



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones

Científicas

Cuba

Barrales Cureño, Hebert Jair; Reyes Reyes, César; Chávez Salinas, Salvador; Andrade Hoyos, Petra

PERFIL FARMACOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DEL
MEJORAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Rauwolfia serpentina*.
Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 46, núm. 3, septiembre-diciembre, 2015, pp. 235
-249

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181241373003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

RESEÑA ANALITICA

PERFIL FARMACOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DEL MEJORAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Rauwolfia serpentina*.

Hebert Jair Barrales Cureño*, **César Reyes Reyes***, **Salvador Chávez Salinas*** y **Petra Andrade Hoyos****

Universidad Politécnica del Valle de Toluca División de Ingeniería en Biotecnología. Carretera Toluca-Almoloya de Juárez Km. 5.6 Santiaguillo Tlalcilcali, Almoloya de Juárez, Estado de México. C.P. 50904. Teléfono: (722)2766060. *Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. Tepatepec, Hidalgo. C.P. 42660. Teléfono: 017387241174. barrales.herbert@colpos.mx

Recibido: 17 mayo de 2014.

Aceptado: 4 de mayo 2015.

Palabras clave: reserpina, alcaloides indólicos, producción *in vitro*, triptófano, antihipertensivo.

Key words: reserpine, indole alkaloids, *in vitro* production, tryptophan, antihypertensive.

RESUMEN. La *Rauwolfia serpentina* es una planta de la familia Apocynaceae de interés medicinal, distribuida en zonas húmedas y cálidas de Asia, África, América tropical y Australia. Las especies de *Rauwolfia* sirven como materia prima para la extracción de alcaloides libres; para la obtención de extractos con un contenido estandarizado de alcaloides y para la preparación de polvos medicinales de sus raíces. La serpentina se utiliza sobre todo, para el tratamiento de la hipertensión arterial y como sedante. El polvo de corteza y de raíz también se utilizan como: afrodisíaco, vomitivo, purgante, disentérico, sedante y otros. Los principios activos son alcaloides como la ajmalicina, sarpagina, yohimbina y otros de tipo indólico que se encuentran en una concentración del 1 al 2 %. El cultivo de *R. serpentina* a través de semillas presenta baja germinación y viabilidad. Por otro lado, la *Rauwolfia*, es una especie amenazada por la sobreexplotación. Por estos motivos hay una enorme necesidad de propagación *in vitro* de *Rauwolfia serpentina* para satisfacer para la producción de alcaloides y su demanda comercial así como la conservación de este valioso recurso natural en peligro de extinción. De ahí que sea necesaria la optimización en las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la propagación masiva de *R. serpentina*. El presente artículo pretende ofrecer una actualización acerca de a la actividad farmacológica y biotecnológica de los metabolitos secundarios de *Rauwolfia serpentina* y revisa la ruta biosintética de la reserpina.

ABSTRACT. *Rauwolfia serpentine* (Apocynaceae family) is a plant with important medicinal applications, distributed in moist and warm areas of Asia, Africa, tropical America and Australia. *Rauwolfia* species are used as raw material for extracting free alkaloids; in the preparation of standardized extracts containing alkaloids and to obtain powders from bark and roots. Reserpine is mostly used against hypertension and as sedatives. The bark and roots powder are also used as: aphrodisiac, emetic, purgative, dysentery and sedative and others uses. The active ingredients are alkaloids like ajmalicine, sarpagine, yohimbine and others of indole type found at a concentration of 1 to 2 %. The cultivation of *R. serpentina* exhibits low seed germination and viability. Furthermore *Rauwolfia* are species threatened by overexploitation. Due to these reasons, there is a huge need for *in vitro* propagation of *Rauwolfia serpentina* to support the production of alkaloids and commercial demand and for and conservation of this valuable natural resource endangered.

Hence it is necessary the optimization of the *in vitro* plant tissue culture techniques for mass propagation of *R. serpentina* are necessary. The present article aims to updated information regarding drug and biotechnology and pharmacological of secondary metabolites of *Rauwolfia serpentina* and to review the biosynthetic pathway of reserpine.

INTRODUCCIÓN

La *Rauwolfia serpentina*, es una importante planta medicinal que pertenece a la familia Apocynaceae. La planta es originaria de la India y Bangladesh. Se localiza también en Pakistán, Burma, Tailandia, Java y en áreas silvestres del continente asiático. Existen otras especies como la *Rauwolfia cambodiana*, de Cambodia, que crece en suelos arcillosos y húmedos con una temperatura superior a los 5°C; la *Rauwolfia vomitoria* de Guinea y Mozambique; la *Rauwolfia tetraphylla* L. de la Antillas y las *Rauwolfias viridis* y *nitida*, que son especies cubanas.

En la India se han utilizado preparados de raíces de *Rauwolfia* desde hace siglos, con distintos propósitos, (aliviar desequilibrios del sistema nervioso central, vermífugo, trastornos intestinales y también para estimular las contracciones uterinas). El extracto de la raíz es útil también en desórdenes del tracto gastrointestinal, (diarrea, disentería, cólera y cólicos). Sus usos más interesantes son en el tratamiento de la hipertensión arterial y el cáncer de mama (Lohani *et al.*, 2011).¹ La acción antihipertensiva de la *Rauwolfia* se debe a la reserpina (Wright, 2009),² que es un alcaloide indólico, obtenido de la *Rauwolfia*, cuyo uso más importante ha sido el de reducir la presión arterial sanguínea, que tiene además una acción tranquilizante (Kokate *et al.*, 2003).³ Se ha reportado que la *Rauwolfia* contiene más de 50 alcaloides indólicos que se localizan principalmente en la corteza y la raíz (Rathi *et al.*, 2013)⁴ (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad de algunos componentes indólicos de la reserpina.

Componentes indólicos	Actividad
Reserpina	Hipotensor
Yohimbina	Afrodisíaco
Diserpidina	Simpaticolítico, α -bloqueador
Ajmalicina	Citotóxico
Rescinamina	Sedante del SNC

La reserpina es el constituyente más importante de la planta, y es la causa de que la *R. serpentina* esté en peligro de extinción en la India y en muchas partes del mundo debido a la sobreexplotación de este recurso natural para propósitos comerciales y los excesivos requerimientos de la industria farmacéutica (Sehrawat *et al.*, 2002).⁵

Los principales compradores de los productos derivados de *Rauwolfia* a principios de los años setenta eran la República Federal de Alemania, Italia, Suiza y Estados Unidos. Los precios de entonces eran de 3,75 a 4,00 dólares EE.UU. por 500 g del polvo de raíz de *R. serpentina* y de 0,30 a 0,40 dólares por gramo del alcaloide reserpina (Goor y Barney, 1976).⁶ La reserpina se extrae de la raíz, se utilizó como terapia de primera línea en el tratamiento de la hipertensión arterial, hoy en día, se usa como agente de segunda línea, por ser un neuroléptico en dosis diez veces mayores que las necesarias para lograr el efecto hipotensor con mecanismo de acción central, además actúa sobre el sistema límbico cerebral y sobre el centro vasomotor del hipotálamo (Berlant, 1986).⁷

El cultivo de *R. serpentina* a través de semillas presenta problemas de baja viabilidad y escasa germinación atribuidos en gran parte a la presencia del ácido cinámico y derivados de la semilla. La propagación vegetativa convencional se realiza por medio del corte de la raíz (Sahu, 1979).⁸ Los bajos porcentajes de germinación se deben a diferencias estructurales y razones fisiológicas.

Se ha observado de un 15 a 20 % de germinación, pero sólo del 10 al 13% de semillas germinan hasta su desarrollo, por lo que se requiere del uso de cultivos *in Vitro* para obtener una mayor producción de alcaloides (Chikte *et al.*, 2013).⁹ Además la *Rauwolfia*, es una especie amenazada debido a que su cultivo es limitado y sometido a sobreexplotación por diversas agencias gubernamentales e industrias farmacéuticas. Debido a esto, hay una enorme necesidad de propagación *in Vitro* de *Rauwolfia serpentina* para satisfacer la creciente demanda comercial de la planta para la producción de alcaloides y la conservación de este valioso recurso natural. De ahí que la optimización en las técnicas de cultivo *in Vitro* de tejidos vegetales para la propagación masiva de *R. serpentina* sean altamente deseables. Por lo tanto, el presente artículo pretende ofrecer una visión actualizada de la actividad farmacológica y biotecnológica de los metabolitos secundarios de *Rauwolfia serpentina* y revisar la ruta de biosíntesis de la reserpina así como los usos médicos de los alcaloides constituyentes de *R. serpentina*.

Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial (HTA) es una de las enfermedades crónicas no transmisibles que afecta más frecuentemente a la población adulta en el mundo. Esta afección se presenta en un 20 a 30% de personas mayores de 15 años (Pérez, 2008).¹⁰ La HTA es una afección del sistema cardiovascular, y un factor de riesgo para el desarrollo de algunas de las principales causas de mortalidad, en la mayoría de los países desarrollados y en muchos en vías de desarrollo, como son la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardiaca, accidentes cerebrovasculares, enfermedades vasculares y renales crónicas, en particular el aneurisma de la aorta y la insuficiencia arterial periférica (Pérez, 2008).¹⁰ La HTA es una enfermedad crónica fácilmente diagnosticable, pues, aunque es frecuentemente asintomática, la toma periódica y sistemática de la presión arterial permite su detección precoz y la toma oportuna de medidas (Pérez, 2008).¹⁰ Por lo tanto, se puede catalogar a la HTA como una enfermedad y un factor de riesgo, que constituye un importante problema de salud por su alta prevalencia en la población adulta, su acción deletérea sobre aparatos y sistemas de vital importancia, y su cronicidad, que requiere control y asistencia médica sistemática. En sentido general, la HTA establecida no es curable, pero si controlable mediante una gama de recursos farmacológicos que junto a los cambios en el estilo de vida conforman un paquete terapéutico capaz de prevenir severas afecciones secundarias (Pérez, 2008).¹⁰ Los medicamentos de origen vegetal proporcionan una destacada contribución a la terapéutica moderna, por ejemplo, la reserpina aislada de *R. serpentina* es un hecho revolucionario para el tratamiento de la hipertensión con el objetivo de disminuir la presión arterial (Deshmukh *et al.*, 2011).¹¹

Perfil farmacológico de *Rauwolfia serpentina*

En 1931, Siddiqui y Siddiqui aislaron la ajmalina (rauwolfina), ajmalinina, ajmalicina, serpentina y serpentinina. Los alcaloides terapéuticamente importantes son la reserpina (aislada en 1952) y la rescinamina (aislada en 1954). Estos son ésteres derivados del metil reserpato y ácido trimetoxibenzoico en el caso de la reserpina y ácido trimetoxicinámico en el caso de la rescinamina. Nuevos alcaloides continúan siendo aislados; recientemente, cinco bases hidronio (por ejemplo, 3,4,5,6-tetradihidroyohimbina) por primera vez (Wachsmuth y Matusch, 2002),¹² y cinco nuevos alcaloides indólicos junto con un nuevo iridoide glicosídico, 7-epiloganina, un nuevo azúcar derivado y 20 nuevos compuestos (Itoh *et al.*, 2005).¹³ La reserpina se usa en el tratamiento de la hipertensión arterial. En dosis diez veces superiores a las utilizadas como hipotensor puede actuar centralmente como neuroléptico, sobre el sistema límbico y sobre el centro vasomotor del hipotálamo.

Los estudios farmacológicos demuestran que la *Rauwolfia*, además de antihipertensivo posee actividad cardiovascular como antiarrítmico (Kirillova *et al.*, 2001),¹⁴ y además tiene acciones

antiinflamatoria (Rao *et al.*, 2012),¹⁵ antipirética, antidiabética (Campbell *et al.*, 2006),¹⁶ anticáncerosa (Bemis *et al.*, 2006),¹⁷ hipoglucemiante e hipolipemiantes (Qureshi *et al.*, 2009),¹⁸ hepatoprotectora (Gupta *et al.*, 2006),¹⁹ sedativa, antihistamínica, larvicida, antibacteriana y antidiarreica (Ahmed *et al.*, 2002; Ezeigbo *et al.*, 2012).^{20,21} Las propiedades antihipertensivas de las raíces de *Rauwolfia* se atribuyen a la reserpina (ácido benzoico éster 3,4,5-trimetil de ácido reserpico, un derivado indólico del tipo 18-hidroxiyohimbina). La reserpina es el más prominente de todos los alcaloides y se utiliza principalmente en desordenes neuropsiquiátricos y como tranquilizante natural y tiene mayor actividad hipotensora que el extracto crudo vegetal (Pullaiah, 2002; Banerjee y Modi, 2010).^{22,23}

Las acciones antihipertensivas de la reserpina se deben a su acción depresora sobre el sistema nervioso central (SNC) y sobre el sistema nervioso periférico mediante la unión a las vesículas de almacenamiento de catecolaminas presentes en la célula nerviosa. En el paciente esquizofrénico reduce la agitación y mejoran la ideación pero su eficacia es claramente inferior a la de las butirofenonas y las fenotiazinas. Interfiere con la función del sistema nervioso autónomo por el agotamiento de los neurotransmisores adrenérgicos y posiblemente mediante la activación del Sistema Nervioso Central parasimpático (Nammi *et al.*, 2005).²⁴

Estas sustancias están implicadas principalmente en el control de la frecuencia cardíaca, la contracción del miocardio y de la resistencia periférica. También ayuda en la sedación y la reducción de la presión sanguínea, especialmente en casos de hipertensión exacerbada por el estrés y la actividad del sistema nervioso simpático. La reserpina causa la liberación de 5-hidroxitriptamina (5-HT) de todos los tejidos en los que se almacena normalmente y resulta en un aumento de metabolitos urinarios (Prusoff, 1961).²⁵ Recientemente se ha demostrado que, los extractos de *Rauwolfia* tienen una alta afinidad por los receptores D2 de dopamina y $\alpha 2$ central.

Otros alcaloides del género *Rauwolfia* como la yohimbina y sus diastereoisómeros rawolscina y corinantina actúan como antagonistas competitivos sobre los $\alpha 2$ -adrenoreceptores. Las aplicaciones potenciales de la yohimbina se extienden al tratamiento de ciertas formas de disfunción sexual masculina, a la neuropatía diabética y a la hipotensión postural. Además, la reserpina se ha utilizado en el tratamiento del síndrome de Raynaud, un trastorno poco frecuente de los vasos sanguíneos que afectan los dedos de las manos y los pies (Hareesh *et al.*, 2010; Richa *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2002; Arcas *et al.*, 1972; González y Saffie, 1976; Ortiz-Nieva *et al.*, 2004).²⁶⁻³¹

Perfil biotecnológico de *Rauwolfia serpentina*

Las raíces de *Rauwolfia serpentina* contienen de 0,7-3,0 % de alcaloides totales en peso seco y la cantidad varía a través del tiempo así como la fuente de colección (Fig. 1). La concentración de reserpina en diferentes especies de *Rauwolfia* colectadas de diferentes fuentes geográficas varía de 0,0382 a 0,1442 % (Howes y Louis, 1990).²⁵ La micropropagación es específicamente utilizada para las especies en las cuales la propagación de clones es necesaria. La propagación clonal a través de métodos convencionales como cortes o injertos no ha sido exitosa en *R. serpentina*, por lo que, el cultivo *in Vitro* de tejidos vegetales es útil para la obtención de una mayor producción de alcaloides y biomasa a partir de *R. serpentina*.

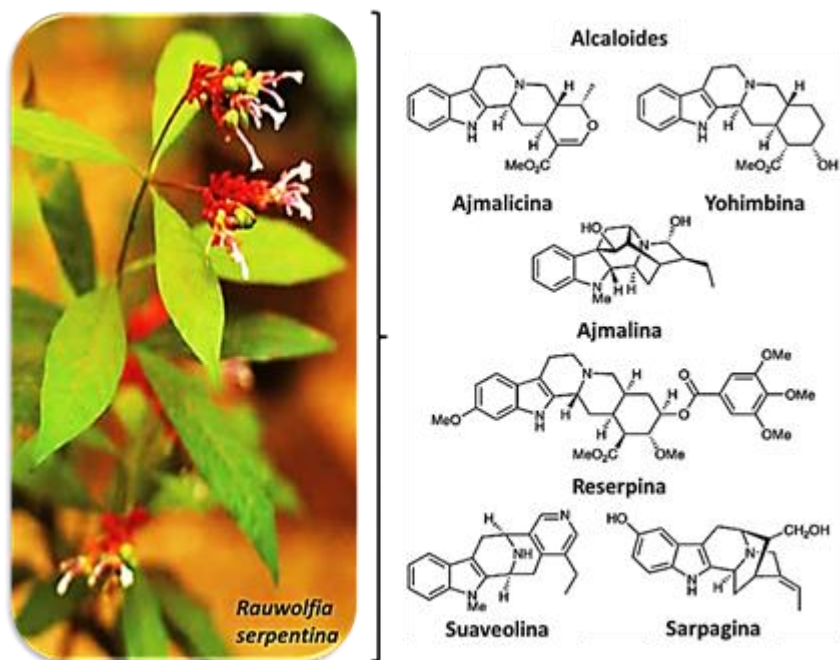


Fig. 1. Estructura química de los alcaloides indólicos de *Rauwolfia serpentina*.

Richa *et al.*, (2008),²⁶ establecieron la micropropagación y subcultivo de *R. serpentina*. Los explantes utilizados han sido a partir de brotes y hojas, los cuales se cultivan en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con tres fitohormonas en dos combinaciones: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), + 2-bencil amino purina (BAP) y ácido indol-3-butírico (IBA) + bencil amino purina (BAP) para inducir callos y regeneración directa. Los mejores resultados se produjeron con IBA (0,125 mg L⁻¹) + BAP (1,0 mg L⁻¹). Anitha y Kumari, (2006)¹⁴ indujeron callos a partir de explantes de hojas de *Rauwolfia tetraphylla* en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con una combinación de 9 µM de 2,4-D y 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹ de triptófano (Anitha y Kumari, 2006).¹⁴

El mejor tratamiento de porcentaje de inducción de callos fue de 90% y el mejor porcentaje de crecimiento de callos fue de 90 %, observado con 9 µmol/L de 2,4-D y 25 mg L⁻¹ de triptófano, pero, a dosis más altas de triptófano se disminuye el porcentaje de inducción y crecimiento (Anitha y Kumari, 2006).¹⁴ Respecto al contenido de reserpina se observó un incremento con el tratamiento de 50 mg L⁻¹ de triptófano que con las otras concentraciones utilizadas.

El contenido de reserpina con 50 mg L⁻¹ de triptófano así como el contenido de alcaloides en el extracto crudo fue de 2,1 mg g⁻¹ p.s. y 7,1 mg¹p.s., respectivamente (Anitha y Kumari, 2006).¹⁴

Jain *et al.*, (2003), realizaron la micropropagación clonal de *R. serpentina* con el objetivo de obtener múltiples brotes. Se utilizaron explantes de puntas de brotes y segmentos nodales cultivados en medio MS con varias concentraciones de bencil adenina purina (BAP) en combinación con ácido indol butírico (IBA) para producir múltiples brotes. La mayor cantidad de brotes (85,6%) se obtuvo en el medio MS suplementado con 5,0 mg L⁻¹ de BAP y 0,5 mg L⁻¹ de IBA a lo largo del cultivo con 2,5 % de sacarosa y 0,85 % de agar (Jain *et al.*, 2003).¹⁵

Otros investigadores han utilizado puntas de brotes y hojas de plantas jóvenes en floración de *R. serpentina* cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 4 mg L⁻¹ de bencil amino purina (BAP) y 0,4 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (NAA), siendo el medio más efectivo

para generar la proliferación de brotes. El enraizamiento se obtuvo después de la transferencia de los brotes regenerados en medios MS al contener diferentes concentraciones de IAA (0,5 y 1,0 mg L⁻¹) y también se obtuvo la máxima diferenciación de raíces. Por lo tanto, los cultivos *in vitro* de células en suspensión de *R. serpentina* se perfilan como una herramienta importante en la elucidación de la biogénesis de los alcaloides indol monoterpénicos y debido a esta conexión significativa, se ha considerado el aislamiento de la estrictosidina sintasa.

Mediante el uso de cultivos celulares, Stockigt en 1988, fue capaz de elucidar una ruta biosintética de diez pasos de la estrictosidina al alcaloide reserpina (Benjamin *et al.*, 1994).¹⁶ El alcaloide principal en cultivos de células en suspensión de *R. serpentina* es raucafricina produciéndose en cantidades de 1 a 6 g L⁻¹ en el medio nutritivo, representando el 2,3 % de biomasa seca de células, un valor 67 veces superior a los encontrados en las raíces. El cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *R. serpentina*, producidas por transformación con *Agrobacterium rhizogenes*, sintetizó ajmalina (0,045% peso seco) y serpentina (0,007% peso seco) (Benjamin *et al.*, 1994).¹⁶

Por otra parte, en las técnicas de cultivo *in vitro*, se ha utilizado para mejorar la acumulación de metabolitos secundarios, la elicitación. La técnica de elicitación es un proceso efectuado por un elicitor adicionado al medio de cultivo *in vitro* para inducir o mejorar la producción de los metabolitos secundarios. Los elicitores pueden ser de tipo biótico como abiótico (Nurcahyani y Anggarwulan, 2008).¹⁷

Se han estudiado los efectos de la adición de Cu²⁺ en la producción de reserpina y crecimiento de callos a partir de cultivo *in vitro* de raíces de *R. serpentina*. La adición del elicitor Cu²⁺ en la forma de CuCl₂ influye en el transporte de iones a la célula cambiando el pH del citoplasma y también sus efectos sobre la síntesis y actividad de las enzimas con rol en la producción de reserpina y crecimiento de callos (Nurcahyani y Anggarwulan, 2008).¹⁷ El experimento consistió como primer paso en inducir la iniciación de callos para promover su crecimiento.

El segundo paso fue elegir los tratamientos para inducir la producción de reserpina. Los callos se dividieron en 5 grupos: 0, 5, 10, 20, 40 y 80 μM. Las variables que se analizaron fueron: morfología, peso fresco, peso seco, tasa de crecimiento y contenido de reserpina en los cultivos *in vitro* de callos, determinado después del día 15 de los tratamientos. Los resultados mostraron que la producción de reserpina se incrementó con la adición de 5 y 10 μMol/L de Cu²⁺ en los cultivos de callos de *R. serpentina* y se redujo con la adición de Cu²⁺ en mayores concentraciones a 10 μM.

El crecimiento de los callos disminuyó significativamente con el incremento de la concentración de Cu²⁺. Por otra parte, la adición de altos niveles de ajmalina al medio de cultivo celular promueve la formación de un nuevo grupo de alcaloides, los raumaclinos, que no se encuentran en las raíces (Endress *et al.*, 1993).²⁹ En la Fig. 2 se muestra un diagrama respecto a la biotecnología de *Rauwolfia serpentina* para la obtención de biomasa y la producción de alcaloides.

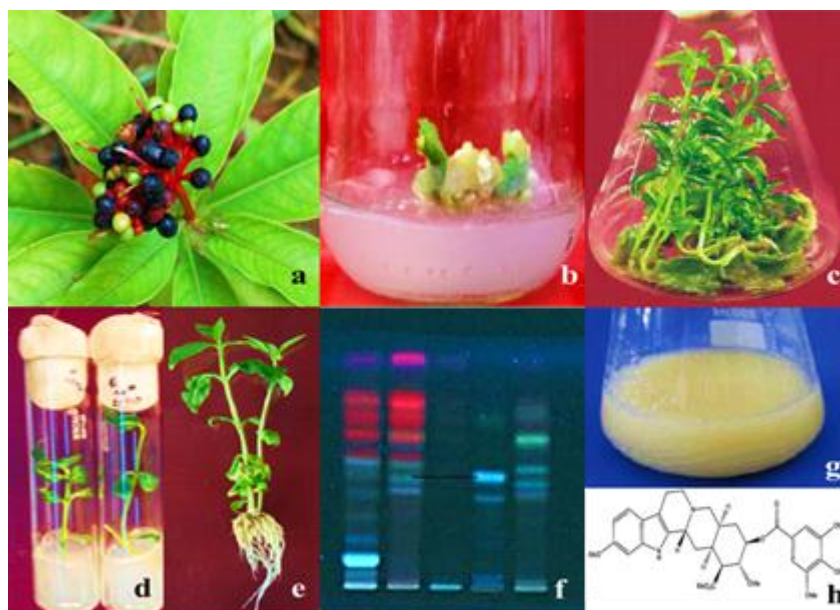


Fig.2. Perfil biotecnológico de la planta medicinal *Rauwolfia serpentina*. a) Planta de *R. serpentina* con fruto; b) Cultivo in vitro de callos de *R. serpentina* (Pandey et al., 2010);¹⁹ c) Cultivo in vitro de plántulas en medio líquido (Goel et al., 2009);²⁰ d) Enraizamiento de plántulas de *R. serpentina* en cultivo in vitro (Goel et al., 2009);²⁰ e) Plántula enraizada para aclimatación (Goel et al., 2009);²⁰ f) Placa de cromatografía en capa fina (TLC) para la identificación de alcaloides de *R. serpentina* (Kumar et al., 2011);²¹ g) Cultivo in vitro de células en suspensión de *R. serpentina* y h) Esqueleto químico de reserpina, principal constituyente de *R. serpentina*.

Presencia de compuestos fitoquímicos en *R. serpentina*

Los compuestos fitoquímicos que contiene *R. serpentina* son fitoesteroles, ácidos grasos, alcoholes insaturados y azúcares. También se ha cuantificado la composición fitoquímica de *R. serpentina* (Harisaranraj et al., 2009)²². En el Cuadro 2 se indica los contenidos de diversos compuestos fitoquímicos en la *Rauwolfia serpentina*.

Por lo tanto, los constituyentes fitoquímicos superiores en *R. serpentina* son: compuestos fenólicos, calcio, zinc y ácido ascórbico (Harisaranraj et al., 2009).²²

Existen tres tipos de alcaloides presentes en *R. serpentina*. 1. Alcaloides indólicos débilmente básicos: reserpina, rescinamina, dispiridina, que son alcaloides indólicos terciarios; 2. Alcaloides indólicos de basicidad intermedia: reserpilina, ajmalina, iso-ajmalina, rauwolfina, son alcaloides indólicos terciarios; 3. Bases fuertes hidronio: serpentina, serpentinina y alstonina son alcaloides básicos hidronio (Gawade y Fegade, 2012).²³ Mientras que la ajmalinina, ajmalicina, chandrina, renoxidina, reserpina, sarpagina, tetrafilicina, yohimbina y 3-epi-ayohimbina son otros alcaloides presentes (Gawade y Fegade, 2012).²³

Perfiles bioquímicos y usos médicos de los metabolitos secundarios de *Rauwolfia serpentina*

Características químicas de la reserpina. La reserpina es un alcaloide cristalino, obtenido de las raíces, tallos y hojas de *R. serpentina* y se aisló por primera vez por Muller Schiltter y Bein en 1952 (Schlittler et al., 1954).²⁴ La fórmula química es $C_{33}H_{40}O_9N_2$. Se trata de una base terciaria relativamente débil, se encuentra en la fracción oleoresínica de las raíces. Contiene no menos de 0,15% de reserpina-rescinamina. Diciembre es el mejor mes para colectar esta planta y obtener un mayor contenido de alcaloides (Howes y Louis, 1990).²⁵

Tabla 2. Contenido de compuestos fitoquímicos en la *Rauwolfia serpentina*.

Compuesto fitoquímico	Contenido
Taninos	0,51 ± 0,20 mg/100 g de peso seco (g.p.s.).
Alcaloides	1,48 ± 0,02 mg g ⁻¹ p.s.
Flavonoides	1,72 ± 0,11 mg g ⁻¹ p.s.
Fenoles	1,86 ± 0,11 mg/100 g.p.s.
Minerales (macroelementos)	
Sodio	0,02 ± 0,10 mg g ⁻¹ p.s.
Potasio	0,04 mg g ⁻¹ p.s.
Magnesio	0,10 ± 0,20 mg g ⁻¹ p.s.
Fósforo	0,18 ± 0,22 mg g ⁻¹ p.s.
Calcio	0,32 ± 0,10 mg g ⁻¹ p.s.
Minerales (microelementos)	
Hierro	1,85 ± 0,20 mg g ⁻¹ p.s.
Zinc	5,38±0,11 mg g ⁻¹ p.s.
Vitaminas	
Niacina	0,02 ± 0,10 mg g ⁻¹ p.s.
Tiamina	0,18 ± 0,02 mg g ⁻¹ p.s.
Riboflavina	0,42 ± 0,10 mg g ⁻¹ p.s.
Ácido ascórbico.	44,03 ± 0,20 mg g ⁻¹ p.s.

Biosíntesis de reserpina

La enzima estrictosidina sintasa (STR1) está involucrada en la biosíntesis de muchos de los alcaloides indólicos (Xueyan *et al.*, 2006).³⁴ La biosíntesis de la reserpina se muestra en la Fig.3.

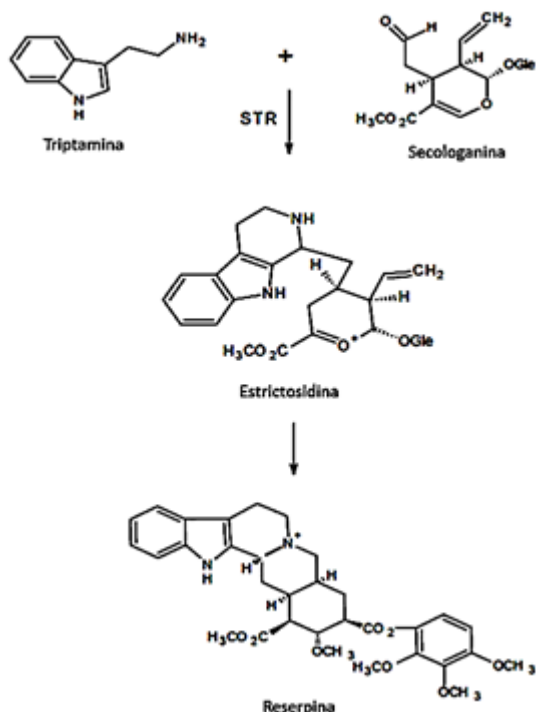


Fig.3. Biosíntesis del alcaloide reserpina (P.M.: 608.6787, C₃₃H₄₀N₂O₉).

La triptamina y el monoterpenoide secologanina producen glucoalcaloides estrictosidínicos en el primer paso de la biosíntesis. Las enzimas de la estrictosidina ayudan a la biosíntesis de la reserpina. La reserpina es un alcaloide indólico, químicamente es un metil éster yohimbina-16-

ácido carboxílico o 3,4,5-trimetoxibenzoil metil reserpata (Adegoke *et al.*, 2007).²⁷ Existen métodos para determinar reserpina en preparaciones farmacéuticas ya sea a granel, en formas de dosificación o en fluidos biológicos tales como: espectroscopia UV, HPLC, HPTLC (Adegoke *et al.*, 2007),²⁷ cromatografía de gases, voltimetría, polarografía (Dhruv *et al.*, 2004),³⁶ fosfometría a temperatura ambiente y espectrofluorometría (Dhruv *et al.*, 2004).²⁸ Muchos de estos métodos no pueden ser usados para la determinación de reserpina en extractos debido a la interferencia de otros constituyentes de la planta. Lohani *et al.*, (2011)¹, cuantificaron el contenido de reserpina por el método de HPTLC, método altamente preciso, sensible, específico y reproducible con un promedio de recuperación del 78% y el límite de cuantificación que obtuvieron fue de 112 ng.

Usos médicos de la ajmalina

El compuesto se aisló por primera vez por Salimuzzaman Siddiqui en 1931 de las raíces de *R. serpentina*. Su fórmula química es $C_{20}H_{26}O_2N_2$. Se nombró ajmalina, debido a Hakim Ajmal Khan, uno de los más ilustres practicantes de la medicina Unani en el sureste de Asia (Siddiqui *et al.*, 1985; COMSATS. 2013).^{37,38} La medicina Unani es de origen greco-árabe que se practica en la India y se basa en biotipos. La ajmalina se utiliza en medicina humana como un agente antiarrítmico clase I, altamente útil en el diagnóstico del síndrome de Brugada que causa la muerte súbita en jóvenes (10% de todas las muertes súbitas y de alrededor del 50% de todas las muertes en gente joven sin lesión cardíaca aparente), este síndrome es un desorden cardíaco de origen genético, por lesión del cromosoma 3, lo cual redundaría en alteración de las corrientes de sodio y, por otro lado, se conoce la lesión regional de canales iónicos del epicardio del ventrículo derecho (Weiss *et al.*, 2002; Civetta *et al.*, 2002; Rolf *et al.*, 2003).³¹⁻³³ Existen cuatro agentes antiarrítmicos clasificados primariamente en cuatro grupos principales sobre la base de su mecanismo de acción, por ejemplo, bloqueadores de canales de sodio, bloqueadores beta-adrenérgicos, prolongadores de la repolarización y bloqueadores de los canales de calcio. La ajmalina es un bloqueador del canal de sodio que muestra la acción inmediata cuando se administra por vía intravenosa, lo que lo hace ideal para fines de diagnóstico.³³ La administración del alcaloide a pacientes con este tipo de arritmia se conoce como "Prueba de Ajmalina" (Brugada *et al.*, 2000).³⁴ La acción de ajmalina en la presión arterial pulmonar y sistémica es similar a la de serpentina (Gawade *et al.*, 2012).³⁵

Usos médicos de la ajmalicina

La ajmalicina tiene un gran número de aplicaciones en el tratamiento de enfermedades circulatorias, especialmente en proveer un flujo sanguíneo cerebral adecuado. Actúa sobre la función del músculo liso, previniendo derrames cerebrales y ayuda en la reducción de la presión sanguínea (Srivastava *et al.*, 2006).³⁶ Su fórmula química es $C_{21}H_{24}O_3N_2$. Anualmente se aísla un estimado de 3,500 kg de ajmalicina de *Rauwolfia* por industrias farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades circulatorias. La ajmalicina se produce en la medida de 0,6% (biomasa seca celular) junto con más de treinta alcaloides monoterpénicos en cantidades traza incluyendo cinco glucoalcaloides. La ruta biosintética de la ajmalicina comienza con el geraniol a través de los compuestos: iridodial e irdotrial en la síntesis de loganina, que en la oxidación convierte loganina en secologanina. Esto ayuda a la triptamina a formar el núcleo de tipo corinanto que resulta en la formación de ajmalicina (O'Connor y Maresh, 2006).³⁷ A partir del triptófano, la ajmalicina se forma, este aminoácido se convierte a triptamina vía secologanina, estrictosidina y catenamina. La reducción de la catenamina a ajmalicina se ve facilitada por la enzima NADPH y triptófano descarboxilasa (TDC). La descarboxilasa puede ser evidentemente la enzima clave implicada en la síntesis de la ajmalicina en *Rauwolfia* (Fig. 4) (Liu *et al.*, 2012).³⁸

La triptamina y el monoterpeneoide secologanina producen glucoalcaloides estrictosidínicos en el primer paso de la biosíntesis. Las enzimas de la estrictosidina ayudan a la biosíntesis de la reserpina. La reserpina es un alcaloide indólico, químicamente es un metil éster yohimbina-16-ácido carboxílico o 3,4,5-trimetoxibenzoil metil reserpata (Adegoke *et al.*, 2007).²⁷ Existen métodos para determinar reserpina en preparaciones farmacéuticas ya sea a granel, en formas de dosificación o en fluidos biológicos tales como: espectroscopia UV, HPLC, HPTLC (Adegoke *et al.*, 2007),²⁷ cromatografía de gases, voltimetría, polarografía (Dhruv *et al.*, 2004),³⁶ fosfometría a temperatura ambiente y espectrofluorometría (Dhruv *et al.*, 2004).²⁸ Muchos de estos métodos no pueden ser usados para la determinación de reserpina en extractos debido a la interferencia de otros constituyentes de la planta. Lohani *et al.*, (2011)¹, cuantificaron el contenido de reserpina por el método de HPTLC, método altamente preciso, sensible, específico y reproducible con un promedio de recuperación del 78% y el límite de cuantificación que obtuvieron fue de 112 ng.

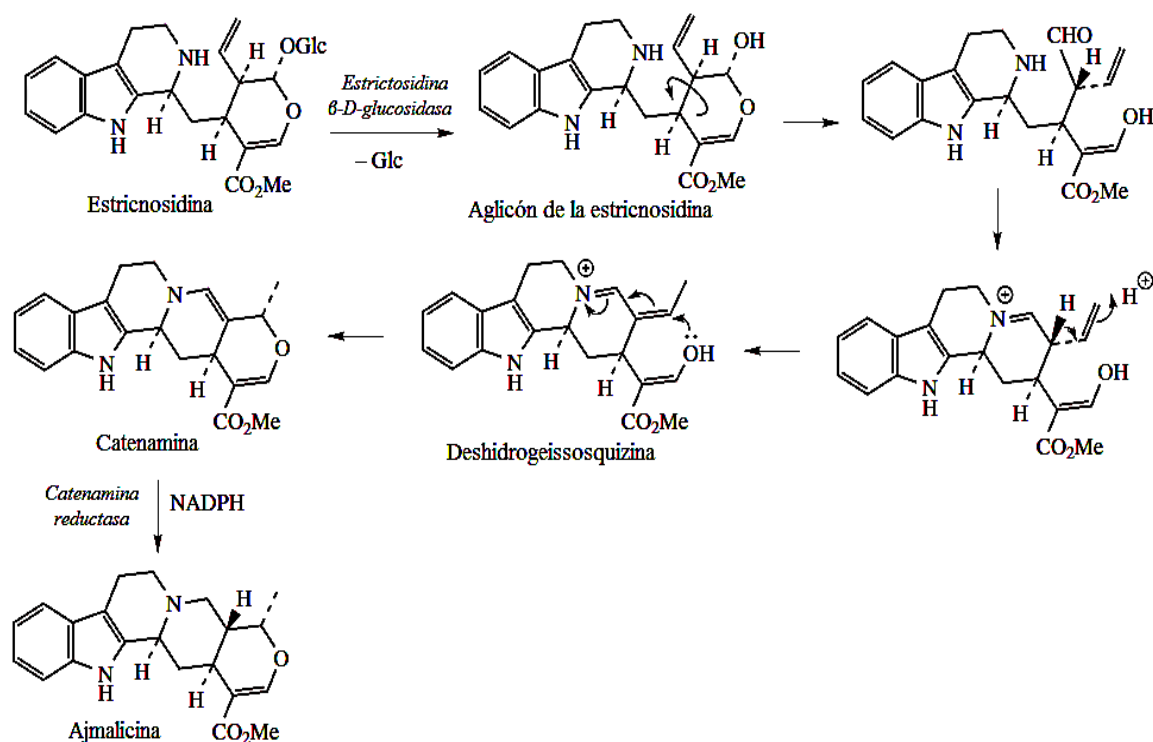


Fig.4. Biosíntesis de ajmalicina a partir de la estrictosidina.

Usos médicos de la serpentina

Su fórmula química es $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{N}_2$. La enzima peroxidasa (PER) es completamente responsable de la oxidación de ajmalicina a serpentina catalizando el alcaloide bisindol localizado en la vacuola. La serpentina es un potente inhibidor de la topoisomerasa de tipo II, exhibe excelentes propiedades antipsicóticas (Dassonneville *et al.*, 1999; Costa-Campos *et al.*, 2004).³⁹⁻⁴⁰

Usos médicos de la rescinamina

La rescinamina es un éster alcaloideo purificado de la fracción de alseroxilon de las especies de *Rauwolfia*; se relaciona química y farmacológicamente con la reserpina en usos similares. Su fórmula química es $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{O}_9\text{N}_2$. Se investigó desde 1950 y actualmente se utiliza en el tratamiento de la hipertensión como un agente antihipertensivo. Es clínicamente un alcaloide menos potente que la reserpina (Klohs *et al.*, 1954).⁴¹

Usos médicos de la deserpidina

La deserpidina es un éster alcaloideo aislado exclusivamente de *Rauwolfia*. Difiere de la reserpina por la ausencia de un grupo metoxi en C-11, el cual se sintetiza a partir de la reserpina. Su fórmula química es $C_{32}H_{38}O_8N_2$. Se utiliza principalmente como antipsicótico así también como por sus propiedades antihipertensivas. Es capaz de reducir la alta presión arterial al controlar los impulsos nerviosos a lo largo de varias vías nerviosas. La deserpidina también se une e inhibe la enzima convertidora de angiotensina y compite con la angiotensina I para la unión a la enzima convertidora de angiotensina. También bloquea la conversión de angiotensina I a angiotensina II (Varchi *et al.*, 2005).⁴²

Otro alcaloide farmacológicamente bien caracterizado ha sido la yohimbina, que se usa como un antagonista alfa-adrenérgico selectivo o bloqueador alfa en los vasos sanguíneos para el tratamiento de la disfunción sexual eréctil (Andersson, 2001).⁴³ La yohimbina se detectó en concentraciones de 6.11% en hojas de *R. serpentina*. La fórmula química es $C_{21}H_{26}O_3N_2$.

Cuantificación de alcaloides de *Rauwolfia reserpina* por HPLC y MS

Actualmente, diversos métodos analíticos como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Espectrometría de Masas (MS) se utilizan para la detección y cuantificación de fármacos utilizados en medicina humana, por ejemplo el fármaco anticancerígeno taxol (Barrales-Cureño *et al.*, 2011; Barrales-Cureño *et al.*, 2012; Barrales-Cureño *et al.*, 2013),⁴⁴⁻⁴⁶ los compuestos antileucémicos vinblastina y vincristina, entre otros. Los métodos de HPLC se han validado y aplicado eficazmente en la cuantificación de los alcaloides de *R. serpentina*. Una cantidad, por ejemplo, para la extracción puede ser utilizada desde 250 mg hasta 5 g de polvo de raíces, tallos, hojas y semillas de *R. serpentina*, éstos se colocan en metanol y se homogeneizan en un mortero. Se enjuaga el material y se coloca en un matraz balón y se adiciona 10 mL de metanol para disolver cada muestra y se centrifuga a 6,000 rpm. Los sobrenadantes se colectan y se filtran en papel filtro Whatman No. 4 para remover el solvente orgánico. Los contenidos se observan de color marrón oscuro. Los solventes de extracción que se utilizan para la cuantificación en HPLC son: tolueno: acetato de etilo: dietil amina, acetonitrilo (70:20:10) para una buena separación. El extracto se calcula por gramo de peso seco. Se ha reportado la determinación de reserpina y otros alcaloides indólicos de *R. serpentina* por HPLC y HPTLC. La mejor separación en HPLC se obtiene con 10% de acetonitrilo (CH_3CN) y 0,1% de ácido trifluoroacético (Olajire *et al.*, 2007).⁴⁷ (Fig .5).

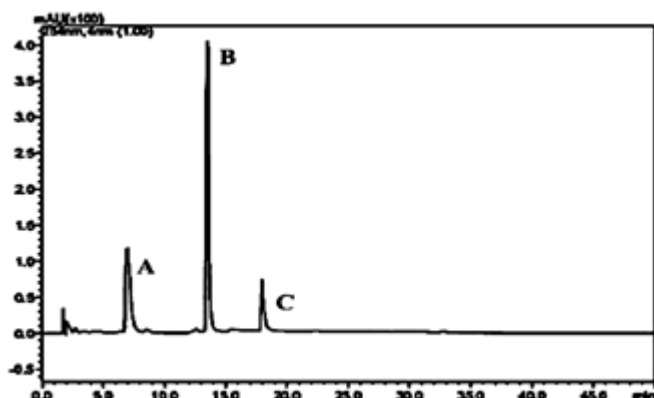


Fig. 5. Cromatograma de HPLC en fase reversa. Separación de una mezcla de compuestos de referencia estándar. A) ajmalina, B) ajmalicina y C) reserpina.

El procedimiento colorimétrico más utilizado comúnmente para la determinación de reserpina involucra la oxidación del compuesto a 3,4-didehidroreserpina con nitrito de sodio y medición de

la absorbancia del producto oxidado a 390 nm. La oxidación de la reserpina con nitrito en ácido acético seguida por la extracción con cloroformo también se ha realizado. La reserpina también se ha analizado colorimétricamente mediante reacción con vainillina, aminopirimidina, xantidrol (50 a 500 µg), fenilisocianato, yodo y glioxalato de sodio (Olajire *et al.*, 2007).⁴⁷

Para la identificación por espectrometría de masas (MS), el ion molecular $[M+1]^+$ para reserpina es 609 m/z con iones diagnóstico a 195 (BP), 397, 174 y 448 m/z. La rescinamina podría ser utilizada como un estándar interno (IS). El ion molecular $[M+H]^+$ para la rescinamina (IS) es 635 m/z y los iones diagnóstico son 221 (BP), 397 y 174. El espectro de masas de la reserpina y la rescinamina se indica en la (Fig. 6.)

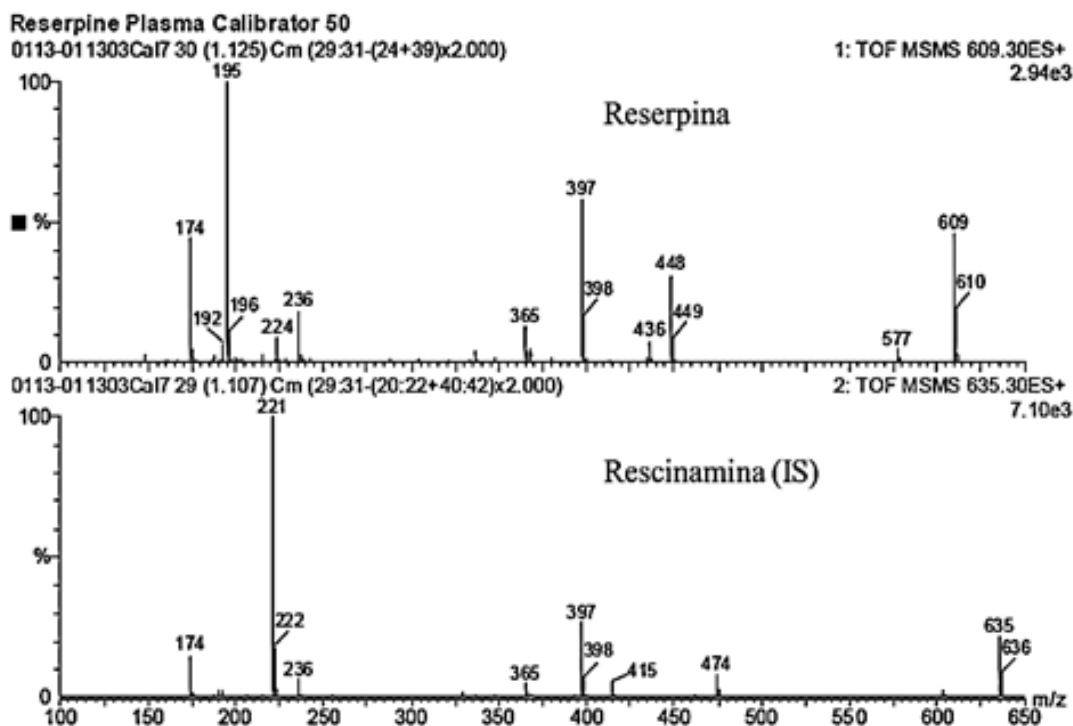


Fig. 6. Espectro de masas de reserpina y rescinamina.

Actividad antibacterial de *R. serpentina*

Negi *et al.*, (2014) aislaron en raíces de *R. serpentina* el compuesto bioactivo reserpina con el objetivo de evaluar la actividad antibacterial de los extractos metanólicos contra bacterias del tipo: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antibacterial de los extractos se evaluó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el diámetro de la zona de inhibición (ZOI) contra bacterias gram positivas y gram negativas usando el método de difusión de agar. La zona de mayor inhibición (13 mm) con MIC baja (625 µg) se observó contra *Staphylococcus aureus* y el mayor MIC (10 mg) se observó contra *Escherichia coli*, mientras que *Proteus vulgaris* fue resistente a extractos probados hasta 10 mg (Negi *et al.*, 2014).⁴⁸

CONCLUSIONES

Los alcaloides de *Rauwolfia serpentina* se usan principalmente en enfermedades vasculares. El antagonismo en estos receptores relaja los músculos lisos y disminuye la presión arterial. Contiene una proporción adecuada de reserpina que también exhibe una actividad contra las bacterias patogénicas humanas. Algunos ejemplos de fármacos recetados bajo prescripción son bloqueadores α -adrenérgicos como doxazosina (Cardura) y prazosina (Minipress). La reserpina,

por otro lado, actúa principalmente en el sistema nervioso central a nivel de monoaminas en la sinapsis neuronal. La reserpina reduce el tono del sistema nervioso simpático e incrementa los efectos sobre los neurotransmisores vía actividad parasimpática. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ayuda a propagar masivamente *R. serpentina* debido a su alta demanda en el mercado mundial y a proteger este valioso recurso natural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lohani H, Andola HC, Bhandari U, Chauhan N. HPTLC method validation of reserpine in Rauwolfia serpentina-A High Value medicinal. Plant Researcher 2011;3(3):34-37.
2. Wright JM, Musini VM. First-line drugs for hypertension. Cochrane Database of Systematic Reviews 2009;3:1-31.
3. Kokate CK, Purohit AP, Gokhale SB. Pharmacognosy. Twenty Fourth Edition, Nirali Prakashan, Pune: 2003;p.466-470.
4. Rathi P, Kumari R, Rajput ChS, Sawhney SS. Characteristics of Rauwolfia serpentina. International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences Therapeutic 2013;2(2):1038-1042.
5. Sehrawat AR, Uppal S, Chowdhury JB. Establishment of plantlets and evaluation of differentiated roots for alkaloids in Rauwolfia serpentina. J. Plant Biochem. Biotechnol 2002; (11):105-108.
6. Goor AY, Barney CW. 1976 Forest tree planting in arid zones, 2a edición, p. 354-355, 359. Nueva York, The Ronald Press Company.
7. Berlant JL. Neuroleptics and reserpine in refractory psychoses. J Clin. Psychopharmacol. 1986;6(3):180-184.
8. Sahu BN. Rauwolfia: Botany and Agronomy, Vol. 1. New Delhi, India: Today and Tomorrow's Printers and Publishers: 1979.
9. Chikte SS, Pranita D, Chikhale NJ, Burghate SK. In vitro evaluation and comparison of differentiated roots for alkaloids of Rauwolfia serpentine. Journal of Agricultural Science 2013;3(12):573-575.
10. Pérez CMD. Aportes al estudio de la hipertensión arterial en Cuba. [Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Médicas]. Ciudad de La Habana, Instituto superior de ciencias médicas de la Habana centro de estudio de posgrado. Hospital clínico quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", 2008.
11. Deshmukh TA, Chaudhari AB, Patil VR. Development and validation of HPTLC method for simultaneous determination of reserpine and arjunolic acid in tensowert tablet. Der Pharmacia Letter 2011;3(3):43-50.
12. Wachsmuth O, Matusch R. Anhydronium bases from Rauwolfia serpentina. Phytochemistry 2002;61:705-709.
13. Itoh A, Kumashiro T, Ymaguchi M, *et al.* Indole alkaloids and other constituents of Rauwolfia serpentina. Journal of Natural Products. 2005; 68:848-852.
14. Anitha S, Kumari BDR. Stimulation of reserpine biosynthesis in the callus of Rauwolfia tetraphylla L. by precursor feeding. Afr. J. Biotechnol 2006;5:659-661.
15. Jain V, Singh D, Swarnalata S, Saraf S. In vitro micropropagation of Rauwolfia serpentina through multiple shoot generation. Ancient Science of Life 2003;23(1):44-49.
16. Benjamin BD, Roja G, Heble MR. Alkaloid synthesis by root cultures of Rauwolfia serpentina transformed with Agrobacterium rhizogenes. Phytochemistry 1994;35:381-383.
17. Nurcahyani NS, Anggarwulan E. The reserpine production and callus growth of Indian snake root (Rauwolfia serpentina (L.) benth. Ex Kurz) culture by addition of Cu²⁺. Biodiversitas 2008;9:177-179.

18. Endress S, Takayama H, Suda S, Kitajima M. Alkaloids from *Rauwolfia serpentina* cell cultures treated with ajmaline. *Phytochemistry* 1993;32:725.
19. Pandey VP, Cherian E, Patani G. Effect of Growth Regulators and Culture Conditions on Direct Root Induction of *Rauwolfia serpentina* L. (Apocynaceae) Benth by Leaf Explants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2010;9(1):27-34.
20. Goel MK, Mehrotra S, Kukreja AK, Shanker K, Khanuja SPSS. In Vitro Propagation of *Rauwolfia serpentina* Using Liquid Medium, Assessment of Genetic Fidelity of Micropropagated Plants, and Simultaneous Quantitation of Reserpine, Ajmaline, and Ajmalicine. *Methods in Molecular Biology, Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*, Mohan Jain and Praveen K. Saxena (eds.): 2009.
21. Kumar A, Bhardwaj MK, Upadhyay AK, Tiwari A, Ohdar BD. Quantitative determination of Yohimbine alkaloid in the different part of the *Rauwolfia tetraphylla*. *J. Chem. Pharm. Res* 2011;3(2):907-910.
22. Harisaranraj R, Suresh K, Saravanababu S. Evaluation of the chemical composition *Rauwolfia serpentina* and *Ephedra vulgaris*. *Advances in Biological Research* 2009;3(5-6):174-178.
23. Gawade BV, Fegade SA. *Rauwolfia* (Reserpine) as a potential antihypertensive agent: a review. *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res* 2012;2(1):46-49.
24. Schlittler E, Saner H, Muller JM. Reserpinin, ein neues alkaloid aus *Rauwolfia serpentina*. *Experientia* 1954;10:109-133.
25. Howes LG, Louis WJ. *Rauwolfia* alkaloids (reserpine), pharmacology of antihypertensive therapeutics. *Handbook of Experimental Pharmacology* 1990;93(1):263-285.
26. Xueyan M, Santosh P, Juergen K, Elke L, Joachim S. The structure of *Rauwolfia serpentina* strictosidine synthase is a novel six-bladed β -propeller fold in plant proteins. *Plant Cell* 2006;18(4):907-920.
27. Adegoke OA, Idowu SO, Ajibola OA. Improved colorimetric determination of reserpine in 1. tablets using 4-Carboxyl-2,6-dinitrobenzene diazonium ion (CDNBD). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2007;6(2):695-703.
28. Dhruv KS, Bhavana S, Archana S. Spectrophotometric determination of *Rauwolfia* Alkaloids: Estimation of Reserpine in Pharmaceuticals. *Analytical Sciences* 2004;20:571-573.
29. Siddiqui S, Ahmad SS, Haider SI, Siddiqui BS. Isolation and structure of a new alkaloid from the roots of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Heterocycles* 1985;23(3):617-622.
30. COMSATS newsletter: Biographies of eminent scientists: Dr Salimuzzaman Siddiqui, COMSATS Secretariat, Islamabad–Pakistan 2013:5(3).
31. Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA, *et al.* Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation* 2002;105:707-713.
32. Civetta MM, Moro MS, Chiale AP, Elizari VM, Escobar RJ, Sicouri JS. El efecto preferencial de la ajmalina sobre el epicardio ventricular derecho canino puede explicar las manifestaciones electrocardiográficas del síndrome de Brugada. *Rev Argent Cardiol* 2002;70:118-125.
33. Rolf S, Bruns HJ, Wichter T, Kirchhof P, Ribbing M, Wasmer K, *et al.* The ajmaline challenge in Brugada syndrome: diagnostic impact, safety, and recommended protocol. *European Heart Journal* 2003; 24(12):1104-1112.
34. Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA, *et al.* Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000;101(5):510-515.

35. Gawade BV, Fegade SA. Rauwolfia (reserpine) as a potential antihypertensive agent-a review. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 2012;2(1):46-49.
36. Srivastava A, Tripathi AK, Pandey R, Verma RK, Gupta MM. Quantitative determination of reserpine, ajmaline and ajmalicina in Rauwolfia serpentina by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 2006;(44):557-560.
37. O'Connor SE, Maresh J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports* 2006;23:532-547.
38. Liu W, Chen R, Chen M, Zhang H, Peng M, Yang C, Ming X, Lan X, Liao Z. Tryptophan decarboxylase plays an important role in ajmalicine biosynthesis in Rauwolfia verticillata. *Planta* 2012;236(1):239-250.
39. Dassonneville L, Bonjean K, Pauw-Gillet MCD, Colson P, Houssier C, Quetin-Leclercq J, *et al.* Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by three DNA intercalating plant alkaloids: cryptolepine, matadine, and serpentine. *Biochemistry* 1999;38:7719-7726.
40. Costa-Campos L, Dassoler SC, Rigo AP, Iwu M, Elisabetsky E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonina. *Pharmacology, Biochemistry & Behaviour* 2004;77:481-489.
41. Klohs MW, Draper MD, Keller F. Alkaloids of Rauwolfia serpentina Benth III. Rescinnamine. A new hypotensive and sedative principle. *Journal of American Chemical Society* 1954;76(10):2843.
42. Varchi G, Battaglia A, Samori C, Baldelli E, Danieli B, Fontana G, *et al.* Synthesis of deserpidine from reserpine. *Journal of Natural Products* 2005;68:1629-1631.
43. Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacological Reviews* 2001;53(3):417-450.
44. Barrales-Cureño HJ, Soto HM, Ramos VA, Trejo TL, Martínez VM, Ramírez GM, López UJ. Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas in situ y en callos inducidos in vitro de Taxus globosa Schlecht. *Spanish Journal of Rural Development* 2011;2:103-114.
45. Barrales-Cureño HJ, Soto HM. Taxoids: secondary metabolites of the yew tree (Taxus spp.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 2012;18(2):207-21.
46. Barrales-Cureño HJ, Ramírez SMF. A review on the production of taxoids anti-cancer of callus and cells of Taxus spp. in cultures in vitro. *Rev. Colomb. Biotecnol* 2013;25(2):167-177.
47. Olajire AA, Sunday OI, Ajibola AO. Improved colorimetric determination of reserpine in tablets using 4-carboxyl-2,6-dinitrobenzene diazonium ion (CDNBD). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2007;6(2):695-703.
48. Negi JS, Bisht VK, Bhandari AK, Bisht DS, Singh P, Singh N. Quantification of reserpine content and antibacterial activity of Rauwolfia serpentina (L.) Benth. ex Kurz. *African Journal of Microbiology Research* 2014;8(2):162-166.