

Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en thevetia peruviana

Thevetin B: Cardiotonic glycoside predominant in Thevetia peruviana

Fredy Amaringo Villa¹, Angelina Hormaza. A²., Mario Arias Z³.
Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, Medellín, Colombia

fredyal216@yahoo.es

ahormaza@unal.edu.co

marioari@unal.edu.co

Resumen— El glicósido cardiotónico *Thevetin B* fue aislado, purificado, caracterizado y cuantificado como el componente principal en las hojas de *Thevetia peruviana*, especie vegetal difundida en la región del Valle del Aburrá. Las potenciales propiedades cardiotónicas descritas para este tipo de compuestos, lo convierten en una molécula de interés para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. Su purificación fue alcanzada mediante cromatografía de columna, su identificación estructural a través de espectroscopia de RMN y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (HPLC-MS) y su cuantificación por cromatogramas de HPLC haciendo uso del método de estándar externo.

Palabras clave— Caracterización espectroscópica, cuantificación, glicósidos cardiotónicos, *Thevetia peruviana*, *Thevetin B*.

Abstract— The cardiotonic glycoside *Thevetin B* was isolated, purified, characterized and quantified as the major component in the leaves of *Thevetia peruviana*, species that has widespread in the region of Valle del Aburrá. Potential cardiotonic properties described for these compounds, makes it an interesting molecule for the treatment of congestive heart failure. Its purification was achieved by column chromatography, its structural identification was performed by NMR spectroscopy and high resolution liquid chromatography coupled to mass (HPLC-MS) and its quantification by HPLC chromatograms using external standard method.

Key Word — Spectroscopic characterization, quantification, cardiac glycosides, *Thevetia peruviana*, *Thevetin B*.

I. INTRODUCCIÓN

La *Thevetia peruviana* (TP) es una planta pequeña con hojas muy verdes y flores tubulares en forma de embudo de color amarillo a naranja, atributos que le otorgan su carácter ornamental. Esta especie vegetal, originaria del

centro y sur de América pero también disponible en Asia y Africa, sintetiza metabolitos secundarios tipo glicósidos cardiotónicos, los cuales almacena en hojas, flores y semillas; pertenece a la familia de las *Apocynáceas* y comúnmente se le conoce con los nombres de Yellow oleander, adelfa amarilla, azuceno, laurel amarillo, catape, cascabel o flor del Perú [1].

La acción biológica de estos glicósidos, que incluye actividad digitalica [2], antiviral, anti-ATPasa [3] y antibacterial [4], entre otras, ha estimulado múltiples investigaciones en procura del aislamiento, caracterización y evaluación de análogos estructurales de este tipo de esteroides cardiotónicos.

Los glicósidos cardiotónicos poseen una estructura esteroideal que se caracterizan por llevar en el C-17 un anillo de lactona no saturado, los cardenólidos tienen específicamente un anillo pentagonal con un doble enlace conjugado con el grupo carbonilo. Además, y como parte de la denominada glicona, incluyen en la posición 3 moléculas de azúcar como sustituyentes, siendo las más comunes, la glucosa y los 6-desoxiazúcares (ramnosa, mucosa, digitalosa y thevetosa [5], figura 1.

La insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) aparece cuando el corazón es incapaz de atender las necesidades del organismo mediante un funcionamiento normal, el corazón aumenta de tamaño, pierde fuerza de contracción e impide que pueda bombear sangre con la eficacia requerida. El tratamiento clásico de la ICC va dirigido a reducir los factores que lo provocan y a mejorar la función del miocardio, lo cual se puede alcanzar incrementando la eficacia por aumento de la fuerza contráctil y el vaciado del corazón con agentes inotrópicos positivos (cardiotónicos) [6].

¹ Químico, Universidad de Antioquia, Grupo de Investigación en Síntesis, Reactividad y Transformación de Compuestos Orgánicos, SIRYTCOR

² Ph.D., Magíster en Química

³ Ph.D., Magíster en Ing. Química

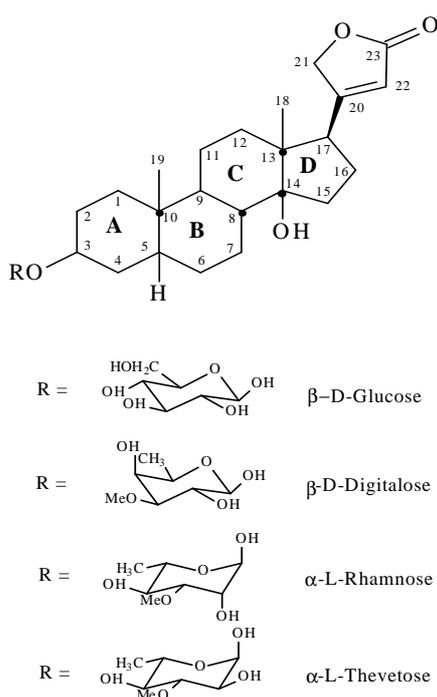


Figura 1. Estructura general de un glicósido cardiotónico

La especie vegetal más investigada para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el corazón es la *Digitallis purpurea* y *Digitallis lanata* [7], conocida como Digital, de la cual se extraen compuestos como la digitoxina, el cual contiene una gran cantidad de cardenólidos. Este tipo de compuestos también han sido extraídos y caracterizados de especies como *Erysimum cheiranthoides* [2,8], *Gomphocarpus sinaicus* [9,16], *Corchorus olitorius* [10], *Criptostegia grandiflora* [11], *Asclepias glaucescens* [12], *Urginea fugax* [13] y *Nerium oleander* [14,15], entre otras, siendo sus principales diferencias la inclusión de un determinado grupo (s) en el esqueleto esteroidal y el tipo y número de azúcares del componente glicona.

Con respecto a las especies *Thevetia ovata* y *Thevetia nereifolia*, Kyeremematen y Hagos [17] reportan que en las semillas estudiadas se encontraron tres glicósidos cardiotónicos tipo cardenólido, (*thevetin A*, *thevetin B* y peruvosido), siendo el contenido de *thevetin A* marcadamente menor. En tanto que de las hojas y raíces de *Thevetia peruviana* [18] una serie de 4 glicósidos flavonoides y distintos iridoides han sido aislados y caracterizados [19-21]. Por otro lado, Basile y su grupo [4] llevó a cabo el estudio de la bioactividad de esta especie vegetal, confirmando adicional a su actividad digitálica, una acción antibacterial.

Pese al gran interés práctico de la especie *Thevetia peruviana* [18-21], el aislamiento y caracterización de los cardenólidos *Thevetin A* y *Thevetin B* ha sido poco

explorado y menos aún en sus hojas. Así, la presente investigación tiene como objetivo la extracción, purificación, caracterización y cuantificación de estos glicósidos cardiotónicos de las hojas de la *Thevetia peruviana* naturalizada en el Valle de Aburrá.

La caracterización y cuantificación de estos cardenólidos permitirá establecer un aporte decisivo para posteriores investigaciones relacionadas con la producción de este tipo de metabolitos secundarios a través de cultivos celulares, dado que a la fecha no se dispone de un patrón comercial estándar para *Thevetia*.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Recolección y tratamiento preliminar de la muestra

La recolección del material vegetal en cantidad suficiente se llevó a cabo en las riberas de la quebrada La Iguana, localizada en el sector urbano de la ciudad, en cercanías de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. Después del respectivo lavado con agua destilada, se procedió a su secado durante dos días a temperatura ambiente, luego se maceró de tal forma que el material vegetal tuviera un tamaño promedio de 0.5 cm.

B. Obtención y preparación de extractos

La extracción de los glicósidos cardiotónicos se realizó mediante licuado de 100 g del material vegetal con 400 mL de éter de petróleo, el producto resultante se lavó tres veces con metanol en una relación de volumen 3:1 (metanol / éter de petróleo) para retirar las grasas en suspensión que se forman durante este proceso y que son retenidas en un embudo de separación buchner. Después se concentró las muestras por medio de destilación a presión reducida del solvente y se realizó una inspección por cromatografía de capa fina (CCF) para verificar la presencia de los cardenólidos. El extracto es conservado en recipientes translúcidos en nevera a 5 °C hasta su posterior análisis cualitativo y purificación a través de tratamiento cromatográfico.

C. Análisis cualitativo

Con el extracto vegetal se realizó inicialmente el tamizaje fitoquímico mediante las reacciones de Liebermann-Burchnard, Keller Killiani y Kedde para determinar el núcleo esteroidal, los desoxiazúcares y el anillo lactona respectivamente, característicos de los glicósidos cardiotónicos. La cantidad de reactivos empleados corresponde al procedimiento estándar [22].

D. Cromatografía de columna

La separación de los cardenólidos se alcanzó mediante cromatografía de columna con sílica gel 60 (0.063-0.200 mm), Marca Merck tomando 500 mg del extracto. Una primera columna con relación de solventes tolueno/acetato de etilo (3:1) generó dos bandas bien diferenciadas por su color, de la primera,

de color verde oscuro, se recolectaron las fracciones 3-11, las cuales mostraron por CCF la posible presencia de un compuesto puro. La segunda banda de color pardo, correspondiente a las fracciones 24-30 mostró dos manchas relativamente cercanas, siendo la superior muy tenue y la inferior muy intensa y definida, esto nos permitió suponer la presencia de un compuesto principal (mancha inferior) y otro producto en menor proporción (mancha superior). Por ello se procedió a realizar una segunda columna cromatográfica modificando la proporción de disolventes, en este caso tolueno/acetilo de etilo (5:1), permitiendo obtener un compuesto puro. Luego se procedió a evaporar el solvente de las fracciones de interés, obteniendo 79 mg de las fracciones 3-11 y 11 mg del compuesto puro de la segunda cromatografía.

E. Elucidación estructural

Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN H y C fueron tomados en CDCl₃ en un espectrofotómetro Bruker Avance 400 MHz, en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Los desplazamientos químicos son reportados en ppm utilizando TMS como estándar.

La determinación de los pesos moleculares fue alcanzada en un cromatógrafo de gases acoplado a masas marca Agilent 1200, en el Laboratorio de Cromatografía Líquida de la Sede de Investigaciones Universitarias de la Universidad de Antioquia, SIU.

F. Cuantificación y condiciones de medición

Se utilizó un Cromatógrafo Líquido Agilent 1200, con detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 220 nm, acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo simple G1956A, equipado con una cámara de ionización tipo ES-API y operado en modo scan (200-1000m/z).

Para lograr la elución de los componentes se utilizó una columna C18 (20cm x 6.4 mm) Supelco 25 mm x 4.6 cm, 5 micrometros, waters soherisorv, ods-s, mantenida durante el análisis a 25 °C, donde 10µL de la muestra fueron inyectados utilizando un sistema automático de muestreo y eluidos con una fase móvil consistente en la mezcla acetonitrilo-agua (30:70). La velocidad de flujo fue de 0.5 mL / min.

G. Preparación de la curva de calibración

Fueron preparadas soluciones estándar de 40, 60, 80, 100 y 120 ppm de peruvósido, (marca Merck, grado analítico) que fueron inyectadas directamente en el sistema HPLC en el orden ascendente respectivo. Para calcular la curva de calibración se utilizó el área de pico del peruvósido,

obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.9916 y una ecuación igual a $Y = 6.25X + 306.2$.

III. RESULTADOS

A. Identificación de glicósidos cardiotónicos

1. Análisis cualitativo

El análisis fitoquímico del extracto de *TP* permitió confirmar de forma rápida, sensible y confiable el núcleo esteroidal, desoxiazúcares y el anillo de la lactona, es decir, la presencia de glicósidos cardiotónicos mediante la coloración específica registrada para las pruebas Liebermann-Burchard (violeta-verde), Keller Killiani (anillo pardo y capa azul verdosa) y Kedde (rojo-violeta).

2. Elucidación estructural

La caracterización espectroscópica de los cardenólidos se apoyó en la resonancia magnética nuclear de protones y carbono (¹H- y ¹³C-RMN), en la espectrometría de masas y en la comparación con información reportada para moléculas estructuralmente análogas [10,11,14,15,21,23].

C	δ _C	H	δ _H
1	26.89	1a 1b	1.82 1.03
2	27.01	2a 2b	1.17 1.05
3	72.20	3	4.55
4	35.03	4a 4b	2.08 1.60
5	39.98	5	1.61
6	32.04	6a 6b	1.95 1.70
7	17.60	7a 7b	1.10 1.30
8	36.94	8	1.79
9	35.54	9	1.76
10	35.19	10	---
11	22.47	11a 11b	2.02 0.99
12	40.38	12a 12b	1.64 1.38
13	59.12	13	---
14	88.27	14	---
15	29.86	15a 15b	1.62 1.48
16	27.38	16a 16b	2.08 1.72
17	68.18	17	2.38
18	18.42	18	0.83
19	25.36	19	0.92
20	174.31	20	---
21	79.030	21a 21b	4.733 4.612

22	117.846	22	5.159
23	171.590	23	---

Tabla 1. Datos espectroscópicos experimentales de RMN de ^1H y ^{13}C - para el *Thevetin B* ($\delta = \text{ppm}$).

Dado que el glicósido *Thevetin A* solo puede aislarse en una cantidad mínima, la identificación de su estructura se limitó al espectro de masas ($m/z = 873$) y por tanto la discusión de los resultados está referida a la molécula de *Thevetin B*. La información espectral de RMN de protones y carbono 13 para el cardenólido *Thevetin B* es resumida en la tabla 1.

A pesar del considerable número de protones presentes en la estructura del cardenólido, (Figura 1), se aprecia para el componente aglicona cuatro grupos de señales, las primeras entre $\delta = 0.90$ y 1.82 ppm, correspondiente a los protones del anillo A con excepción del H-3, los del anillo B, y un protón de las posiciones C-11 y C-12 del anillo C, incluyendo los grupos metílico de las posiciones C-18 y C-19. El segundo grupo de señales se extiende de $\delta = 2.02$ a 2.38 ppm y corresponde a uno de los protones metilénicos de las posiciones C-4, C-11 y C-16 y al protón metínico del C-17. Entre $\delta = 4.5$ y 4.7 ppm se observa un multiplete para los protones metilénicos del C-21 y el metínico del C-3, ubicados en esta posición debido al efecto desprotector del grupo lactónico y del fragmento alcoxi respectivamente. Finalmente, un multiplete a $\delta = 5.16$ ppm correspondiente al protón olefínico del C-22, cuyo acoplamiento a larga distancia con el grupo metilo del C-18 ha sido reportado previamente [23].

Con respecto a las señales de los azúcares, dos anillos de glucosa y un tercero de thevetosa, ellas se pueden asociar en tres grupos, un multiplete entre $\delta = 3.24$ y 3.45 ppm atribuido a los protones de las posiciones C-2', C-3' y C-4'. Un segundo multiplete entre $\delta = 3.69$ y 3.76 ppm de los protones de C-5' y C-6' y el tercer multiplete a $\delta = 4.55$ ppm del protón de la posición del C-1'. En esta región aparecen además de forma solapada las señales correspondientes a los grupos hidroxilos (OH), CH_2OH y CH_3 y CH_3O .

Con relación al espectro de RMN para los carbonos del *Thevetin B*, nuevamente las señales encontradas concuerdan con las previamente reportadas para cardenólidos con un esqueleto aglicona similar [10,11,14,15,21,23]. La señal del carbonilo se registra a $\delta = 174.3$ ppm, los 4 carbonos cuaternarios (C-20, C-14, C-13 y C-10) aparecen a $\delta = 71.5$, $\delta = 88.3$, $\delta = 59.1$ y $\delta = 35.2$ ppm respectivamente. Los nueve carbonos metilénicos de los anillos A, B, C y D aparecen en un rango comprendido entre $\delta = 17.6$ ppm y $\delta = 40.4$ ppm, mientras que el carbono metilénico del anillo lactónico (C-21) aparece desplazado a $\delta = 79.0$ ppm debido al efecto desprotector del grupo éster.

Por su parte, los carbonos metínicos (C-3, C-5, C-8, C-9 y C-17) se registran en el rango esperado entre $\delta = 35.5$ ppm y $\delta = 72.2$ ppm, en tanto que el CH vinílico (C-22) aparece a $\delta = 117.8$ ppm. Los dos grupos metílicos (C-18 y C-19) aparecen según lo previsto a campo bajo, específicamente a $\delta = 18.4$ ppm y $\delta = 25.4$ ppm.

En cuanto a la determinación del peso molecular, el espectro de masas, figura 2, muestra de forma contundente el registro del ión molecular para el cardenólido *Thevetin B* a $m/z = 859.5$, (valor correspondiente a su peso molecular), como el glicósido predominante en las hojas de *TP*. Es valioso señalar que este es el cardenólido de menor toxicidad identificado en esta especie vegetal [1,24].

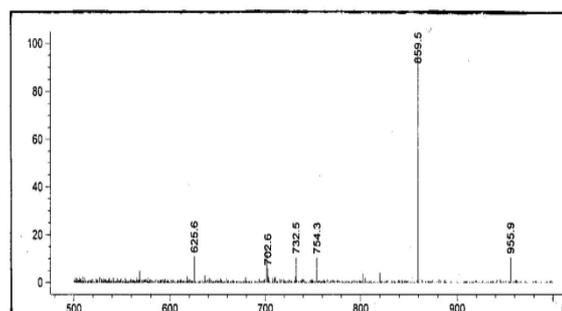


Figura 2. Espectro de masas del glicósido *Thevetin B*

La naturaleza de los azúcares presentes en el *Thevetin B*, α -L-thevetosa (1 molécula) y β -D-Glucosa (2 moléculas) respectivamente, es sugerida por la concordancia entre el peso molecular registrado en HPLC-masas para la muestra analizada con el valor teórico reportado para este cardenólido particular [5].

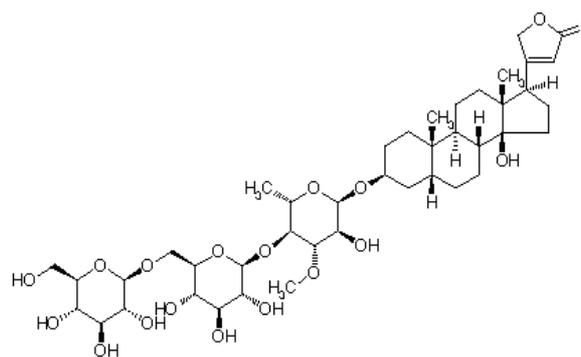


Figura 3. Estructura del glicósido *Thevetin B*

Es importante señalar que la información espectral obtenida ha permitido confirmar la estructura del *Thevetin B* (figura 3), el cual, hasta donde tenemos conocimiento, solo ha sido caracterizado por su masa a través de HPLC [17].

3. Cuantificación de *Thevetin B*

La cuantificación del *Thevetin B* fue alcanzada por UV-Vis HPLC bajo el método del Estándar externo [25], dado que la molécula de *thevetina* no es comercialmente disponible, el peruvósido fue la molécula seleccionada como estándar debido a su similitud estructural.

En la tabla 2 se reporta la información resultante de la curva de calibración y de la medición del *Thevetin B*. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9916 y una ecuación igual a $Y = 6.25X + 306.2$. El Tiempo de Retención del *thevetin B* fue de t_R : 6.15 minutos (figura 4), resultado que discrepa ligeramente de estudios previos (t_R : 8.40 minutos) y que pueden ser atribuidos a las diferencias en la metodología implementada, específicamente a la utilización de soluciones de glicósidos como referencia [17]. Con la información obtenida se estima un valor de 91 mg de *thevetin B* por cada 100 g de muestra analizada. El contenido relativamente bajo para este cardenólido se ajusta a lo previsto, donde previamente se ha establecido el distinto porcentaje de glicósidos que se almacenan en semillas (4,8%), hojas (0,070%), flores (0,045%) y la savia (0,036%) [1].

Estándar externo <i>peruvósido</i>		<i>Thevetin B</i>	
Concentración (ppm)	Área	Número de muestra	Área
40	554	1	880
60	710	2	865
80	765	Área Promedio	872.5
100	936	C.V	1.21%
120	1066	t_{ret} (min)	6.510

Tabla 2. Curva de calibración y resultados para *Thevetin B*

C.V: Coeficiente de variación

t_{ret} :Tiempo de retención

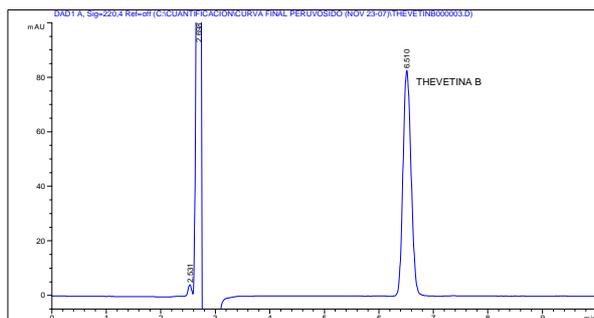


Figura 4. Cromatograma de los componentes de la TP

El valor encontrado para el coeficiente de correlación (0.9916) señala una buena linealidad y el coeficiente de variación C.V. (1.21 %) indica una buena precisión del método.

IV. CONCLUSIONES

Mediante técnicas tradicionales de separación y purificación como son la extracción, filtración y cromatografía en columna, se logró aislar y purificar dos metabolitos secundarios tipo glicósidos cardiotónicos, *Thevetin A* y *Thevetin B*, presentes en las hojas de la planta *Thevetia peruviana*, naturalizada la región de Antioquia. La estructura de *Thevetin B* fue elucidada mediante espectroscopia de RMN, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS) acoplado a masas y comparaciones con información espectroscópica disponible. La mínima cantidad del *Thevetin A* aislada y purificada dificultó su completa caracterización, así como el establecimiento de su porcentaje en la muestra.

La cromatografía líquida de alta resolución HPLC con arreglo de diodos permitió bajo el modelo de estándar externo la cuantificación de *Thevetin B*, encontrando un valor de 91 mg / 100 g de muestra, cantidad relativamente baja y que deja explícito la necesidad inmediata de delinear métodos alternativos para su obtención tales como los cultivos celulares.

Dado la carencia de un estándar patrón para los componentes de *Thevetia peruviana*, la información concerniente a la caracterización y cuantificación del *Thevetin B* derivada de la presente investigación constituye un apoyo decisivo y fundamental para la posible implementación de estrategias de producción de este metabolito secundario por medio de cultivos celulares.

V. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín y al Instituto de Química de la Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS

- [1] N. Torres. (2011, Mayo). Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*. RETEL. [en línea], pp. 2-19. 2003 Disponible en: http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19001.pdf
- [2] Z. Lei, S. Yahara, T. Nohara, "Cardenolides from *Erysimum cheiranthoides*", *Phytochemistry*, vol. 41(4), pp. 1187-1189, 1996.
- [3] M. Takechi, C. Uno, Y. Tanaka, "Structure-activity relationships of synthetic cardiac glycosides", *Phytochemistry*, vol. 41 (1), pp. 125-127, 1995.
- [4] A. Basile, S. Giordano, "Antibiotic activity in *Thevetia nerifolia* and *Thevetia peruviana*", *Pharmacol. Res.*, vol. 27(1), pp. 99-100, 1993.
- [5] R. Ikan, "Naturally Occurring Glycosides", Ed. John Wiley and Sons Ltd, 1999.

- [6] M. Medarde, E. Caballero, A. San Feliciano, "Cardiopatías", *Investigación y Ciencia*, pp. 36-37, Febrero 1997.
- [7] J. Brunenton, "Pharmacognosy, Phytochemistry, medicinal plants", Ed. Springer, 1993.
- [8] Z. Lei, Z. Jin, Y Ma, "Cardiac glycosides from *Erysimum cheiranthoides*", *Phytochemistry*, vol. 49 (6), pp. 1801-1803, 1998.
- [9] H. El-askar, J. Holzl, H. El-sayed, "A comparative study of the cardenolide content of different organs of *Gomphocarpus sinaicus*", *Phytochemistry*, vol. 38 (5), pp.1181-1184, 1994.
- [10] T. Nakamura, Y. Goda, S. Sakai, "Cardenolide Glycosides from seeds of *Corchorus olitorius*", *Phytochemistry*, vol. 49 (7), pp. 2097-2101, 1998.
- [11] M. Kamel, M. Assaf, Y. Abe, "Cardiac glycosides from *Cryptostegia grandiflora*", *Phytochemistry*, vol. 58, pp. 537-542, 2001.
- [12] G. Fonseca, Rodrigues-Hahn, M. Tablero, "Labriform, a cardiac glucoside from *Asclepias glaucescens*", *J. Nat. Prod.*, vol. 54(3), pp. 860-862, 1991.
- [13] L. Krenn, A. Hufner, A. Kastenhuber, "Chemotaxonomic relevance of cardenolides in *Urginea fuga*", *Phytochemistry*, vol. 65, pp. 2881-2884, 2004.
- [14] S. Begun, B. Siddiqui, R. Sultana, "Bio-active cardenolides from leaves of *Nerium oleander*", *Phytochemistry*, vol. 50, pp. 435-438, 1999.
- [15] S. Bina, S. Razia, B. Sabira, "Cardenolides from the Methanolic Extract of *Nerium oleander* Leaves Possessing Central Nervous System Depressant Activity in Mice", *J. Nat. Prod.*, vol. 60, pp.540-544, 1997.
- [16] S. Nahla, Abdel-Azim, "A cardenolide glycoside from *Gomphocarpus sinaicus*", *Phytochemistry*, vol. 49 (1), pp. 273-275, 1998.
- [17] G. Kyerematen, M. Hagos, "The Cardiac glycosides of *Thevetia ovata* A.DC. and *Thevetia nereifolia* Juss. *Ex Stend*", *Acta Pharm. Suec.*, vol. 22 (1), pp. 37-44, 1985.
- [18] F. Abe, Y. Iwase, T. Yamauchi, "Flavonol sinapoyl glycosides from leaves of *Thevetia peruviana*", *Phytochemistry*, vol. 40 (2), pp. 577-581, 1995.
- [19] F. Abe, R. Chen, T. Yamauchi, "Dinormonoterpenoids and their apiosylglucosides from *Thevetia peruviana*", *Phytochemistry*, vol. 43(1), pp. 161-163, 1996.
- [20] F. Abe, T. Yamauchi, S. Yahara, "Minor iridoids from *Thevetia peruviana*", *Phytochemistry*, vol. 38(3), pp. 793-794, 1995.
- [21] M. Takashi, O. Takashi, K. Takahi, K. Thseorn, "Cardenolide Glycosides of *Thevetia peruviana* and Triterpenoid Saponins of *Sapindus emarginatus* as TRAIL Resistance-Overcoming Compounds", *J. Nat. Prod.*, vol. 72, pp. 1507-1511, 2009.
- [22] M. Litter, "Farmacología experimental y clínica", 7ª ed., Ed. El Ateneo, 1986.
- [23] E. Hani, H. Atef, "Complete ^1H and ^{13}C signal assignments of 5 α -cardenolides isolated from *Calotropis procera*", *J. Mol. Struct.*, 477, pp. 201-208, 1999.
- [24] M. Arias, M. Angarita, J. Restrepo, "Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*", *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, vol. 46, pp. 233-238, 2010.
- [25] O. Quattrocchi, S. Abelaira, R.F. Laba, "Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica", Ed. Artes gráficas, Argentina, pp. 241 - 266.1993.