

ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS, CORTEZAS Y SEMILLAS DE *Thevetia peruviana* (PERSOON) SCHUM

PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL STUDY AND ASSESSMENT OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF LEAVES, BARKS AND SEEDS OF *Thevetia peruviana* (PERSOON) SCHUM

Dency José Pacheco-López, Manuel Enrique Taborda-Martínez y Catalino De la Rosa-Torres

RESUMEN

Al realizar el estudio fitoquímico preliminar para determinar en forma cualitativa la composición química de la semilla, corteza y hojas de la especie *Thevetia peruviana*, se obtuvieron como constituyentes principales glicósidos cardiotónico, flavonoides, triterpenoides y esteroides en hojas, corteza y semillas. Al aceite fijo extraído de la semilla se le realizó un perfil de ácidos grasos en un cromatógrafo de gases de alta resolución con detector de ionización en llama (HRGC-FID), los componentes mayoritarios fueron los ácidos oleico (46%), palmítico (23.4%), linoleico (17%), esteárico (9,4%) y araquídico (1.8%). Se comparan estos valores porcentuales con los de aceites de almendra, ricino, oliva, cacao, coco, maíz, algodón, maní, soya, girasol y manteca de cerdo. Este aceite ofrece la posibilidad de ser aprovechado a nivel industrial debido al elevado rendimiento de extracción y las características fisicoquímicas de sus ácidos grasos. Se evaluó la actividad antifúngica de extractos etéreos y etanólicos a diferentes concentraciones frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*, con resultados negativos; sin embargo, no se descarta que posea esta propiedad contra hongos menos resistentes. Se utilizó como control positivo el antifúngico comercial Mancozeb.

PALABRAS CLAVE: *Thevetia peruviana*, *Mycosphaerella fijiensis*, Apocynaceae, *Thevetina A y B*; ácidos grasos.

ABSTRACT

When making the preliminary phytochemical study to determine in qualitative form the chemical composition of the seed, barks and leaves of *Thevetia peruviana* specie, cardiotonic glycosides, flavonoids, triterpenoids and steroids were obtained like components main in leaves, bark and seeds. To the extracted fixed oil of the seed a fatty acid profile was made to him in a high resolution gas chromatograph with ionization detector in flame (HRGC-FID), the majority components were the acids oleic (46%), palmitic (23.4%), linoleic

Dirección de los Autores:

Universidad del Magdalena, Profesor de Química. Dirección personal: calle 8 N°13-20 Gaira, Santa Marta, Colombia. quimicapacheco@yahoo.es (D.J.P.L). Universidad del Magdalena, Laboratorio de Química. Dirección personal: manzana J casa 2 Urbanización Concepción 5ª etapa, Santa Marta, Colombia. quimicatoborda@yahoo.es (M.E.T.M.). Universidad del Atlántico, Profesor de Química, Barranquilla, Colombia. cdelarosa@uniatlántico.edu.co (C.D.T.).



(17%), stearic (9,4%) and arachidic (1.8%). These percentage values with those of almond oils, castor oil, olive, cacao, coconut, corn, cottonseed, peanut, soybean, sunflower and fat of pig are compared. This oil offers the possibility of being taken advantage of at industrial level due to the high yield extraction and the physicochemical characteristics its fatty acids. The antifungal activity of ethereos and etanolics extracts to different concentrations was evaluated in front of the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, with negative results; nevertheless, one does not discard that it has this property against less resistant fungi. The commercial antifungal Mancozeb was used like positive control.

KEY WORDS: *Thevetia peruviana*, *Mycosphaerella fijiensis*, Apocynaceae, Thevetine A and B, fatty acids.

INTRODUCCIÓN

Colombia, en particular, tiene un amplio potencial como fuente de principios activos contra las enfermedades que afectan a la humanidad; existen estudios etnobotánicos que demuestran la amplia variedad de plantas medicinales existentes en nuestros suelos (García-Barriga, 1975; Schultes, 1987; Correa y Bernal, 1989; Giraldo-Tafur, 1996; Bonzani, 1999; Giraldo-Tafur, 2000; Roca, 2001). Lo anterior plantea la necesidad de complementar el saber popular con estudios fitoquímicos y fitoterapéuticos, con el fin de optimizar el uso que se le ha venido dando a las plantas medicinales. Este es el marco referencial en el que se ubica el presente trabajo con cuya realización se pretende contribuir al conocimiento y la investigación científica de la Flora Colombiana, especialmente de la subregión de Santa Marta, Costa Norte de Colombia. Asimismo evitar la pérdida de la sabiduría tradicional de la medicina popular, practicada por sus pobladores prístinos, divulgar el buen uso de dicho saber ancestral combinado con el científico que se ha logrado acumular a través de diversas generaciones de investigadores.

La especie vegetal seleccionada para el estudio, *Thevetia peruviana* (Persoon) Schum pertenece a la familia Apocynaceae y recibe varios nombres vulgares entre ellos cabalonga, amancal, castañeto y tomatoco de monte. Se cultiva como planta ornamental (García-Barriga, 1975; Correa y Bernal 1989; Salam, 1995; Adarve, 1997; Roca, 2001). Es originaria de Sur América y prolifera en las regiones tropicales del mundo; en Colombia se distribuye desde el nivel del mar hasta 1500 m.s.n.m. y crece en asocio con vegetación xerófila en bosque muy seco tropical (García-Barriga, 1975).

A esta especie se le determinó, en forma cualitativa, la presencia de metabolitos secundarios en semilla, corteza y hojas; se realizó también un perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de la semilla y se evaluó la actividad antifúngica de los extractos en éter de petróleo

60-80 y etanol de semillas, hojas y corteza, frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la sigatoca negra del banano, enfermedad que genera pérdidas económicas considerables a los productores.

En Colombia y Perú la tintura de la corteza se ha utilizado como febrífugo, purgativo y emético (Correa y Bernal, 1989); para tal fin se usa también la decocción de las hojas (García-Barriga, 1975). En México el látex se emplea contra las hemorroides, sarna, úlceras y llagas; el extracto de la planta entera se utiliza como antimálarico (Mendieta y Del Amo, 1981).

Varios de los principios activos, entre ellos neriifolina, peruvósido, ruvósido, thevetina A y B, producen efectos inotrópicos positivos, y en dosis altas en animales de laboratorio, producen paro cardíaco (Correa y Bernal, 1989).

El aceite de la semilla demuestra actividad antibacteriana contra, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus* y *Vibro cholerae* (Basile et al, 1993; Naovi et al, 1991; Saxena, 1990). En un trabajo reciente se demostró las propiedades antifúngicas fotoactiva de extractos de semillas (n-hexano y CH₂Cl₂) y sus fracciones contra el hongo *Cladosporium cucumerinum* (Gata-Goncalves et al, 2003).

De las hojas se ha aislado flavonoides, tales como glicosidos sinápicos de kaemferol y quercetina (Abe et al, 1995a), glucósidos flavonoles y flavanona (Tewtrakul et al, 2002), así como iridoides (Abe et al 1995b). En la corteza se han identificado triterpenos (Ali et al, 2000) y dinormoterpenoides (Abe et al, 1996). Asimismo, se han encontrado iridoides en las raíces (Abe et al, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Semillas, hojas y corteza fueron recolectadas entre los meses de junio y julio del 2001, en Gaira, corregimiento



del Distrito de Santa Marta (Magdalena), a una altura de 2 m.s.n.m. Un ejemplar voucher fue depositado en el Herbario de la Universidad del Magdalena (U.T.M.C.); la identificación la realizó Eduino Carbonó, botánico, director del UTMC. Después de un período de secado al sol, el material fue sometido a molienda.

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

A 82 g de corteza, 170 g de semillas y 180 g de hojas secas y molidas se les realizaron extracciones tipo Soxhlet con éter de petróleo 60-80 y etanol del 96%. Los extractos se concentraron en un rotaevaporador tipo flash (marca Buchii) a presión reducida. Los metabolitos se separaron por cristalización fraccionada y métodos cromatográficos (columna, capa delgada), utilizando como fase estacionaria sílica gel 60 de 0.25 mm de espesor y por partición usando solventes de polaridad creciente (tolueno, tolueno-acetato de etilo 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1)

El proceso de extracción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de Silica-gel como fase estacionaria y CHCl₃ como fase móvil.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE SEMILLA

Del extracto etéreo de semilla (aceite) se tomaron 60 mg y adicionaron 5 mL de solución del complejo trifluoruro de boro al 12% (p/v) en metanol. La mezcla con fue sumergida en un baño de aceite a 85-90° C con agitación permanente durante una hora hasta desaparición de la fase lipídica. Finalizada la reacción, se realizó la extracción de los derivados ésteres metílicos de los ácidos grasos con 1 mL x 3 de n-heptano. Del extracto orgánico obtenido, se tomaron 0.5 mL y se aforó a 1 mL con n-heptano; 1 L de esta solución fue inyectado para su análisis cromatográfico en un cromatógrafo de gases de alta resolución con detector de ionización en llama (HRGC-FID), marca Hewlett Packard, modelo HP5890A, Serie II. Este análisis se realizó bajo los siguientes parámetros analíticos:

CG Modelo: HP 5890A Serie II (Hewlett-Packard, Palo Alto California, USA).

Detector: FID Temperatura: 280 °C

Temperatura inicial Horno: 100 °C

Tiempo inicial: 0 min.

A 2 °C/min hasta 136 °C durante 1 min.

A 7 °C/min hasta 250 °C durante 25 min.

Columna Longitud (m) 60 d.i (mm)

Fase DB WAX Espesor (um) 0.25

Velocidad del gas de arrastre: 1.5mL/ (70 °C)

Presión de entrada de columna: 200 k Pa

Inyector Automático: HP-7683

Split: 21.4 mL/min Splitless:

Relación split 14:1

Temperatura (°C): 250

Volumen de inyección 1.0 (µl)

Gases Carrier: Helio (99.995%)

Nitrógeno(mL/min): 25

Aire (mL/min): 397

Mezcla Ar/CH₄ (mL/min): Hidrógeno (mL/min): 43

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

El análisis fitoquímico preliminar se realizó con base en los procedimientos reportados por Bilbao (1997) y Martínez et al (2001) (Figura 1).

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

A partir de los extractos etéreos y etanólicos de semillas, hojas y corteza, se prepararon 8 diluciones (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 y 250 p.p.m.), utilizando para ello agua y un tensoactivo, que para el caso del extracto etanólico de semilla fue Tween 80 y para el resto de los extractos, Tween 20. El medio de cultivo (PDA) se esterilizó en autoclave, se colocó en cajas petri, aún en estado líquido se adicionaron 1 mL de las diluciones preparadas con los extractos obtenidos; se realizó homogenización con agitación y se dejó solidificar. Una vez frío, se inoculó una pequeña cantidad del hongo *Mycospharella fijiensis* tomada con la punta del asa. Se incubó durante 48 horas a una temperatura de 30°C. De cada tratamiento se corrió un control negativo (vehículo) y uno positivo (antifúngico de referencia: Mancozeb). Se escogió este hongo para el estudio de la actividad antifúngica por la importancia económica del mismo.

RESULTADOS

La extracción foliar etanólica se realizó en caliente durante 72 horas, obteniéndose 3.76g de extracto seco, de color verde y presencia de cristales, tuvo un rendimiento de 2.03 %. El tiempo extracción con éter de petróleo fue de 80 horas y se obtuvo 4.0 g de extracto seco de color verde claro y consistencia pastosa, con un rendimiento de 2.2 %.

El extracto etéreo a partir de la corteza, se obtuvo en un tiempo de 36 horas; igual tiempo se empleó para obtener el extracto etanólico. Este último de color verde



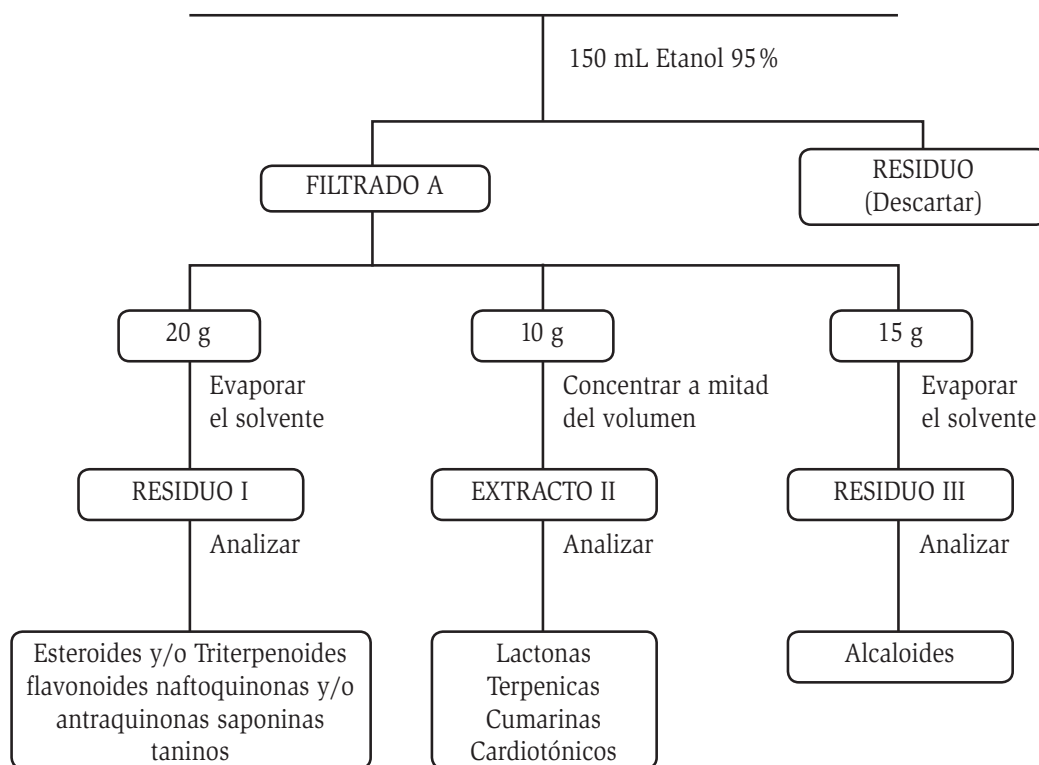


Figura 1. Obtención de extracto etanólico a partir de 50 g. de material vegetal pulverizado (hojas, semillas y corteza).

oscuro, con presencia de cristales y un peso de 1.2 g, con un rendimiento de 1.5 %. El extracto etéreo era de color verde claro de consistencia pastosa con un peso de 1.6 g y un rendimiento de 2 %.

A partir de la semilla se obtuvo 10.9 g de extracto etanólico, que contenía cristales incoloros, con un rendimiento de 6.2%. El tiempo empleado para la extracción fue igual a 72 horas. Del extracto etéreo se obtuvieron 119 g con rendimiento de 70%; utilizándose un tiempo de 90 horas al final se extrajo un aceite fijo de color amarillo pálido.

La prueba de caracterización química fue positiva para glicósidos cardiotónicos, flavonoides, triterpenoides y esteroides en las tres estructuras vegetales estudiadas, cortezas, hojas y semillas.

El análisis de ácido grasos del aceite fijo de semilla, se llevó a cabo mediante la preparación y cuantificación de sus metilésteres según las normas ISO 5509 ("Animal and Vegetable Fats and Oils - Preparations of Methyl Ester of Fatty Acids") y 5508 ("Animal and vegetable Fats and Oils - Analysis by Gas Chromatography of Methyl Ester

Fatty Acids"), respectivamente. Para la identificación de los metilésteres de ácidos grasos presentes en la muestra, se utilizó el método de comparación de sus tiempos de retención con los de los patrones certificados de metil ésteres de ácidos grasos (mezcla de estándares GLC-10 GLC-50, GLC 70, GLC 80, GLC 100, Matreya Inc. Pensilvana USA), analizados con las mismas condiciones cromatográficas. (Tabla 1. y Figuras 2 y 3). La figura 2 y la Tabla 1 muestran que el aceite de semilla contiene un total de 14 ácidos grasos, de los cuales 5 constituyen el 97.6% de la concentración (palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquídico), El restante 2.4% corresponde a ácidos grasos con niveles bajos e incluso algunos ácidos grasos esenciales, como el linolénico y el pentadecanoico aparecen a niveles de trazas. La porcentualidad total de ácidos grasos insaturados corresponde a 63.9%; del cual casi las tres cuartas partes corresponden al ácido oleico (una insaturación) El ácido linoleico (esencial, con dos insaturaciones) representa una fracción mayor a una cuarta parte.

Los porcentajes de ácidos grasos reportados en la Tabla 1 pueden compararse con los reportados en las tablas 2 y 3. Se observa que el aceite fijo de semilla, de *Thevetia*

Tabla 1. Cantidad relativa (%) de ácidos grasos del aceite de semilla de *Thevetia peruviana*

ÁCIDOS GRASOS	MEDICIÓN 1	MEDICIÓN 2	PROMEDIO
Mirístico	0,19	0,19	0,2
Pentadecanoico	0,03	0,03	0,1
Palmitico	23,46	23,39	23,4
Palmitoleico	0,20	0,19	0,2
Heptadecanoico	0,10	0,08	0,1
Estearico	9,35	9,36	9,4
Oleico	46,04	46,03	46,0
Linoleico	17,00	17,02	17,0
Nonadecanoico	0,03	0,03	0,1
Linolénico	0,03	0,03	0,1
Araquídico	1,77	1,78	1,8
Eicosenoico	0,49	0,50	0,5
Behénico	0,62	0,63	0,6
Nervónico	0,04	0,04	0,1

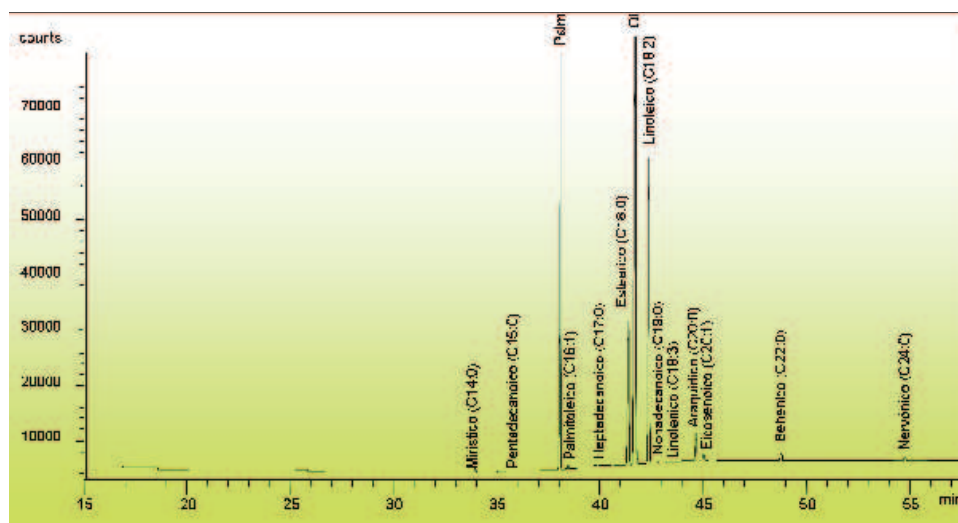


Figura 2. Cromatograma con los tiempos de retención de la mezcla de estándares de metilésteres de ácidos grasos

peruviana contiene mayor proporción de ácidos grasos insaturados que el aceite de coco y de cacao. Estos dos aceites presentan mayor contenido en ácidos grasos saturados totales.

En cuanto al porcentaje de ácido oleico, es superior al del aceite de coco, maíz, algodón y girasol; parecido al de soya y maní. La proporción de ácido linoleico es parecida a la aceite de oliva y maní. Junto con el aceite de girasol

y de maní, el aceite extraído de la semilla de *Thevetia peruviana* solo presenta trazas de ácidos linolénico.

Los ácidos grasos saturados constituyen el 35,7%, representado en su gran mayoría por los ácidos palmíticos, estearico y araquídico.

La totalidad de los extractos en sus diferentes concentraciones, dieron resultados negativos en las prueba

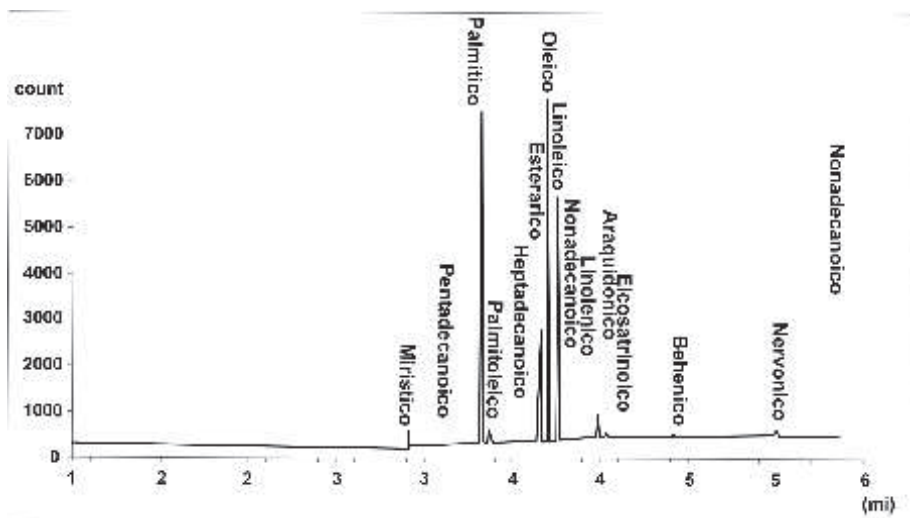


Figura 3. Cromatograma con los tiempos de retención de los ácidos grasos contenidos en el aceite extraído de la semilla de *Thevetia peruviana*

de actividad antifúngicas contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad Sigatoka Negra. No hubo diferencia en cuanto al crecimiento del hongo, entre el control negativo, (Vehículo) y los tratamientos a diferentes concentraciones de los extractos, mientras que en el control positivo hubo inhibición del crecimiento del hongo objeto de estudio.

DISCUSIÓN

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar están acorde con la quimiotaxonomía de la familia a la que pertenece la especie estudiada (Apocynaceae), (Correa y Bernal, 1989; Salam, 1995; Schmidt, 2001) por cuanto reveló la presencia de glicósidos cardiotónicos en todas las estructuras analizadas; así como flavonoides, triterpenoides y esteroides.

Un gran porcentaje del peso de la semilla, de la especie vegetal *Thevetia peruviana*, corresponde a un aceite fijo, el cual contiene ácidos grasos de 14 hasta 24 átomos de carbono. Por el elevado rendimiento en su extracción (70%) y por las características fisicoquímicas de sus ácidos grasos, este aceite podría ser explotado a nivel industrial en la elaboración de jabones, pinturas y detergentes, así como en la industria farmacéutica, de cosméticos y de lubricantes. Tomando como base que casi las dos terceras partes de su contenido corresponde a ácidos grasos insaturados, podría servir como aceite comestible, aunque para ello debe someterse a un tratamiento previo que permita eliminar metabolitos, tales como alcaloides, que pueden resultar tóxicos.

La planta objeto de esta investigación, como lo demuestran los estudios etnobotánico, tiene una amplia distribución en la zona tropical, es de crecimiento rápido y una vez llega a la madurez sexual, florece durante todo el año, produciendo frutos con semillas de tamaño apreciable; además resiste condiciones ambientales adversas. Lo anterior permitiría realizar cultivos de este arbusto que serían productivos en corto tiempo, lo cual sustenta aun más los posibles usos del aceite extraído de la semilla.

Aunque los extractos etéreos y etanólicos de hojas, corteza y semillas no presentan actividad antifúngica contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, no se descarta que posean esta actividad contra hongos menos resistentes, pero igual de importantes por el perjuicio que pueda causar al humano. Son necesarios entonces ensayos con el extracto total tendientes a evaluar propiedades antimicrobianas y antifúngicas de esta planta, en los que sea posible emplear alternativas metodológicas que incluyan, por ejemplo, bioensayos de fotoactividad antifúngica, teniendo en cuenta que recientemente se reportó el estudio de esta actividad de extractos de semillas (n-hexano y CH_2Cl_2) y sus fracciones contra el hongo *Cladosporium cucumerinum*; la fracción mas fotoactiva contenía mayoritariamente terpenos y ácidos grasos y sus derivados. Los terpenos parecen ser las sustancias con mayor actividad antifúngica (Gata-Goncalves et al, 2003). Es necesario señalar que extractos de esta especie *Thevetia peruviana*, presentan actividad antimicrobiana frente a varias especies de hongos y bacterias patógenas.

Tabla 2. Comparación de cantidades relativas de ácidos grasos saturados e insaturados en el aceite de *Thevetia peruviana* y en otros aceites fijos y grasas comunes.

Clases de aceite fijo	Ácidos grasos saturados	Ácidos grasos insaturados
<i>Thevetia peruviana</i>	35.7	63.9
Almendra ^a	1.2	88
Ricino ^a	0.3 - 2.5	88 - 94
Oliva ^a	7 - 20	75 - 93
Cacao ^a	59	41
Manteca de cerdo ^a	60	40

^a Valores tomados de Senser y Sherz (1991)

Tabla 3. Distribución de ácidos grasos saturados e insaturados en *Thevetia peruviana* y en algunos aceites vegetales comunes.

Aceite fijo	Ácidos grasos saturados totales. %	ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS		
		Oleico C18:1, Δ^9	Linoleico C18:2, $\Delta^9,12$	Linolenico C18:3, $\Delta^9,12,15$
<i>Thevetia peruviana</i>	35.7	46	17	-
Coco b	86-91	6-9	1-4	0-0.1
Maíz b	9-15	25-37	50-56	0.1-0.7
Algodón b	17-31	17-37	44-55	0-0.6
Maní a	11-20	40-71	5-15	-
Soya b	5-24	16-47	39-53	4-9
Oliva b	9-22	62-83	8-15	0.5-0.7
Girasol a	9	29.5	60	-

^a valores tomados de Senser y Sherz (1991)

^b Valores tomados de Hayes (1987)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Magdalena por la financiación que prestó al proyecto; a los docentes que nos colaboraron y animaron para la culminación de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F., Chen, R-F y Yamauchi, T. 1996. Dinomonoterpenoids and Their apiosylglycosides from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry* 43(1): 161-164.
- Abe, F., Chen, R-F, Yamauchi, T. y Ohashi, H. 1994. Iridoids from the roots of *Thevetia Peruviana*. *Chem. Pharm. Bull.* 43(3): 499-500.
- Abe, F., Yamauchi, T., Yahara, S y Nohara, T. 1995. Minor iridoids from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry* 38(3): 793-794.
- Abe, F., Yamauchi, T., Yahara, S y Nohara, T y Iwase, Y. 1995. Flavonol sinapoyl glycosides from leaves of *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry* 40(2): 577-581.
- Adarve, J. 1997. Inventario de la flora ornamental de la ciudad de Tulúa. *Cespedesia* 22(69): 9-35.
- Ali, M., Ravinder, E y Ramachandram, R. 2000. New ursane-type Triterpenic esters from the stem bark of *Thevetia peruviana*. *Pharmazie* 55(5): 385-389.
- Basile, A., Giordano, S y Castaldo-Gobianchi, R. 1993. Antibiotic activity in *Thevetia neriifolia* and *Thevetia peruviana* (Apocinaceae). *Pharm. Res.* 27(1): 99-100.
- Bilbao, M. 1997. Análisis Fitoquímico preliminar. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas. Universidad del Quindío. Armenia. 181 p.
- Bonzani, R. 1999. Medicinal use of plants by the peasant community of San Jacinto, Northern Colombia. *Caldasia* 21(2): 203-218.
- Correa, J. y Bernal, H. 1989. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. 1° Edición. Editorial Guadalupe. Bogotá. Tomo I. 379-399.
- García-Barriga, H. 1975. Flora medicinal de Colombia. Botánica médica. Tomo II. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Imprenta Nacional. Bogotá. 456-457.



- Gata-Goncalves, L., Nogueira, J.M.F., Matos, O. And Bruno de Sousa, R. 2003. Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*. 70(1):51-54
- Giraldo-Tafur, C. 1996. Medicina Tradicional de las mujeres Siona del resguardo de Buenavista en el Río Putumayo. *Caldasia* 18(2): 227-238.
- Giraldo-Tafur, R. 2000. Medicina Tradicional de la mujer Inga. *Revista Acad. Colomb. Cienc.* 24(90): 5-23.
- Hayes, G. D. 19387. Manual de datos para Ingeniería de Alimentos. Acribia. Zaragoza. 91-92
- Mendieta, R. M. Y S. Del Amo. 1981. Plantas medicinales del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Ed. Continental. México. 336.
- Martínez, A., Ospina, F. y Valencia, G. A. 2001. Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y fitoquímica 2001. Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Universidad de Antioquia. Medellín. 56 p.
- Naovi, S. A., Khan, M. S. y Vohora, S. B: 1991. Antibacterial, antifungal and antihelmintic investigations on Indian medicinals plants. *Fitoterapia* 63(2): 221-228.
- Roca, R. 2001. Plantas comunes de Santa Marta. Tomo I. Fondo Editorial Universidad del Magdalena. Santa Marta. 69-70.
- Salam, A. 1995. Poisonous Plants of Malaysia. Tropical Press Sdn. Bhd. Kuala Lumpur. Malaysia. 11-12.
- Saxena, V. K. 1990. *Thevetia peruviana* kernel oil: a potencial bactericidal agent. *Fitoterapia* 61(4): 348-349.
- Schultes, R. 1987. Ethnopharmacology of the Northwest Amazon: Unexpected chemical discoveries. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 16 (62): 85-92.
- Senser, Friedrich y Sherz Heimo 1991. Tablas de composicion de alimentos. El pequeño Sauci-Fachman-Kraut. Acribia Zaragoza. 96-97.
- Schmidt, R. 2001. Botanical Dermatology Database-Apocynaceae. <http://bodd.cf.ac.UK/botdermfolder/botdermA/APOC.html> Con acceso 17.09.2001.

Fecha de recepción: 27/09/04

Fecha de aceptación: 19/05/06

