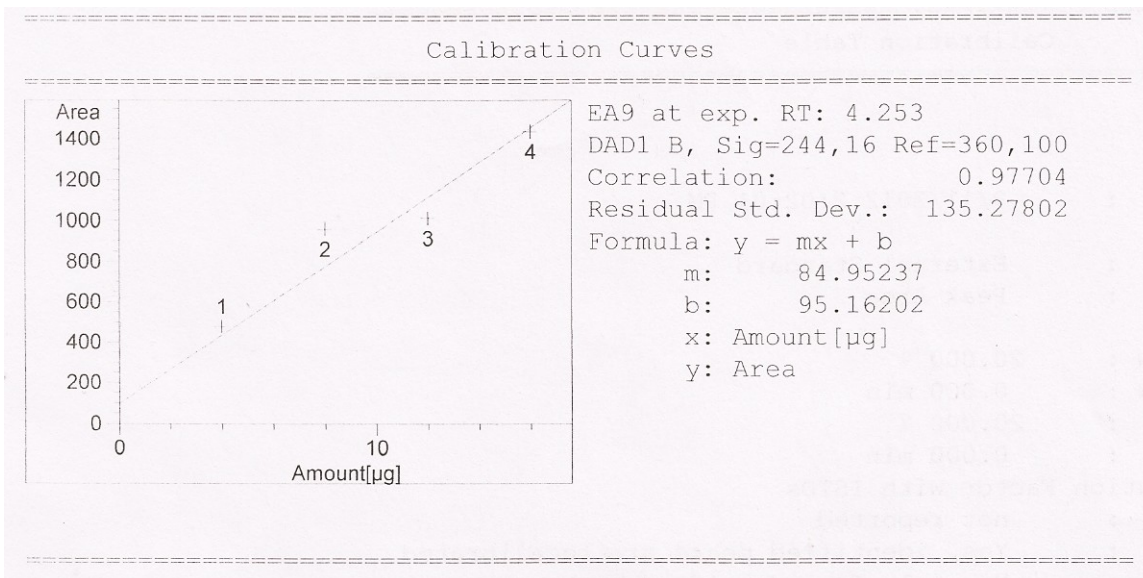


Figura A.5: Curva de calibración de la estemadenina.