

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales ZARAGOZA**



---

**SINTESIS DE CARDIOTONICOS MODIFICADOS**

**T E S I S      P R O F E S I O N A L**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:**

**Arturo Pérez Medrano**

**MEXICO, D. F.**

**1982**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

|                                  | pag |
|----------------------------------|-----|
| I     Introducción               | 2   |
| ..                               |     |
| II    Fundamentación del tema    | 3   |
| III   Planteamiento del problema | 43  |
| IV    Objetivos                  | 44  |
| V     Hipótesis                  | 45  |
| VI    Material y método          | 47  |
| VII   Desarrollo                 | 52  |
| VIII  Discusión                  | 62  |
| IX    Conclusiones               | 64  |
| X     Propuestas                 | 65  |
| XI    Anexo                      | 66  |
| XII   Bibliografía               | 73  |

## I. INTRODUCCION

En general el problema más importante en la terapia es que frecuentemente al lado del efecto principal o curativo de los fármacos se presentan efectos secundarios. Esto ha sido causa de una gran cantidad de investigación química, la cual va directamente enfocada a disminuir los efectos secundarios, comúnmente tóxicos, mediante modificaciones estructurales en la molécula de los fármacos.

Los cardiotónicos que actualmente están en uso clínico presentan serias desventajas debido principalmente a su elevada toxicidad y a los riesgos que se corren en su administración, por su estrecho margen de seguridad.

La búsqueda de un cardiótonico con cualidades superiores a los ya existentes es de gran importancia para la terapéutica, ya que más del 55% de las muertes por causa natural son debidas a enfermedades cardiovasculares.

## II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Los glucósidos cardiacos son uno de los grupos de fármacos de más importancia y mayor uso en medicina clínica, estos fármacos vegetales producen en el corazón con insuficiencia un marcado efecto inotrópico positivo (1) (aumento en la fuerza de contracción). El término "glucósidos cardiacos" se aplica a un gran número de esteroides de origen natural. Al hidrolizar estos compuestos con enzimas o agentes químicos producen una lactona esteroidal y una o más moléculas de carbohidratos (azúcares).

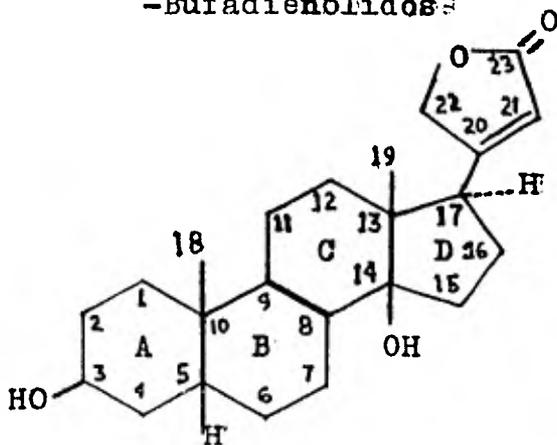
La porción no azucarada del glucósido es llamada genina. Generalmente, las geninas existen combinadas con azúcares, pero ciertos compuestos, tales como los venenos de sapo (bufo), se encuentran como esteroides libres.

La unión entre el esteroide y el azúcar está formada por un oxígeno que une al grupo 3-hidroxi de la genina y la terminación de un acetal cíclico.

Los glucósidos cardiacos pueden ser divididos en dos clases principales.

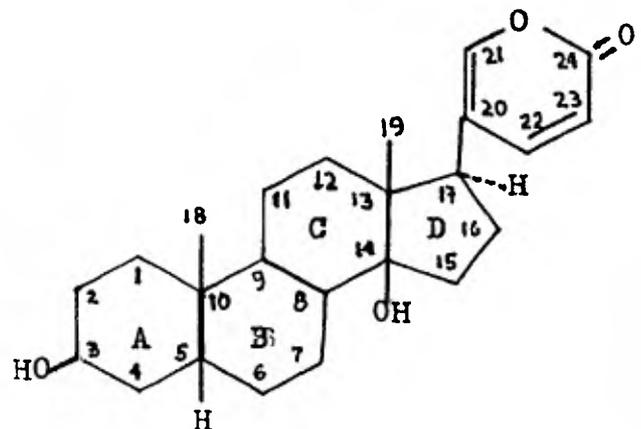
-Cardenólidos

-Bufadienólidos



Cardenólido

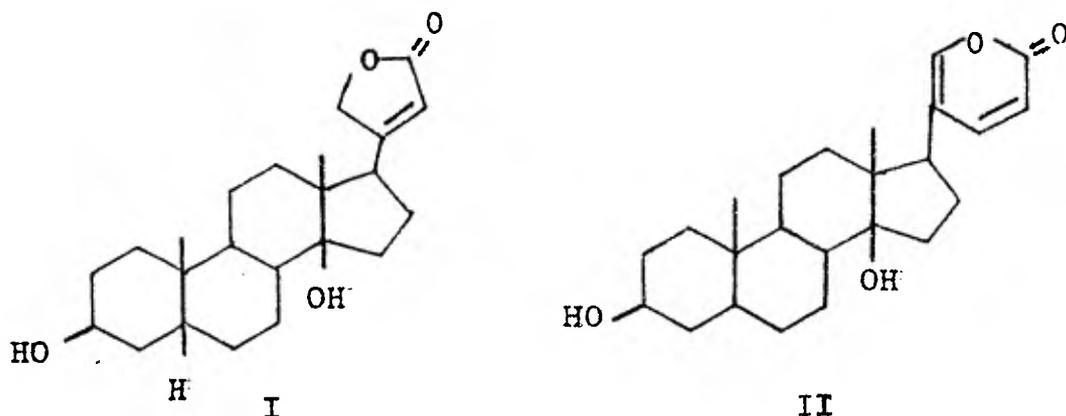
(tipo digitalis )



Bufadienólido

(tipo escilla-bufo )

Las estructuras de la digitoxigenina (I) y de la bufalina, (II) geninas cardiacas, representativas respectivamente de las dos clases mencionadas son:

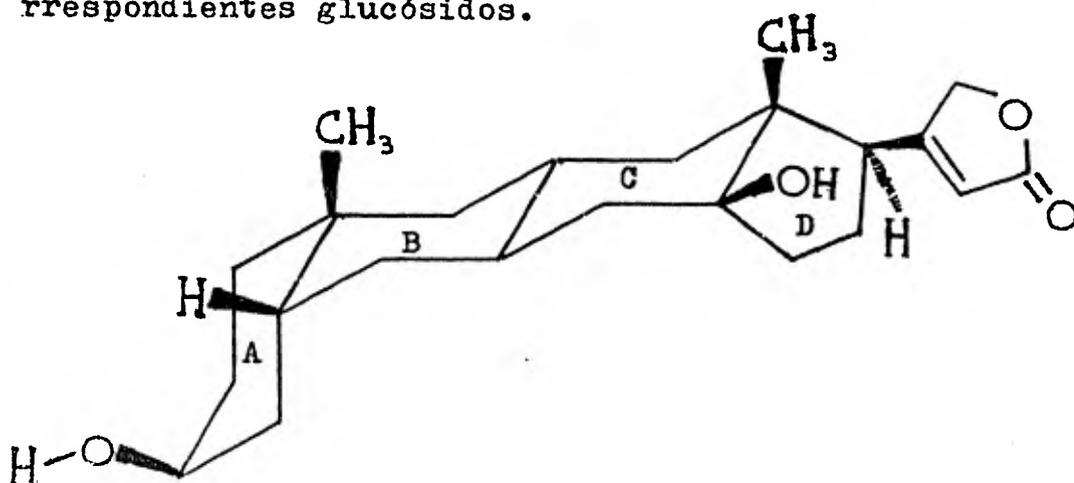


Los glucósidos cardiacos son obtenidos de fuentes naturales. Las hojas de las plantas herbaceas *Digitalis Purpurea* y *Digitalis Lanata* contienen principios cardiacos activos y han sido utilizadas durante muchos años en Europa y Estados Unidos. La *Thevetia neriifolia*, árbol tropical de la familia de las apocináceas producen un fruto llamado nuez malaya, cuya semilla contiene un alto porcentaje de glucósidos cardioactivos.

En la República Mexicana existen distribuidas en 22 estados del territorio nacional 5 especies del genero *Thevetia*, por lo que el país posee grandes recursos naturales renovables para la obtención de glucósidos cardiotónicos. (2,3)

El primer trabajo en México sobre la utilizacion de semillas del genero *Thevetia*, lo realizaron Cruz y colaboradores en 1977. (4). Sin embargo los estudios clínicos de los glucósidos cardiacos se han venido realizando desde hace ya varios años, en el instituto Nacional de Cardiología.

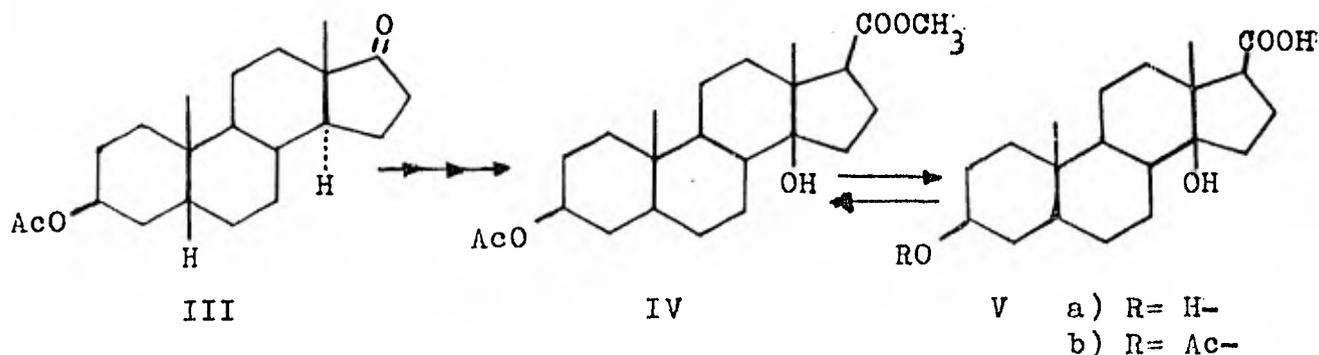
La estereoquímica de los cardenólidos es poco usual y fue descrita por Tamm(5) y Chem(6). Propusieron un esqueleto esteroideal  $14\beta$ -hidroxilado en el cual, los anillos A/B están unidos en configuración cis, B/C en trans y C/D en configuración cis; además, el esteroide contiene una lactona insaturada en posición 17 con orientación  $\beta$  y un grupo funcional oxigenado en orientación  $3\beta$  (grupo -OH o unión glucosídica), Tamm asume que los grupos hidroxilados adicionales son de menor importancia para el efecto cardíaco; considera que la distancia entre el carbonilo de la lactona y la función oxígeno en C-3 es un valor crítico para su actividad(5,7), esta distancia exactamente definida por los dos polos electronegativos y el esqueleto rígido del esteroide debe estar relacionado con las propiedades del receptor digitálico. Los componentes azucarados que se encuentran en los glucósidos naturales, aunque no tienen actividad cardiotónica, son de gran importancia con respecto a las propiedades farmacocinéticas de los esteroides cardiotónicos(7). Los compuestos libres del azúcar (geninas) si tienen actividad cardiotónica. Las geninas con una lactona de 5 miembros en contraste con las que contienen una lactona de 6 miembros, son de menos activas que sus correspondientes glucósidos.

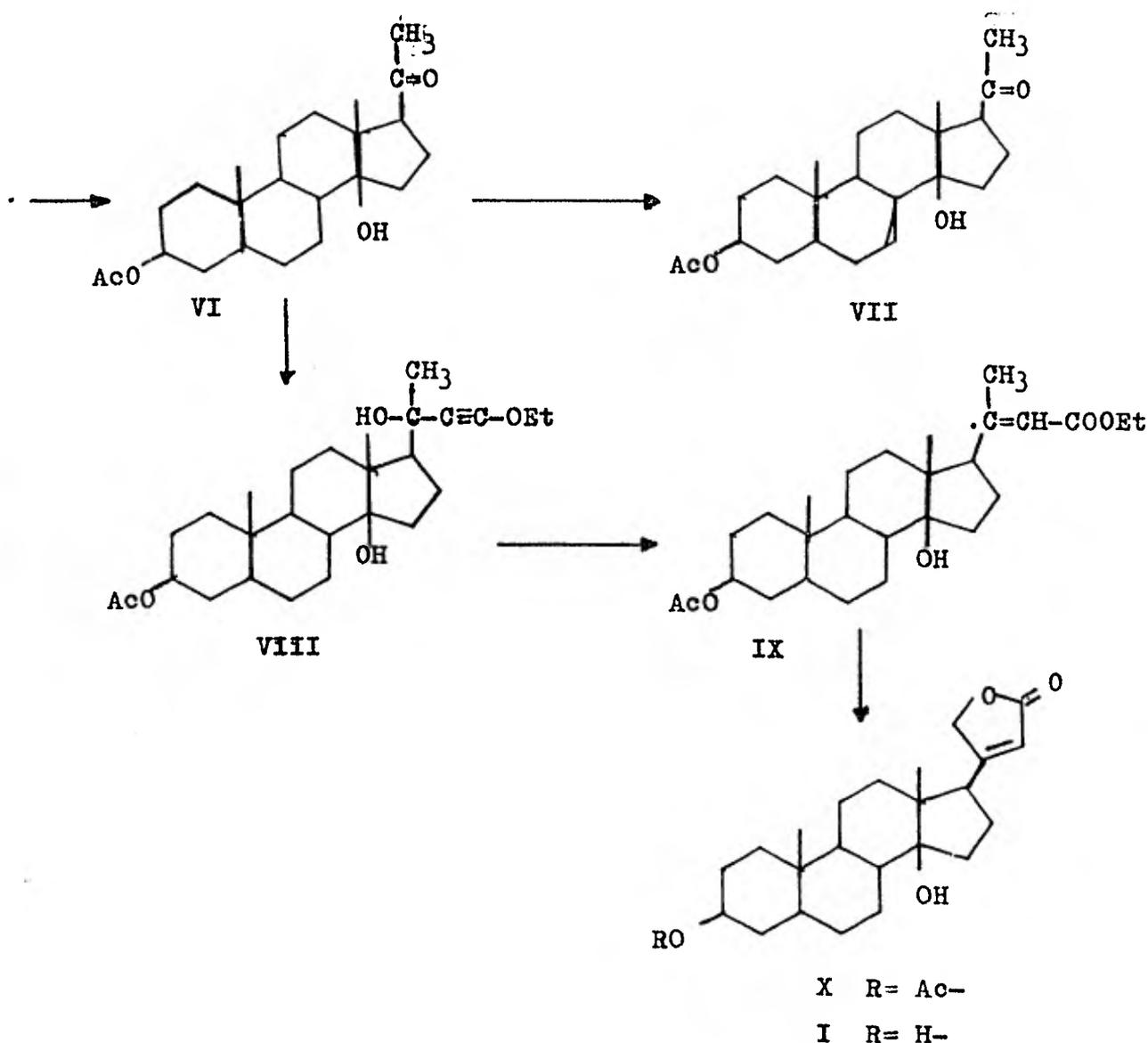


### Desarrollo de métodos sintéticos

Las dificultades presentadas en la química de esteroides cardiotónicos es demostrada por la considerable cantidad de trabajos publicados durante muchos años con el objeto de la síntesis total de cardenólidos. En la década de los cuarenta, Ruzika, Plattner y Elderfield y colegas realizaron una intensa investigación para encontrar métodos eficientes para la síntesis del anillo 17 $\beta$ -butenólido y la introducción de un grupo 14 $\beta$ -hidroxilo dentro de esteroides modelos. Pero fallaron en el intento de introducir estos dos grupos funcionales a esteroides con configuración cis en la unión de los anillos C/D. El control estereoquímico en la posición 17 no fue logrado o las condiciones de reacción eran muy drásticas para conservar el alcohol terciario en la posición 14 $\beta$  (8). Sin embargo, estos trabajos sirvieron de base para que en 1962, Danieli Mazur y Sondheimer(9) anunciaran la síntesis total de la digitoxigenina(I), la primera síntesis total de un cardenólido(Esq. 1).

Esta síntesis incluye nueve pasos y el material de partida es la 3 $\beta$ -acetoxi-5 $\beta$ -androstan-17 $\alpha$ -ona(III).

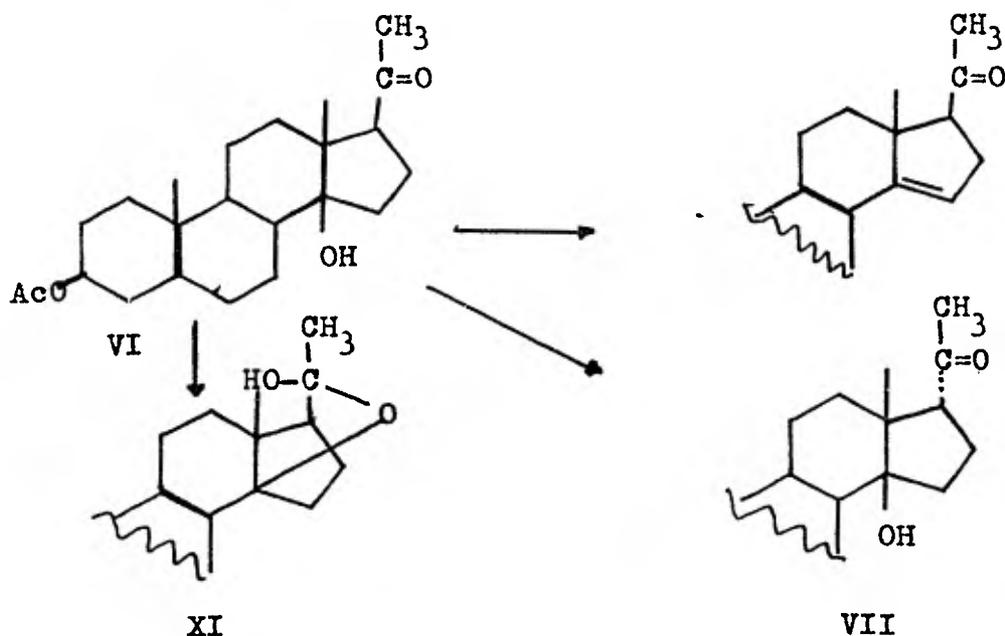




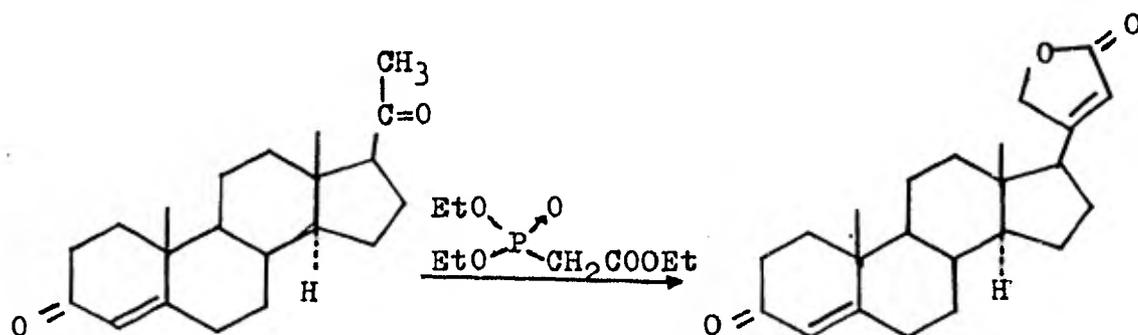
Esq. 1

Esta elegante e importante síntesis presenta la dificultad para obtener el 14 $\beta$ -hidroxi-20-oxoesteroide(VI) con un rendimiento atractivo, además esta sustancia es rápidamente deshidratada con ácidos para dar el correspondiente  $\Delta^{14}$  compuesto. La cadena lateral en 17 $\beta$  del 14 $\beta$ -hidroxiesteroide tiene una configuración termodinámicamente inestable y la conversión al isómero 17 $\alpha$  más estable ocurre si es posible. La in-

teracción entre el  $14\beta$ -hidróxilo y la cadena lateral en  $17\beta$  da lugar a un hemiacetal, relativamente no reactivo(XV).

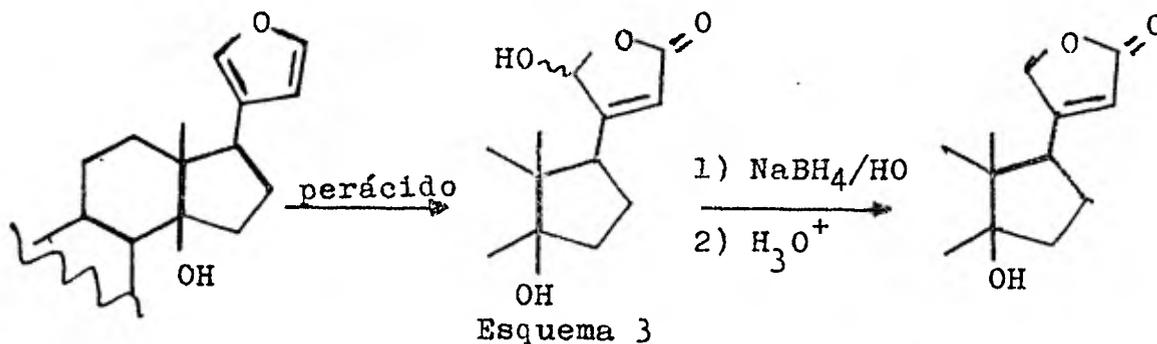


En años posteriores a la síntesis de sondheimer se publicaron nuevos y eficientes métodos para la síntesis del anillo butenólido. En 1966 se dieron a conocer dos métodos, uno por Ruschig y colaboradores(10) utilizando un reactivo de Wittig(Esq.2)

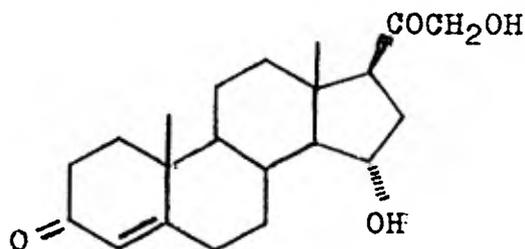


Esquema 2

El segundo de Deghengi y colaboradores(11) por una oxidación de un intermediario furano, seguida por una reducción (Esq.3).



Otras síntesis de la genina digitoxigenina han sido publicadas(12,13). Fritsh y col. sintetizaron digitoxigenina - a partir de 15 $\alpha$ -hidrocortisona(14).



En 1974 Kruger(15) comunicó la síntesis de 3 $\beta$ , 14 $\beta$ -19-oxigenados y de 3 $\beta$ -19-oxigenados -14,15-dehidrocardenólidos de acetato de pregnenolona. Además, Martelli(16) preparó el 3-acetato de 6 $\alpha$ -metildigitoxigenina de 21-hidroxi-preg-4-eno-3,20-diona en 18 pasos que presentó una actividad cardíaca equivalente al 3-acetato de digitoxigenina( prueba efectuada en corazón de cayo).

Modificaciones estructurales de geninas cardiotónicas.

El mayor énfasis en esta sección se centra en la química de nuevos compuestos sintetizados con acción similar a los digitalis, también se hace referencia a los efectos biológicos en donde la información fue disponible o fueron efectos significativos. En muchos casos los datos biológicos no fueron proporcionados o como en el caso de los compuestos recopilados en la sección de patentes del Chemical Abstracts no son fácilmente obtenibles.

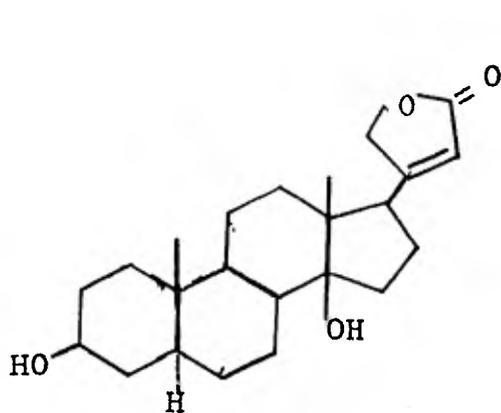
Hidroxilo 3 $\beta$ .- Sayto(17) sintetizó 3-desoxidigitoxigenina que mostró en corazón aislado de rana (preparación de Straub) una actividad similar a la que presenta la digitoxigenina, además Zürcher(18) demostró que en la prueba de la ATPasa, este derivado pierde solamente 50% de actividad; más tarde Witty (19) confirmó estos resultados, sin embargo, mostró que la hidrogenación de la lactona en 3-desoxidigitoxigenina conduce a una mayor pérdida de actividad (prueba de ATPasa) que la asociada con la dihidrodigitoxigenina, obtenida a partir de digitoxigenina. Esta es una tendencia observada en todas las pruebas realizadas en los compuestos 3-desoxi-. Por otro lado, un cambio en la configuración de C-3 del cardenólido, digitoxigenina disminuye el efecto en la prueba de la ATPasa a alrededor de 1/30 de la actividad de la digitoxigenina(19). El correspondiente bufadienólido 3 $\alpha$ -bufalina mostró 1/7 de la actividad tóxica de la bufalina(II) (prueba de Hatcher)(20).

Union de los anillos A/B .- Los anillos A/B en glucósidos naturales muestran una configuración cis. Un cambio de configuración en C-5 produce compuestos 10 veces menos potentes que sus originales. La pérdida de actividad (prueba

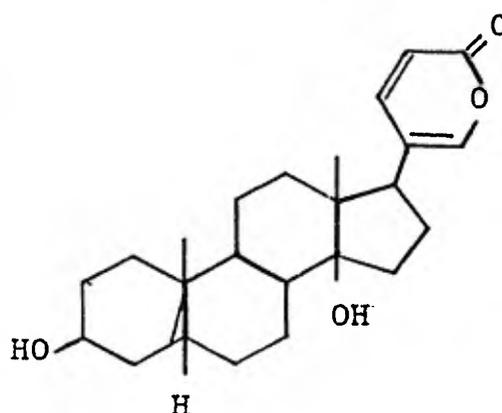
en corazón de rana) en los cardenólidos, viene a ser menos pronunciada que la mostrada por los bufadienólidos, sin embargo, para estos se utilizó la prueba de Hatcher(21).

Los conocimientos que se tienen sobre el efecto de un doble enlace en C-4 y C-5 o C-5 y C-6 en la función inotrópica y tóxica en los cardenólidos son aún muy pobres; la xismalagenina( $\Delta^5$ -cardenólido) tiene únicamente actividad cardiotóxica(solamente se utilizó la prueba de Hatcher)(22).

Anillos C/D .- Al igual que el hidróxilo en C-3 , el grupo hidróxilo en C-14 no es indispensable para la actividad cardiotónica, pero su substitución por  $14\beta$ -hidrógeno es acompañada por una considerable pérdida de actividad;  $14$ -desoxi- $14\beta$ -H-uzarigenina y la  $14$ -desoxi- $14\beta$ -digitoxigenina(23) mostraron en corazón aislado de rana  $1/3$  de actividad de uzarigenina(XII) y alrededor de  $1/10$  de actividad de digitoxigenina respectivamente. La actividad biológica de la  $14\beta$ -arte-bufogenina(XIII) también fue evaluada(sin embargo, solo se utilizó la prueba de Hatcher)(24).



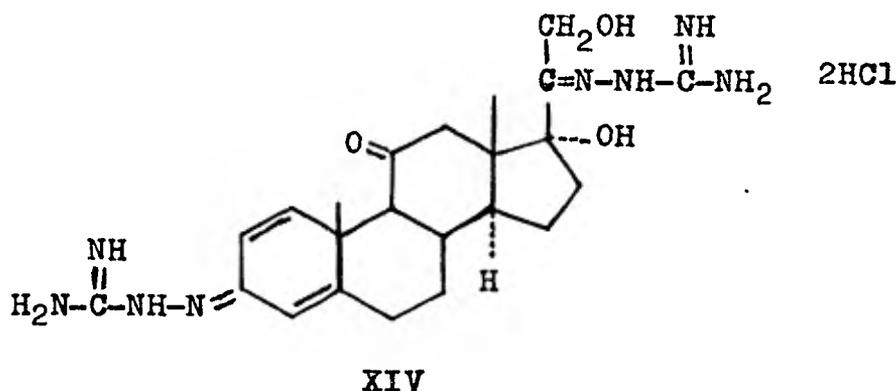
XII



XIII

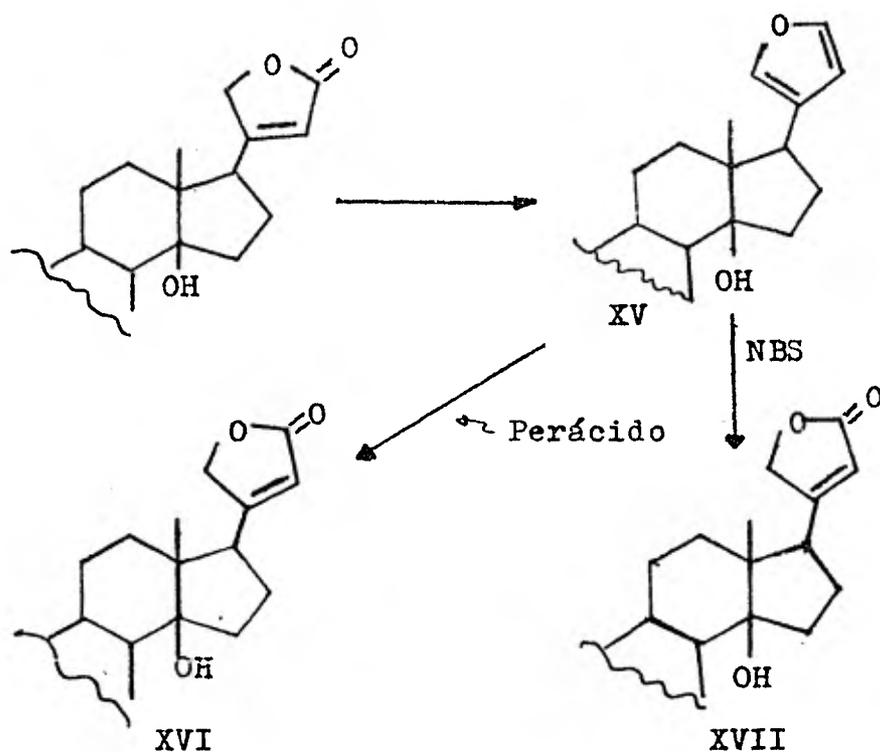
Más importante que el grupo  $14$ -hidróxilo es la configuración  $cis/\beta$  de los anillos C/D; los  $14\alpha$ -compuestos son totalmente inefectivos. La  $14$ -epi-digitoxigenina(prueba de

ATPasa)(18) y la 14 $\alpha$ -artebufogenina(prueba de Hatcher)(24) son inactivos en contraste con los correspondientes  $\beta$ -análogos. El principio de que una configuración trans del anillo C/D es acompañada por una pérdida de actividad no presenta excepción en ningún glucósido cardiaco(18,20). Pero la prednisona sintética (XIV) y su derivado prednisolona, con muchísimos efectos similares a los digitalis, son biológicamente activos a pesar de su 14 $\alpha$ -H(pruebas en corazón, aurícula aislada de cuyo y corazón de cuyo)(25).



Cadena lateral. La lactona es comunmente considerada como el grupo funcional indispensable de los glucósidos - cardiotónicos. Es necesario que esta lactona esté en orientación  $\beta$ , un cambio de configuración produce compuestos - inactivos(5,7,17). Se han investigado algunos métodos de - sustitución de la lactona con otros anillos heteroisóste-- ros(26). Existen varias rutas para convertir el anillo butenólido de la genina a un furano unido en la posi--- ción 3 al carbono 17 del esteroide (27)(XV), por ejemplo, la reducción del 3-acetato de la digitoxigenina con hidruro de diisobutilamonio da el corres -----

pendiente derivado  $17\beta$ -(3-furil)(XV) tal compuesto puede ser oxidado por diferentes caminos para dar el derivado 21-hidroxi- del cardenólido de partida o un cardenólido isómero(XVII).

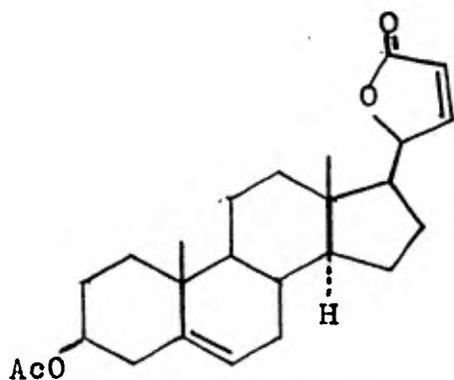


El último compuesto es de particular interés porque difiere de los cardenólidos naturales solamente en la posición de unión del anillo butenólido a la posición  $17\beta$  del anillo esteroideal.

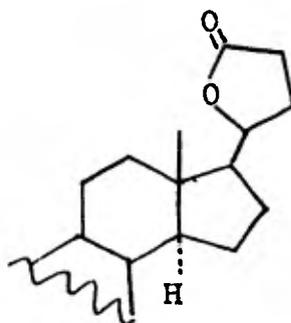
Algunos  $17\beta$ -(3-furil) esteroides derivados de cardenólidos naturales han sido preparados para su evaluación farmacológica. Minesita y col. (28) publicaron que los  $17\beta$ -(3-furil) esteroides tal como (XV) tienen una actividad cardiotónica semejante a la de los cardenólidos. Esto hizo concluir a los autores que la lactona insaturada no es indispensable para la actividad fisiológica y puede ser sustituida por un ani-

llo de un heteroátomo isóster. Igualmente muchos cardenólidos isómeros han sido preparados por oxidación de 17-furil esteroides. Deghengi(29) demostró que un cardenólido isómero tal como(XVII) también es activo y posee un índice terapéutico más favorable que los cardenólidos naturales. Con esta información se aclaró la influencia de la modificación estructural del anillo butenólido en el efecto farmacológico. Mendez y col. (30) notifican en experimentos con la misma sustancia, que la diferencia entre una dosis mínima terapéutica y una dosis arritmogénica o letal es más favorable que en glucósidos con una lactona normal.

Pettit(31) describe otro cardenólido isómero(XVIII) - en el cual el anillo de la lactona es substituido en el carbon  $\gamma$  en lugar del  $\beta$  o  $\alpha$  establecido respectivamente: en los cardenólidos naturales o en el cardenólido isómero antes descrito(XVII).



XVIII

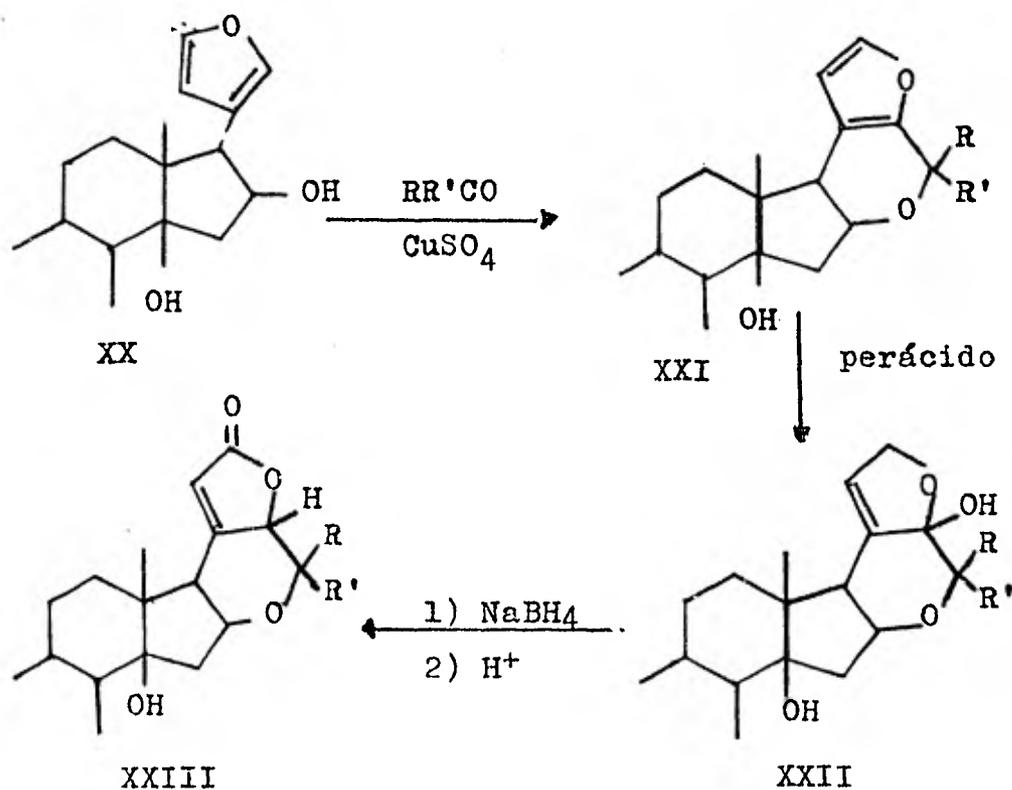


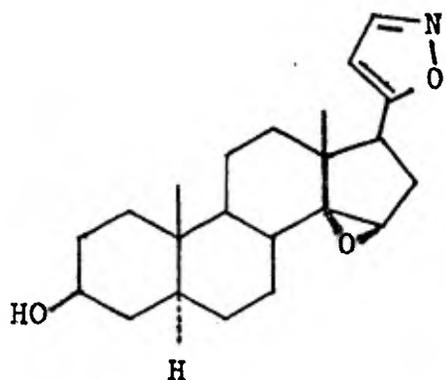
XIX

El compuesto(XVIII) y su análogo butenólido(XIX) también difieren de la serie natural, en que ellos carecen del grupo hidróxilo en C-14 y que la unión entre los anillos C/D está en una configuración trans. Estos compuestos fueron biológicamente inactivos.

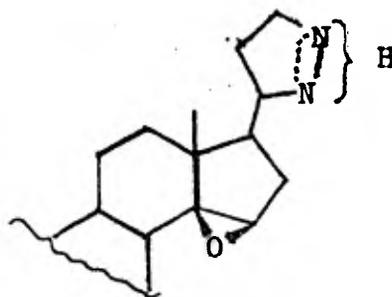
Investigaciones adicionales de los  $17\beta$ -fural esteroides (32) muestran que los  $17\beta$ -(3-fural), derivados de los  $16\beta$ -hidroxi-cardenólidos (XX) sufren una rara condensación con compuestos carbonilo en presencia de sulfato de cobre o ácido  $p$ -toluensulfónico para formar el derivado bicíclico (XXI). La oxidación de (XXI) con perácido, da el lactol (XXII); el cual por reducción con borohidruro de sodio da el biciclo (XXIII). No se publicó la actividad biológica de estos compuestos.

Nambara y col. (33) comunicaron la preparación de  $17\beta$ -(5-isoxazolil) y  $17\beta$ -(3-pirazolil) derivados de  $14\beta$  y  $15\beta$ -oxidoesteroides (XXIV y XXV respectivamente) como posibles compuestos cardenólidos. En cada caso la lactona del cardenólido original es reemplazado con un heteroátomo isótero.





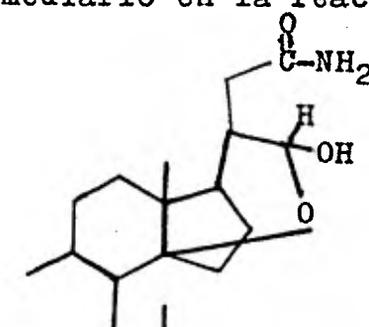
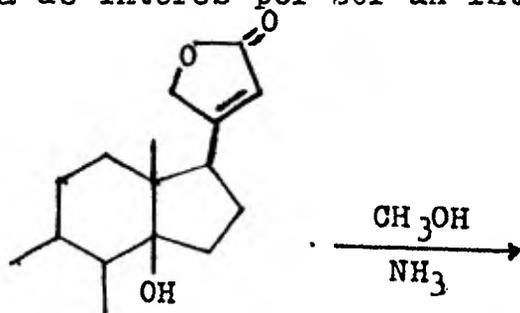
XXIV



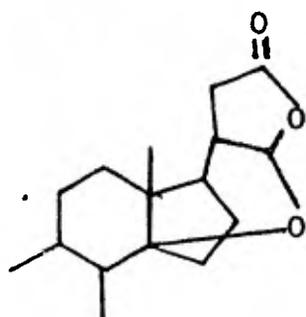
XXV

Estos compuestos poseen la configuración  $14\alpha, 17\beta$  indispensable para la actividad fisiológica en los cardenólidos naturales.

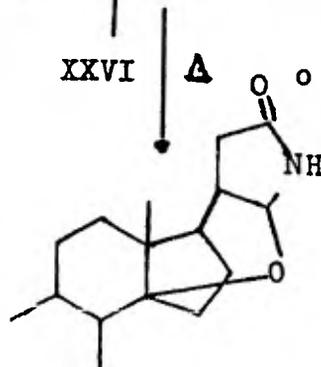
Se ha descrito(34), una lactama(XXVII) análoga de la isó digitoxigenina obtenida por amonfolisis de la digitoxigenina en solución metanólica para dar la lactol amida(XXVI), la que calentada a  $200^{\circ}\text{C}$  o por tratamiento con ácido, se cicla para dar la lactama (XXVII). La isodigitoxigenina es considerada de interes por ser un intermediario en la reacción.



XXVI  $\Delta$   $\text{H}^+$



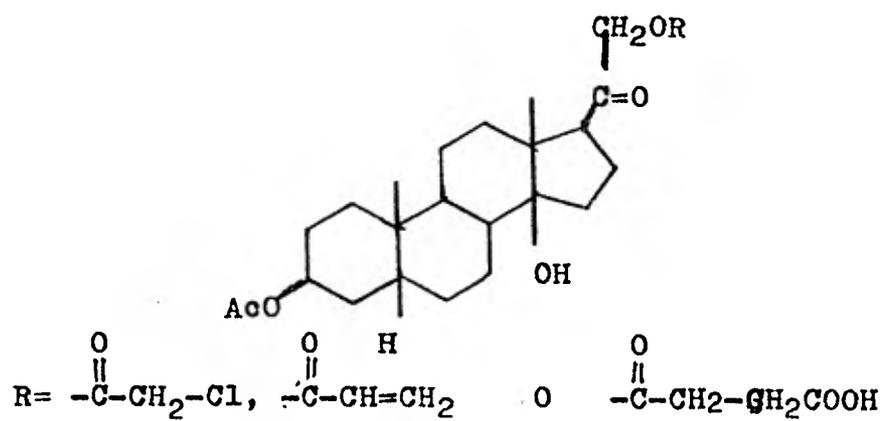
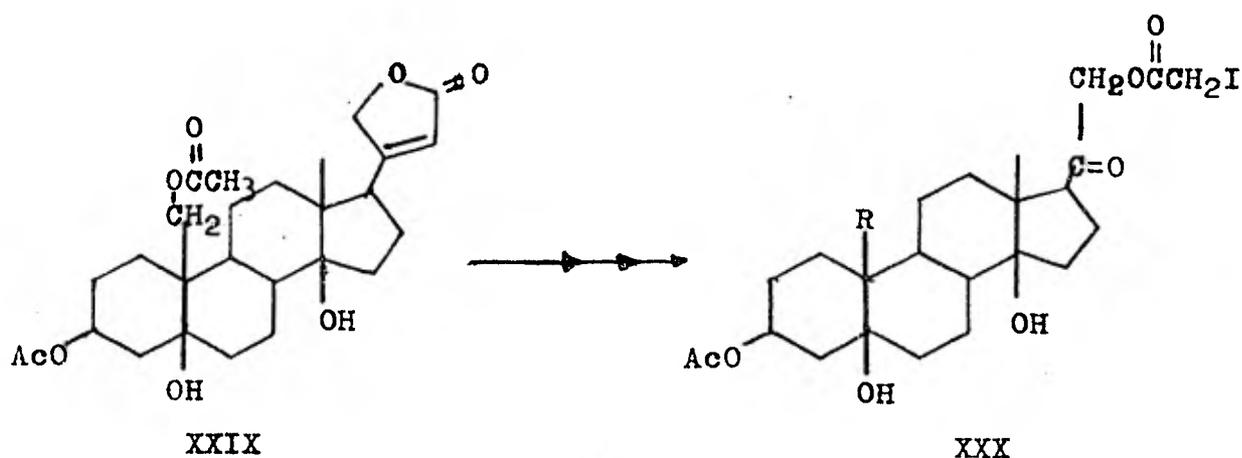
XVIII



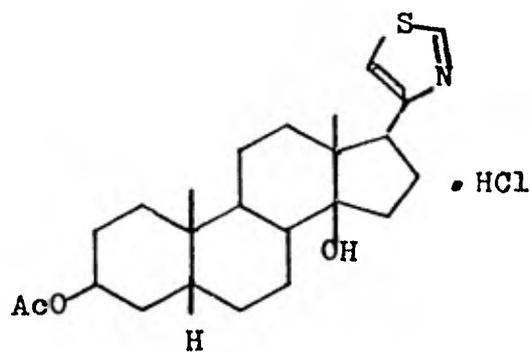
XXVII

Se examinó la influencia de la lactama (XXVII) en la respuesta fisiológica de los cardenólidos activos en tres diferentes sistemas biológicos. Aunque la lactama no tiene actividad cardiotónica, inhibe la respuesta inotrópica de la acetildigitoxigenina en aurícula aislada de cuyo. Sin embargo, los efectos de acetildigitoxigenina en la prueba de toxicidad en gato o en  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$  no son alterados por la lactama. Esto sugiere que la lactama puede inhibir el mecanismo responsable para el transporte del cardiotónico a través de la membrana celular y entonces incrementa el tiempo requerido para que el cardenólido llegue a una concentración óptima en el receptor inotrópico. El análisis de la acetil-isodigitoxigenina (XXVIII) revela que este compuesto también inhibe la respuesta inotrópica positiva en aurícula de cuyo, para los cardenólidos. Compuestos de esta naturaleza pueden ser útiles para descubrir el modo de acción de los cardenólidos.

Estudios adicionales (35) relativos a la lactona en la actividad biológica de los glucósidos cardiacos pusieron al descubierto que el 20-oxo-21-iodoacetato (XXX) derivado de la degradación de diacetato de estrofantidol (XXIX), mostró actividad cardiaca en pruebas con gatos. La actividad de estos compuestos se interpretó originalmente como un efecto cardiotónico resultante de las propiedades alquilantes del grupo iodoacetato. Este descubrimiento abrió el campo para la síntesis de compuestos relacionados con (XXX y XXXI) (36), en los cuales el anillo butenólido de estrofantidol y digitoxigenina es reemplazado por grupos funcionales capaces de reaccionar con grupos sulfhidrilo.



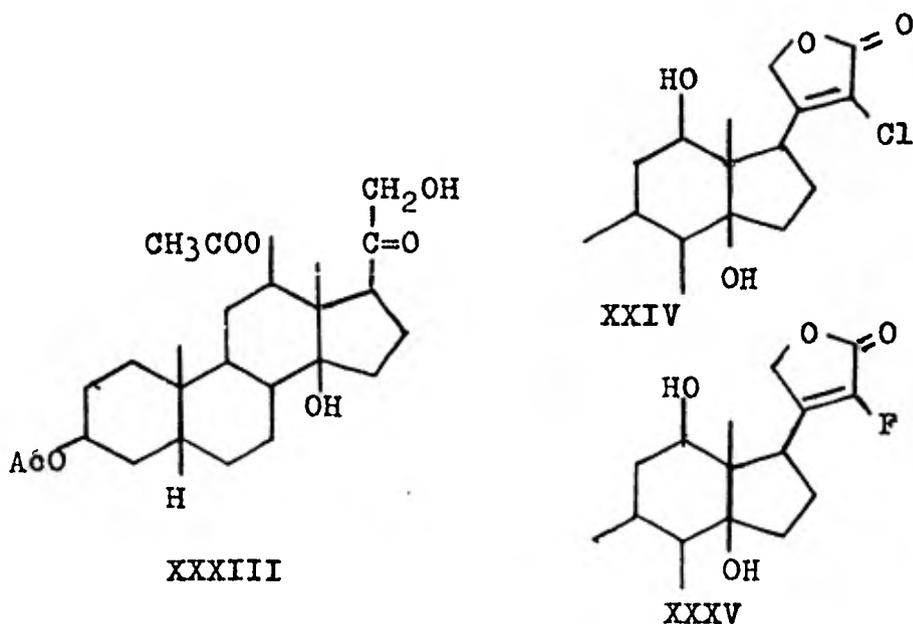
XXXI



XXXII

También se preparó una serie de compuestos  $17\alpha$  con otra serie de esteroides con los mismo grupos alquilantes. Pruebas en aurícula aisladas de conejo mostraron que todos los compuestos preparados carecen de actividad cardiotónica. Esto llevo a la conclusión de que la actividad cardíaca observada, cuando se probó en gatos, era una acción cardiotóxica sin relación con un efecto cardiotónico. Esto hace notar los cuidados que se deben tener al interpretar los datos biológicos de nuevos compuestos.

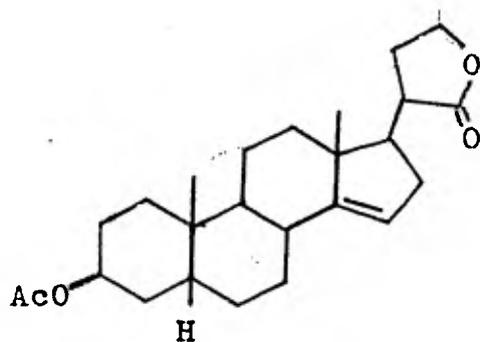
Se publicó(37,38) la introducción de un sustituyente halogeno, alquilo y alcoxi dentro de la posición 22 de la lactona. Estos compuestos se prepararon por la condensación de derivados fosforados de 21-hidroxi-5 $\beta$ -preg-20-ona(XXXIII).



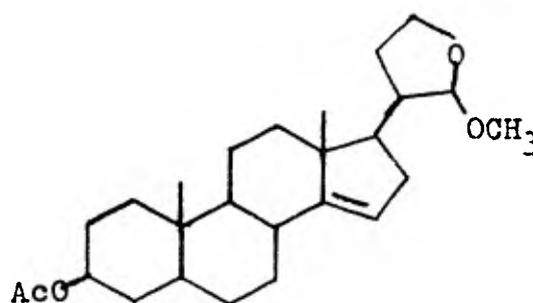
Los autores se refieren a la actividad biológica de estos compuestos considerando que el efecto inotrópico positivo se ve incrementado por la introducción de un grupo fluo-

ruro y disminuye por la sustitución con un grupo metoxilo - (aurícula aislada de cuyo).

Los cardenólidos isómeros(XXXVI y XXXVII) se consideran inhibidores debiles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ATPasa y  $\text{Mg}^{2+}$ ATPasa (39).

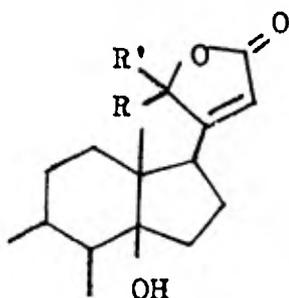


XXXVI



XXXVII

También Dittrich y colaboradores (40 ) sintetizaron un conjunto de 21-substituidos digitoxigeninas, digitoxinas y - digoxinas.

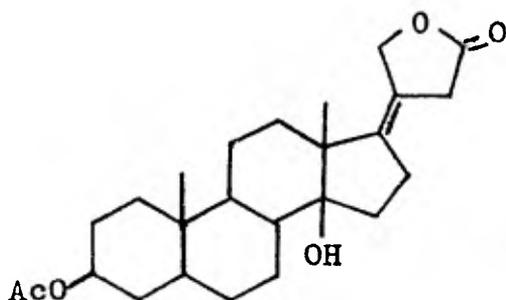


$\text{R}' = \text{MeO}-$  ,  $\text{EtO}-$

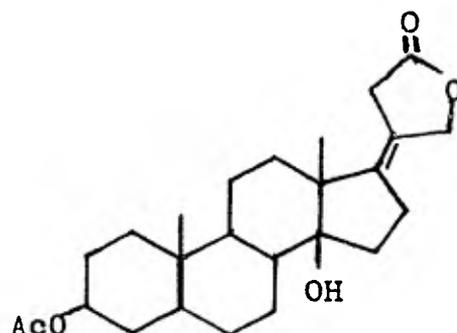
$\text{R} = \text{H}-$  ,  $\text{Me}-$

Todos los compuestos sintetizados tuvieron efecto inotr<sub>6</sub> pico positivo.

La reducción de 3-acetato -16-anhidrodigitoxigenina con un sistema de borohidruro de sodio-cloruro-metal de transición produce los compuestos (XXXVIII y XXXIX)(41). No se informó sobre la actividad farmacológica de estos compuestos.



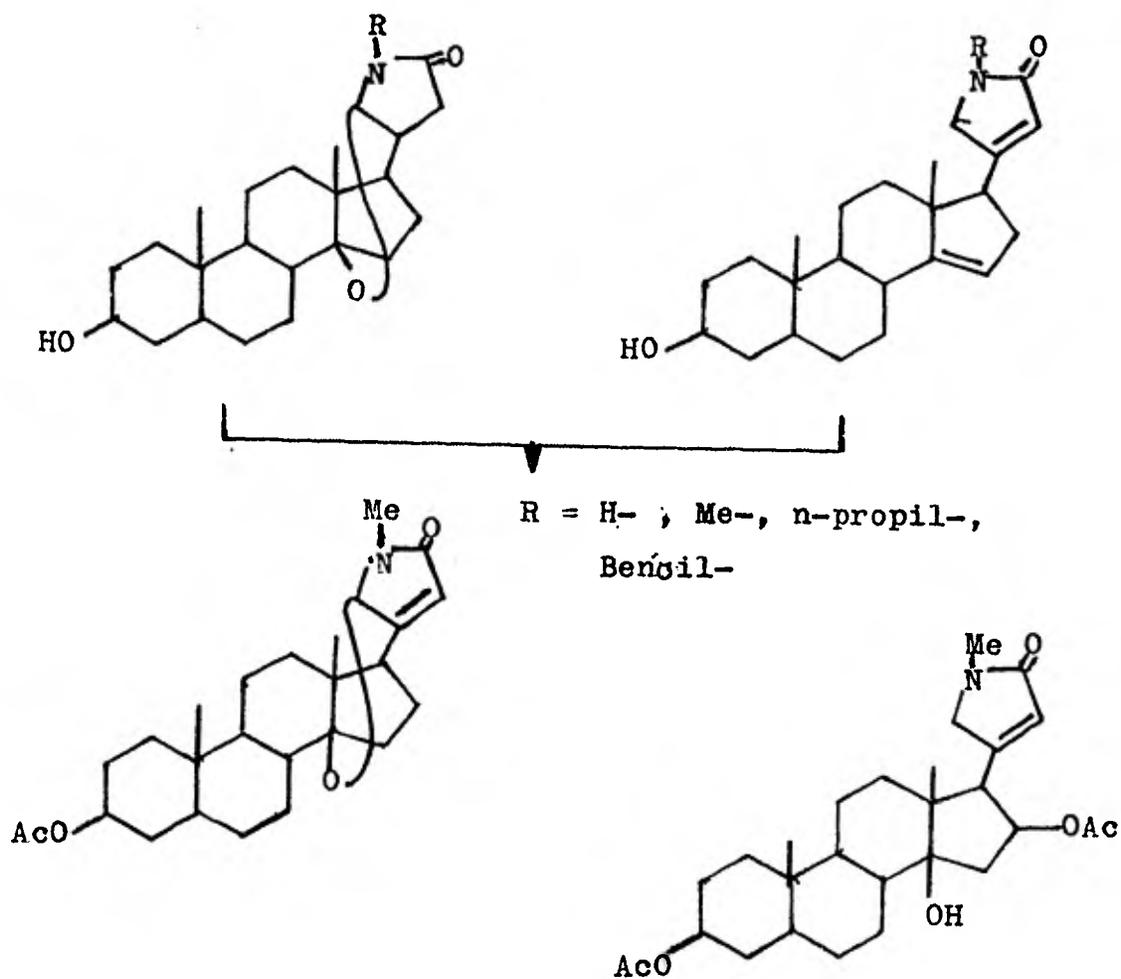
XXXVIII



XXXIX

Fullerton y col.(42) prepararon a partir de digitoxigenina, los isómeros 22-metilen-3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ ,20(R)-car-14-enólido y el 20(S). El isómero 20(R) es alrededor de dos veces más activo en la inhibición Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPasa que la 14-dehidrodigitoxigenina y el isómero 20(S) es más o menos 50 veces menos activo.

Recientemente fueron preparados varios compuestos lactama análogos de la digitoxigenina(43)(Esq. 4). Las propiedades farmacológicas de las cardenamidas sintetizadas fueron caracterizadas en corazón de cuyo; estos compuestos presentaron la decima parte en la inhibición del transporte de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPasa, en relación a los cardenólidos análogos. Sin embargo, estas cardenamidas presentan poco efecto inotrópico positivo. Los substituyentes N-metilo y/o la ausencia del 14 $\beta$ -hidróxilo no tiene una gran influencia en la actividad biológica de la cardenamida, de modo que (segun los autores) este resultado indica que es indispensable el anillo oxigenado en el cardenólido para un efecto inotrópico.



Esq. 4

Reemplazamiento de la lactona por estructuras de cadena abierta

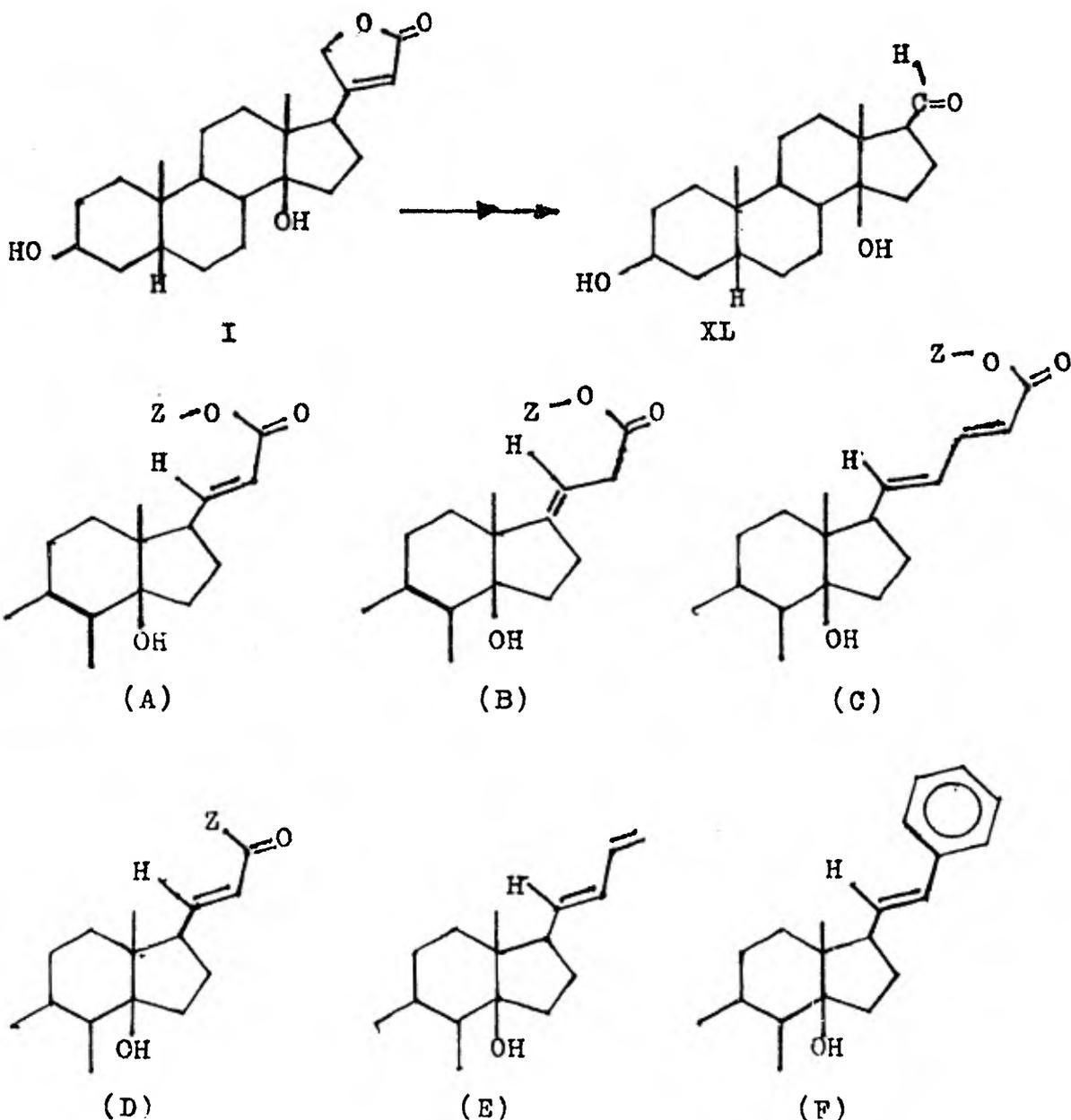
Como parte de un estudio general en el modo de acción de los esteroides cardiotónicos Boutagy y Thomas reemplazaron la lactona de la digitoxigenina(44,45) con una serie de estructuras de cadena abierta . El proposito de este estudio era definir la relación estructura actividad para generar una serie de nuevos compuestos con posible valor como agentes terapéuticos.

En el esquema 5 se muestra el plan general de la serie de compuestos sintetizados. La digitoxigenina(I) se convirtió primero al 17 $\beta$ -formilesteroides(XL), el cual es el intermediario clave para esa serie de compuestos. Este intermediario es entonces condensado con un grupo de reactivos fosforados o con varios derivados de la hidracina, tal como la guanilhidracina, para dar los compuestos requeridos. Los cambios realizados son enumerados en seguida:

- 1.- Reemplazamiento de la lactona por un éster o ácido trans  $\alpha,\beta$  insaturado(grupo A)
- 2.- Supresión de la conjugación del grupo carbonilo (B).
- 3.- Extensión de la conjugación del grupo carbonilo y expansión de la distancia entre el oxígeno del carbonilo y el anillo D (grupo C).
- 4.- El papel del oxígeno éster del grupo A se estudio por reemplazamiento del grupo alcoxi, con un grupo alquilo o arilo o un grupo con nitrógeno(D).
- 5.- Tanto el oxígeno éster como el grupo carbonilo fueron reemplazados por otro grupo con alta densidad electrónica, tal como;  $\text{C}=\text{C}$  (E), arilo (F) o  $-\text{C}\equiv\text{N}$  (G).

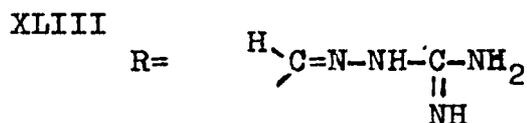
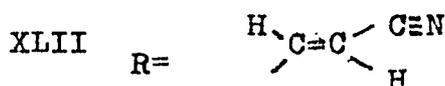
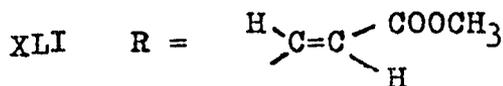
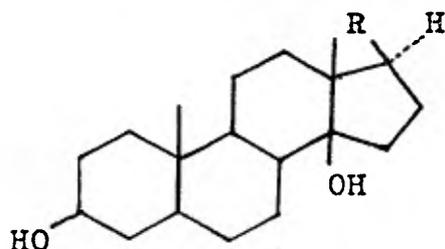
6.- El 6-20 fue unido directamente a un heteroátomo, por ejemplo, para la preparación de hidrazonas y derivados (H)

7.- La importancia de la configuración 17 $\beta$  fue estudiada por la preparación de una serie de compuestos similares con configuración 17 $\alpha$  (I).





sariamente un heteroátomo(=O, ≡N), R' y R'' usualmente un H-  
o un grupo alcoholilo.

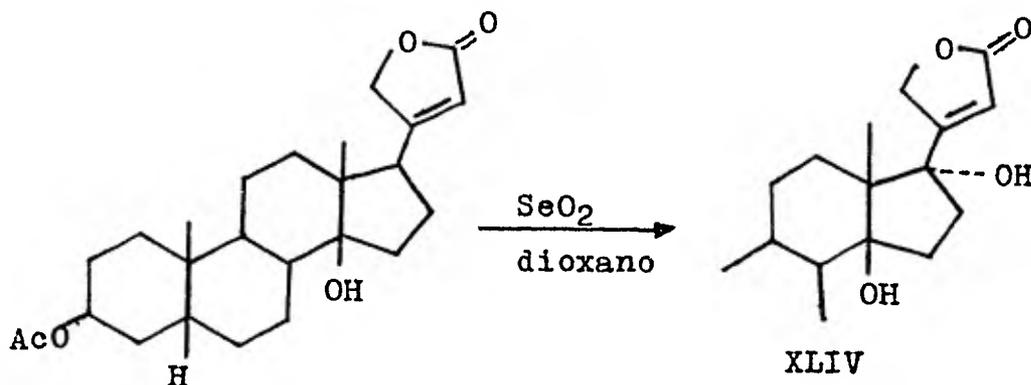


Ebelein y ool. (46) sustituyen también el anillo butenó-  
lido de glucósidos y agliconas 14β-hidroxi-C/D-cis-esteroida-  
les por cadenas laterales abiertas y obtienen resultados si-  
milares . Los ésteres del ácido acrílico y los nitrilos mues-  
tran, en vivo efectos cardioglucosídicos típicos(aurícula -  
aislada de cuyo, perro y gato) y in vitro(inhibición de -  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPasa en eritrocitos humanos).

### Introducción y modificación de otros grupos funcionales

La introducción de varios sustituyentes dentro del núcleo esteroidal y la modificación de los centros moleculares asociados con actividad cardiaca ha producido un gran número de nuevos compuestos, algunos de los cuales van ha ser discutidos en esta sección.

Danieli y col.(47) describen la síntesis de un 17 -hidroxicardenólido(XLIV) por oxidación del 3-acetato de la digitoxigenina con dióxido de selenio(Esq. 6). El 17 -hidroxilo no mostró una gran influencia en la actividad cardiotónica de la digitoxigenina, aunque la inversión de los dos sustituyentes en C-17 suprime la actividad.

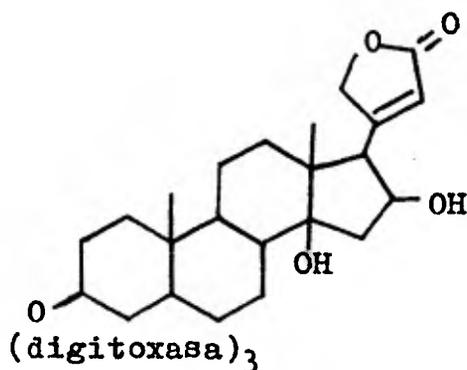


Esquema 6

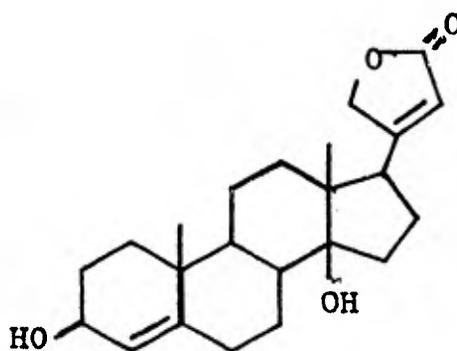
Las consecuencias biológicas de la inversión del grupo hidróxilo en el carbono C-16 de la gitoxina(XLV) para producir 16-epigitoxina han sido ya estudiadas y comparadas con la gitoxina y ouabaina, el compuesto epi muestra una gran diferencia entre dosis, produciendo un efecto inotrópico - mínimo y máximo (48). Con 16-epigitoxina y con 16-acetal-16 epigitoxina (49) se registro una separación parcial(por lo menos en corazón de cuyo) de los efectos terapéuticos y tóxicos. Estos compuestos tienen un efecto marcado sobre el -

músculo ventricular y menor en el auricular y en el sistema de Purkinje, este último considerado por ser el origen de muchos efectos tóxicos de digitalis(50).

El cloro fue introducido en diferentes posiciones del núcleo esteroidal. Así se obtuvieron algunos compuestos activos. Sin embargo, ninguno de ellos superó las cualidades farmacológicas de los glucósidos naturales. Meyer(51) introdujo un átomo de cloro en la posición  $15\alpha$  de la bufalina(II) pero este compuesto no mostró actividad. Stache y colaboradores(52) sustituyeron el hidrógeno en C-4 por un cloro en la canarigenina(XLVI), en 14,15 $\epsilon$ -epóxi-canarigenina y en 14-desoxi-14 $\alpha$ -H-canarigenina. Las pruebas biológicas se realizaron en aurícula izquierda de cuyo, la 4-cloro-canarigenina mostró una actividad cardiotónica más o menos semejante a la de la canarigenina y la 14,15 $\epsilon$ -epoxi-canarigenina carece totalmente de actividad.



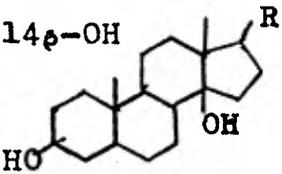
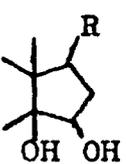
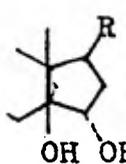
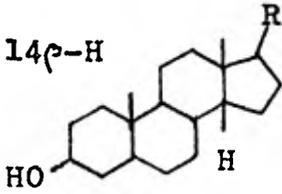
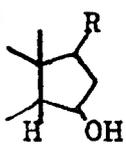
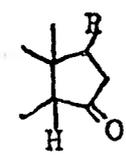
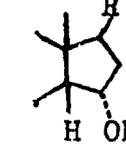
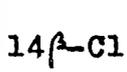
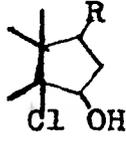
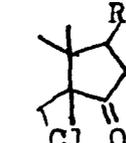
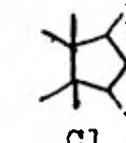
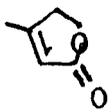
XLV



XLVI

La relación entre la estructura en C-14 y en C-15 y la actividad biológica es aún muy oscura y algunas veces contradictoria. Ya ha sido mencionada la posición obligatoria del hidroxilo en C-14. Experimentos de Shiegi y Okada y col. - (23, 53, 54, 55) muestran que la introducción de una función oxígeno en el C-15 de la digitoxigenina, siempre da

como resultado una disminución de la actividad farmacológica, cuando las pruebas se realizan en corazón de rana (Straub) Se obtuvo el siguiente cuadro de resultados (estándar de digitoxigenina; actividad relativa de 1.0) tabla 1.

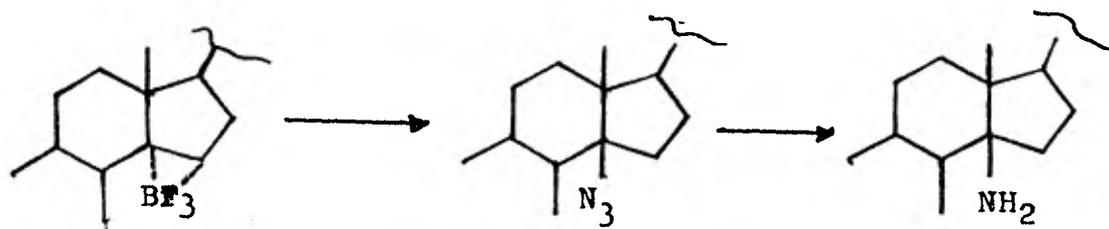
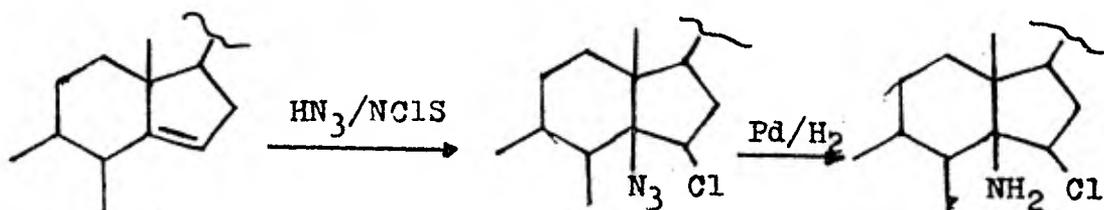
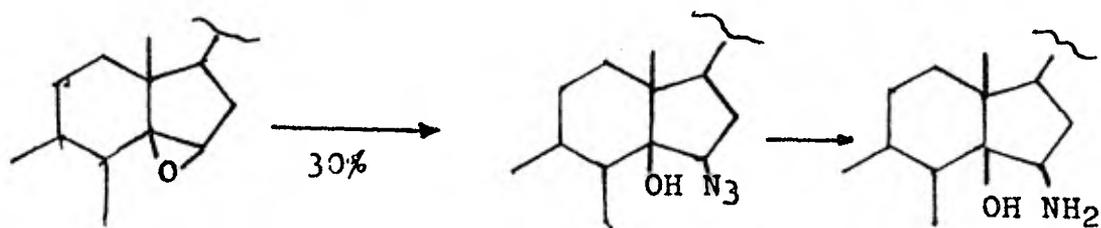
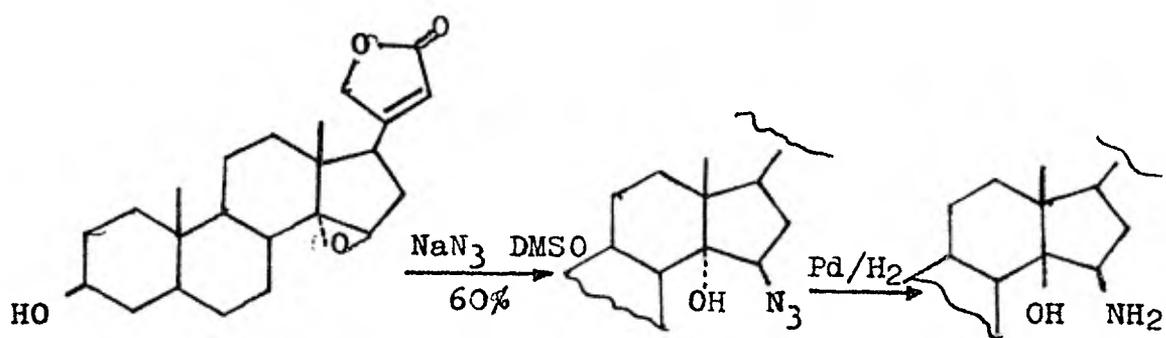
|  | 15 $\beta$ -OH  | 15-OXO  | 15 $\alpha$ -OH   |
|--|---|---|---|
| <p>14<math>\beta</math>-OH</p>    |    |    |    |
| Act. 1.0   | 0.1   | 0.02  | (-)   |
| <p>14<math>\beta</math>-H</p>   |  |  |  |
| (0.04-0.15)  | 0.1   | 0.1-0.3   | (-)   |
| <p>14<math>\beta</math>-Cl</p>  |  |  |  |
| R =                             | (-)   | (-)   | 0.1-0.3   |

En la primera serie;  $14\beta$ -OH es notoria la disminución de la actividad; digitoxigenina (1.0) >  $15\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (0.1) > 15-oxo-digitoxigenina (0.02) >  $15\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (inactiva). En la serie de 14-desoxi- $14\beta$ -H-digitoxigenina; la actividad también decrece, el 15-oxo-derivado retiene de 10-30% de actividad en relación con la digitoxigenina. Sin embargo, este resultado contrasta con los de Henderson y Chem (prueba de Hatcher) (56), quienes encontraron que la 15-oxo-digitoxigenina era inactiva.

Los  $14\beta$ . $15\beta$ -epóxidos son en general menos efectivos que los correspondientes  $14\beta$ -hidroxicompuestos (57). Sin embargo, su actividad es superior porque frecuentemente presentan un índice terapéutico mejor. Por consiguiente, es recomendable una evaluación cuidadosa del índice terapéutico de tales compuestos. Así se podría establecer una medida para reducir los riesgos en la terapia con glucósidos cardiacos.

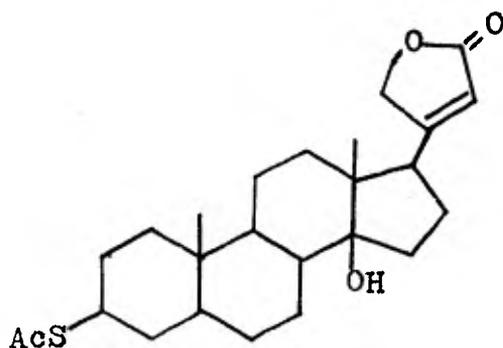
N-análogos. Se desarrollaron varios N-análogos de cardenólidos activos con posibles propiedades farmacológicas. Estos compuestos son  $3\alpha$  y  $3\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina, 3-amino, 3-amino-3-desoxi-derivados de uzarigenina, oleandrigenina, gitoxigenina y digoxigenina los que fueron preparados por Meyer (58, 59). Estos derivados tuvieron actividad inotrópica positiva en el músculo del corazón de gatos y cuyo.

Schmidt y colaboradores prepararon recientemente (60) derivados de los cardenólidos 14 y 15 N-análogos. Estos nuevos compuestos se obtuvieron a partir de  $14\beta$ - $15\beta$  y  $14\alpha$ - $15\alpha$ -epoxicardenólidos y 14-desoxi-cardenólidos (Esg. 7).



En las pruebas bioquímicas estos compuestos mostraron, una inhibición a la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPasa. En relación con la actividad cardiotónica fueron 20 veces menos activos en comparación con el 3-acetato de digitoxigenina. Los 14 $\alpha$ -hidroxycar<sup>u</sup>denóidos no mostraron ninguna actividad.

También se ha iniciado la síntesis de derivados sulfonados análogos a la digitoxigenina. Huang y col.(61) informaron del tioacetato de digitoxigenina(XLVII). Las propiedades tóxicas de este tioacetato no fueron diferentes significativamente de las de la digitoxigenina, las pruebas se realizaron en corazón de rana o de cuyo. Sin embargo, en ratas intactas fue menos tóxico que el 3-acetato de digitoxigenina.

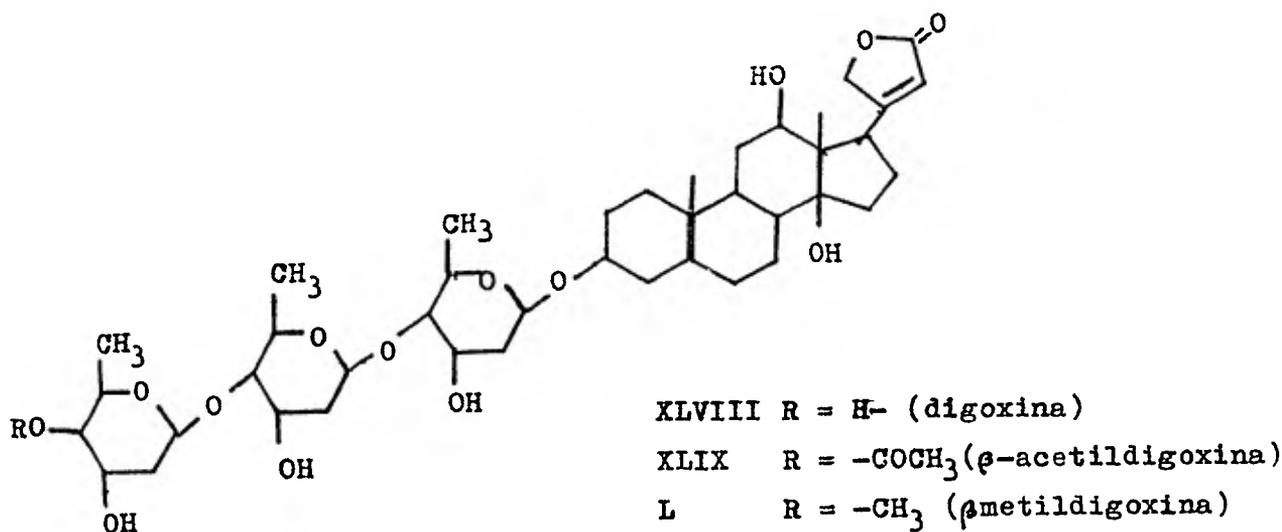


XLVII

### Modificación de las propiedades farmacocinéticas

A partir de la década de los 60s se ha puesto mucho interés en los estudios de las propiedades farmacocinéticas de los digitalis como una medida para mejorar las cualidades terapéuticas de estas drogas y reducir los efectos tóxicos. Las propiedades farmacocinéticas del esteroide cardiotónica ideal son las siguientes (62); a) Una absorción completa, b) Inicio rápido de la acción, c) Reducir la acumulación, mediante un incremento de la velocidad de eliminación.

Con base en experimentos realizados estas propiedades pueden ser establecidas en compuestos que se pueden modificar, incrementando así su carácter hidrófobico para que después o durante la absorción sean convertidos a derivados más polares, los cuales son eliminados rápidamente. En este campo ya se han realizado algunos intentos para sintetizar tales compuestos, uno de los primeros intentos para modificar deliberadamente las propiedades farmacodinámicas de los glucósidos cardiacos es el trabajo de Megges y Repke (63), quienes estudiaron la penta-acetil digitoxigenina. Debido a su baja liposolubilidad, la gitoxina es absorbida muy pobremente y es virtualmente inactiva cuando se administra por vía oral. La conversión a el derivado penta-acetilo da un compuesto que se absorbe mucho más rápidamente que la digitoxina, que es muy liposoluble. Durante y después de la absorción el compuesto es rápidamente desacetilado para producir nuevamente gitoxina, la cual es eliminada a una velocidad mayor que la digitoxina. Una relación similar es aplicada en la designación de dos derivados de la digoxina; -acetil digoxina (4''-acetildigoxina) (XLIX) y -metildigoxina (4''-metildigoxina) (L),



En 1971(62) se publicó el desarrollo y evaluación biológica de β-metildigoxina, así como de una serie de alquil y aril derivados de la porción azucarada de los glucósidos cardiacos, se ha demostrado claramente que la metilación de un simple grupo hidróxilo en la digoxina produce un incremento pronunciado en la velocidad con la cual es absorbido el fármaco. Algunos pequeños ensayos clínicos indican que la β-metildigoxina es efectiva y bien tolerada. Sin embargo, la observación de que el fármaco era desmetido solamente en una pequeña cantidad, sirvió para que estudios más exáustivos revelaran que este fármaco es más tóxico que la digoxina.

Merz y Lossel (64) estudiaron un grupo de compuestos acetilados derivados de la digitoxina, gitoxina y digoxina los cuales fueron reabsorvidos más fácilmente por adminis

tración oral que los glucósidos no acetilados. Estos derivados fueron preparados por la reacción de los glucósidos con  $\text{MeC(OEt)}_3$  en presencia de ácido *p*-toluensulfónico, y posterior hidrólisis parcial de los orto acetatos.

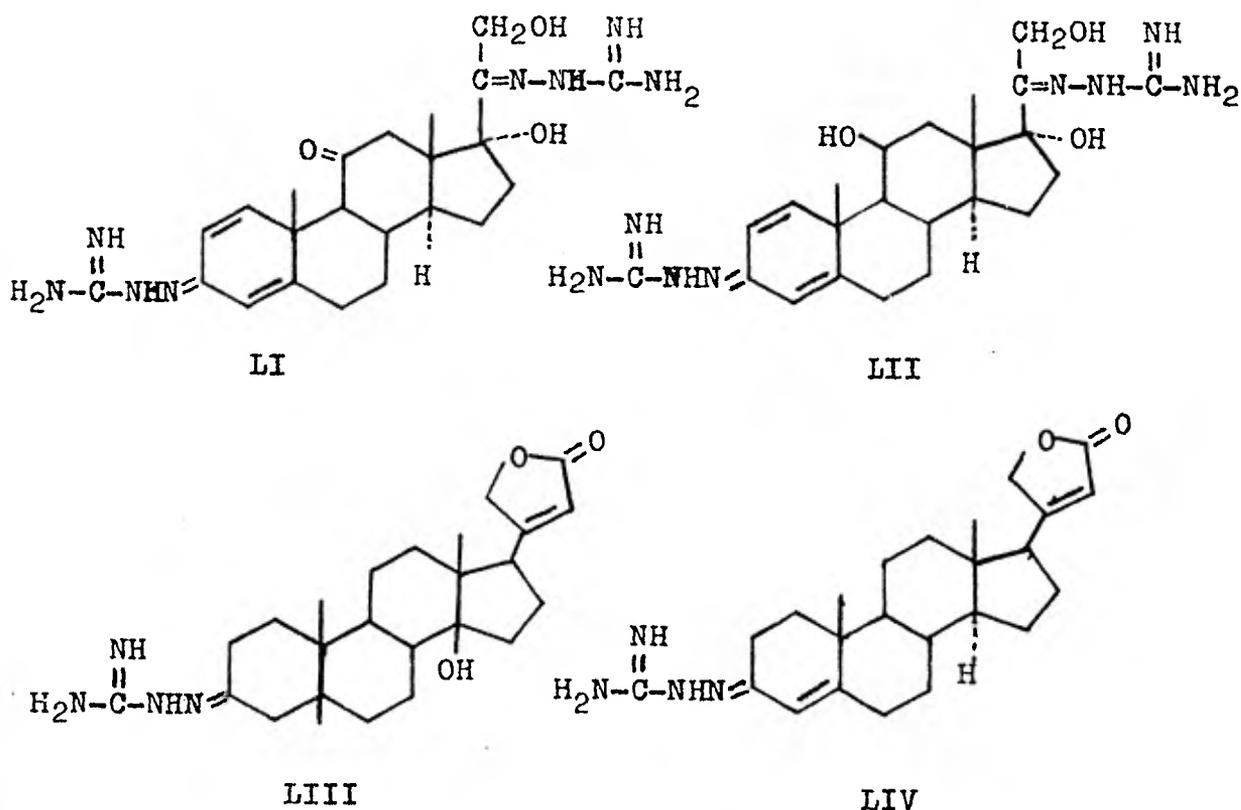
#### Esteroides guanilhidrazonas y otros compuestos cardiactivos

Algunos compuestos que no contienen la estructura típica de los glucósidos cardiacos han presentado actividad cardiotónica. De particular interes son las 3,20-bis-guanilhidrazonas derivadas de prednisona (LI) y prednisolona (LII). En 1969 fue publicada una revisión de la química y actividad biológica de las guanilhidrazonas (25). Esta revisión atrae la atención sobre algunos importantes aspectos concernientes a la relación estructura-actividad de estos compuestos:

- 1.- Un amplio grupo de esteroides 3,20-bis-guanilhidrazonas ha mostrado ejercer una acción inotrópica positiva en músculo cardiaco; comparada con las de los glucósidos cardiacos, su actividad no es alterada significativamente por un cambio en la estereoquímica del núcleo esteroideal o de los sustituyentes en el anillo.
- 2.- La alteración de la distancia entre los dos grupos guanilhidrazonas por cambios en la posición de unión al grupo esteroideal, no hace variar mucho (conciertos límites) la actividad de la molécula. Además, algunas bisguanilhidrazonas no esteroideales muestran también actividad cardiotónica. Por ejemplo, algunas difenilbisguanilhidrazonas y bisguanilhidrazonas derivadas de moléculas dietricíclicas poseen actividad.
- 3.- Ciertos esteroides mono y trisguanilhidrazonas son activos. De particular interés es la guanilhidrazona de 3-oxo digitoxigenina (LIII), la cual es cardioactiva y el deri-

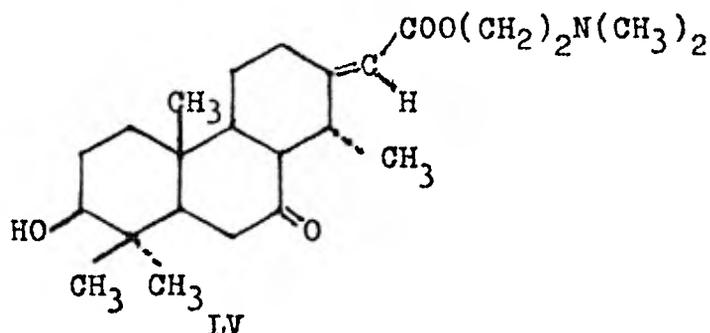
vado guanilhidrazona del correspondiente 14-desoxi-14 $\alpha$ -cardenólido (LIV) carece de actividad.

4.- La hidrogenación de las guanilhidrazonas produce los derivados diaminoguanidina, en los cuales no hay pérdida significativa de actividad. Sin embargo, la sustitución de las guanilhidrazonas por otros grupos relacionados, tales como la hidracina o la S-metilisotiosemicarbazona produce compuestos inactivos.

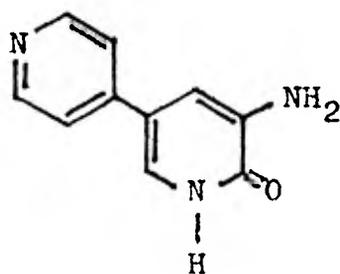
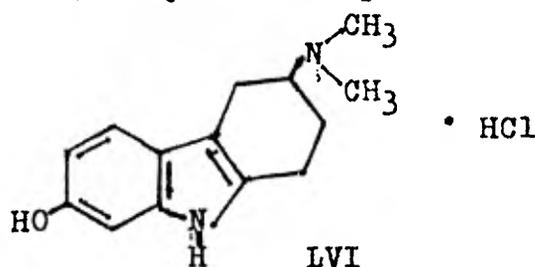


La Eritrophleum (65), alcaloide de la cassaina (LV) ha sido reconocido por muchos años por tener una fuerte acción digitalica sobre el músculo cardíaco. Así como el anillo de la lactona insaturada es un grupo importante para la actividad bio

lógica de los glucósidos cardiacos, las propiedades de la cassaina dependen de la presencia del grupo éster insaturado, aminoetil. La hidrólisis de este grupo, para dar el correspondiente ácido, destruye la actividad.



Recientemente se han investigado las propiedades farmacológicas de dos clases de compuestos que presentan actividad cardiaca y una significativa selectividad de actividad inotrópica (66). Estas dos clases de compuestos son derivados del tetrahidrocarbazol y la biperidina. El prototipo de estos derivados son los compuestos (LVI y LVII respectivamente).



LVII

Se demostró in vitro la actividad inotrópica positiva de ambos compuestos en aurícula aislada de gato y preparaciones de músculo papilar y en vivo en animales anestesiados y no anestesiados. La amrinona(LVII) no causa cambios significativos en la enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ .

Sin embargo, hasta ahora no se conoce el mecanismo - exacto de la acción de amrinona. Evidencias experimentales indican que el fármaco actúa directamente en elementos contráctiles del miocardio.

### Separación de los efectos cardiotónicos y tóxicos

No se han superado aún las dificultades y riesgos de la terapia con glucósidos cardíacos, esto se debe al estrecho - espectro terapéutico(67), así como a las diferentes respuestas de los pacientes que se someten a esta clase de compuestos (68,69). aunque se ha perseguido intensamente la búsqueda de mejores propiedades terapéuticas para sustancias naturales o sintéticas, está no ha producido resultados satisfactorios. Dos prerrequisitos para tener éxito en tales tentativas son; el conocimiento de la relación estructura actividad de tales moléculas, así como la separabilidad de los efectos terapéuticos y tóxicos. Es posible separar estos dos efectos, solamente, si dos diferentes mecanismo o dos diferentes receptores son responsables de ellos.

Aunque la investigación de los mecanismos de acción de los glucósidos cardíacos esta lejos de ser completa(70,71) - hay cada vez más información que indica que los efectos cardiotónicos y cardiotóxicos no estan necesariamente correlacionados. Conforme a la teoría de Repke, el mecanismo bioquímico para los dos efectos, terapéuticos y tóxicos de los glucósidos cardíacos es basado en la inhibición de una enzima - (69,72). Es decir, que las arritmias inducidas por digitalis son particularmente debidas a la inhibición del transporte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ATPasa en la membrana celular. Sin embargo, Okita y col.(73) excluyen una relación causal entre la inhibición de la enzima y el efecto inotrópico positivo. Usando preparaciones del corazón de conejo, fueron capaces de demostrar que el tiempo necesario para que haya efecto

inotrópico no coincide con el que es necesario para que haya inhibición de la enzima. En realidad, después de que se presentó el efecto inotrópico, el tejido muestra inhibición enzimática arriba de un 40% en relación a células de control (Okita es uno de los pocos, que miden el efecto inotrópico y la inhibición de la enzima ATPasa en el mismo material biológico). Una comparación de la vida media para estos dos efectos, después de la administración de 3-bromo acetato de estrofantidina, muestra claramente que la separación;  $t(1/2)$  para el efecto inotrópico positivo es aproximadamente 4 min., en cambio  $t(1/2)$  para la inhibición de la enzima se extiende hasta algunas horas. También para el glucósido ouabaina, ellos establecen una marcada diferencia en el período necesario para que ocurran los dos efectos (73). Esto fue además confirmado por Akera y colaboradores (74). De acuerdo con los resultados de Okita, Lüllmann, fue capaz de demostrar la gran estabilidad del complejo ouabaina-ATPasa, él también notó una sorprendente discrepancia entre la rápida desaparición de la ouabaina, para inducir el efecto inotrópico y la fuerte unión de glucósidos cardíacos para el transporte de la enzima.

No solamente los datos de estudios cinéticos sirven para demostrar que es improbable que exista una relación causal entre la inhibición de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPasa y el efecto inotrópico positivo. Quinidina, oligomicina, grupos sulfhidrilo y acida de sodio bloquean a la enzima en el transporte de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  en varios experimentos, pero ninguna de estas sustancias tiene un efecto inotrópico positivo (70). Además, ha sido demostrado por varios autores (75,44) que no hay dependencia del efecto inotrópico positivo de un número de compuestos

cardiotónicos con su eficiencia para inhibir el transporte de la enzima. Estas evidencias adicionales hacen suponer una ausencia de conexión directa entre inhibición de -- ATPasa e inotropismo. Además, Murthy y col. (76) mostraron que con un gran número de esteroides digitalis, el porcentaje dado de enzima inhibida no coincide con una simple - potencia inotrópica. Por otro lado, Katzung y col. (77), - demostraron que el efecto inotrópico de los cardenólidos - en aurícula izquierda de cuyo, puede ser evitado o retardado por tratamiento preliminar con acetilisodigitoxigenina o lactama-acetil-isodigitoxigenica, donde los efectos ---- inhibidores de los cardenólidos en la  $\text{Na}^{\text{F}}$ ,  $\text{K}^{\text{+}}$ ATPasa, así - como los signos tóxicos son totalmente eliminados.

Todas estas observaciones indican que los efectos cardenólidos en el transporte de la enzima y el poder de contracción pueden ser desacoplados y además que la inhibición de la  $\text{Na}^{\text{+}}$  $\text{K}^{\text{+}}$ ATPasa por digitalis es responsable de los efectos tóxicos pero no de los efectos inotrópicos(78).

#### Pruebas Farmacológicas

La efectividad de varios compuestos cardiotónicos es, estrictamente hablando, solamente comparable, si todos -- estos compuestos son probados bajo las mismas condiciones. Sin embargo, como se pudo observar, estó de ninguna manera se realiza. La información inherente en los métodos de prueba de la ATPasa o en los cuales el efecto deseado no es directamente medido(prueba de toxicidad en gatos), deben ser complementados con datos de otras fuentes en donde se pueda hacer una interpretación de la acción inotrópica posi-tiva.

El valor informativo de la prueba de la ATPasa , la cual mide el efecto inhibitorio de un glucósido cardiaco en la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPasa, es necesariamente limitado. De acuerdo a algunos autores es probable que el efecto tóxico, pero no el inotrópico, sea debido a la inhibición de la enzima. Substancias con las cualidades farmacológicas deseadas (buen efecto inotrópico con pequeña toxicidad) son fácilmente pasadas por alto (79).

La prueba de Hatcher se considera la primera prueba farmacológica que se debe realizar a nuevos compuestos potencialmente activos, en la cual usan una enorme cantidad de gatos (80).

La prueba en aurícula aislada de cuyo, un modelo clasico para la evaluación de glucósidos cardiacos, debe no solamente ser incluida en el análisis de los efectos inotrópicos de tales compuestos, sino también debe ser importante en la determinación de su índice terapéutico. Sin embargo, esta prueba da exclusivamente información acerca de los efectos inotrópicos y tóxicos de una substancias y no de sus propiedades antiarrítmicas(81).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la considerable cantidad de trabajos publicados en las últimas décadas en el campo de los cardenólidos y del enorme número de investigadores que han participado en ellos, no se ha logrado obtener el cardenólido ideal pues de los métodos sintéticos de cardenólidos, se han obtenido cientos de sustancias que no han logrado superar a los cardiotónicos naturales. Sin embargo, la falta de éxitos no ha sido motivo para que esta formidable tarea se de por terminada, por el contrario, el esfuerzo debe ser mayor, para así obtener resultados satisfactorios.

En el campo de los cardenólidos, México esta en posibilidades de participar, ocupando un lugar muy importante, debido a sus fuentes naturales de material digitálico. La extracción y purificación de este material es un factor primordial para la obtención de materia prima, que se emplearía en la investigación química, para el desarrollo de nuevos cardiotónicos. Además, el país es dueño de una gran cantidad de material renovable, que le permitirá en el futuro, exportar materia prima, sosteniendo así su propia investigación y la de otros países.

El problema se limita a la búsqueda de tecnología, para la utilización de los recursos con los que cuenta el país y el desarrollo de investigación química, para el diseño de métodos sintéticos que permitan obtener nuevos cardiotónicos semisintéticos.

#### IV. OBJETIVOS

Algunas especies de *Thevetia*, por ejemplo, *Thevetia thevetoides* y *Thevetia neriifolia*, son abundantes en el territorio nacional. Las semillas de estas plantas tienen un alto contenido en triglucósidos cardiotónicos.

Los glucósidos cardiotónicos han sido identificados como derivados de la aglicona digitoxigenina o con algunas modificaciones en su estructura. Todos estos compuestos son interesantes como materias primas para la síntesis de nuevos compuestos con posible acción farmacológica.

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo y adaptación de técnicas de extracción y aislamiento de thevetósidos presentes en las semillas de plantas mexicanas del género *Thevetia*.

La oxidación degradativa de la mezcla de thevetósidos (monoglucósidos cardiotónicos) nos conduce a la obtención de digitoxigenina. Esta constituye el material de partida para la semisíntesis de nuevos cardiotónicos modificados con posible acción inotrópica.

El segundo objetivo es la síntesis de 14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epóxi-digitoxigenina, para su posterior estudio biológico. Este nos permitirá evaluar sus propiedades farmacológicas.

## V. HIPOTESIS

Los triglucósidos cardiotónicos presentes en la semilla de Thevetia por tener tres unidades de azúcar tienen un carácter hidrófilico, la hidrólisis de estos azúcares, con enzimas hidrolíticas contenidas en la misma semilla (enzimas en dógenas), degradan estos triglucósidos a monoglucósidos (thevetósidos), cambiando así sus propiedades físicas, ya que ahora se comportan como moléculas hidrófobas. Sin embargo, su carácter lipofílico no es muy grande, por lo tanto no son solubles en disolventes poco polares, como el hexano, pero sí en cloroformo o cloruro de metileno. Estas variaciones de solubilidad serán aprovechadas para poder extraer la mezcla de thevetósidos, de la harina de semillas de Thevetia y dejarlos libres de grasa.

La hidrólisis de triglucósidos cardiotónicos será realizada por las enzimas hidrolíticas, con la simple adición de agua a la harina de semillas de Thevetia. Una vez hidrolizados los glucósidos, estos precipitarán en el agua y podrán ser extraídos con cloroformo.

Si deshidratamos la digitoxigenina en el hidróxilo 14 y posteriormente la  $\Delta^{14}$ -digitoxigenina preparada de esta manera, la tratamos con N-yodosuccinimida o N-bromosuccinimida obtendremos 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -epoxidigitoxigenina.

En general los 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -epoxicardenólidos son menos potentes que sus correspondientes 14 $\alpha$ -hidroxicardenólidos. Sin embargo sus cualidades farmacológicas son mejores, debido a que su índice terapéutico será mayor, esto es

su margen de seguridad se ve aumentado, por una mayor diferencia entre la dosis de acción inotrópica positiva y la dosis cardiotoxica (57)

## VI. MATERIAL Y METODO

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un aparato Pye Unicam LTD en pastillas de bromuro de potasio, a menos que se indique lo contrario.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en un aparato Varian EM-390 y un Varian FT-80A, en deutereoclofoformo, con tetrametilsilano como referencia interna estándar; los resultados se dan en partes por millón(ppm).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi SMP-20K y no fueron corregidos, los resultados se dan en grados centígrados ( $^{\circ}\text{C}$ )

La cromatografía en capa delgada se realizó en cromatofolios Al de gel de sílice 60 F254 espesor 0.2mm.Merck.

La cromatografía en columna se realizó en gel de sílice-60 tamaño de partícula 0.063-0.200mm

Estufa de secado MAPSA HDP-334

Estufa de vacío, Presición Scientific Group 13aJ-5

Balanza Analítica Bosch S2000

Agitadores de propela

Molino de cuchillas para productos vegetales

Matraces Pyrex de 5 galones

Equipo de química orgánica KIT

Material de vidrio (matraces erlenmeyer, vasos de precipitado, etc.).

Equipo de laboratorio(parrillas, soportes, pinzas, ect.)

Semillas de Thevetia.(codo del fraile)

Disolventes( hexano, cloroformo, etanol, etc.)

Hidróxido de sodio, grado reactivo

Hidróxido de potasio, grado reactivo

Acido clorhídrico concentrado, reactivo analítico

" sulfúrico " " "

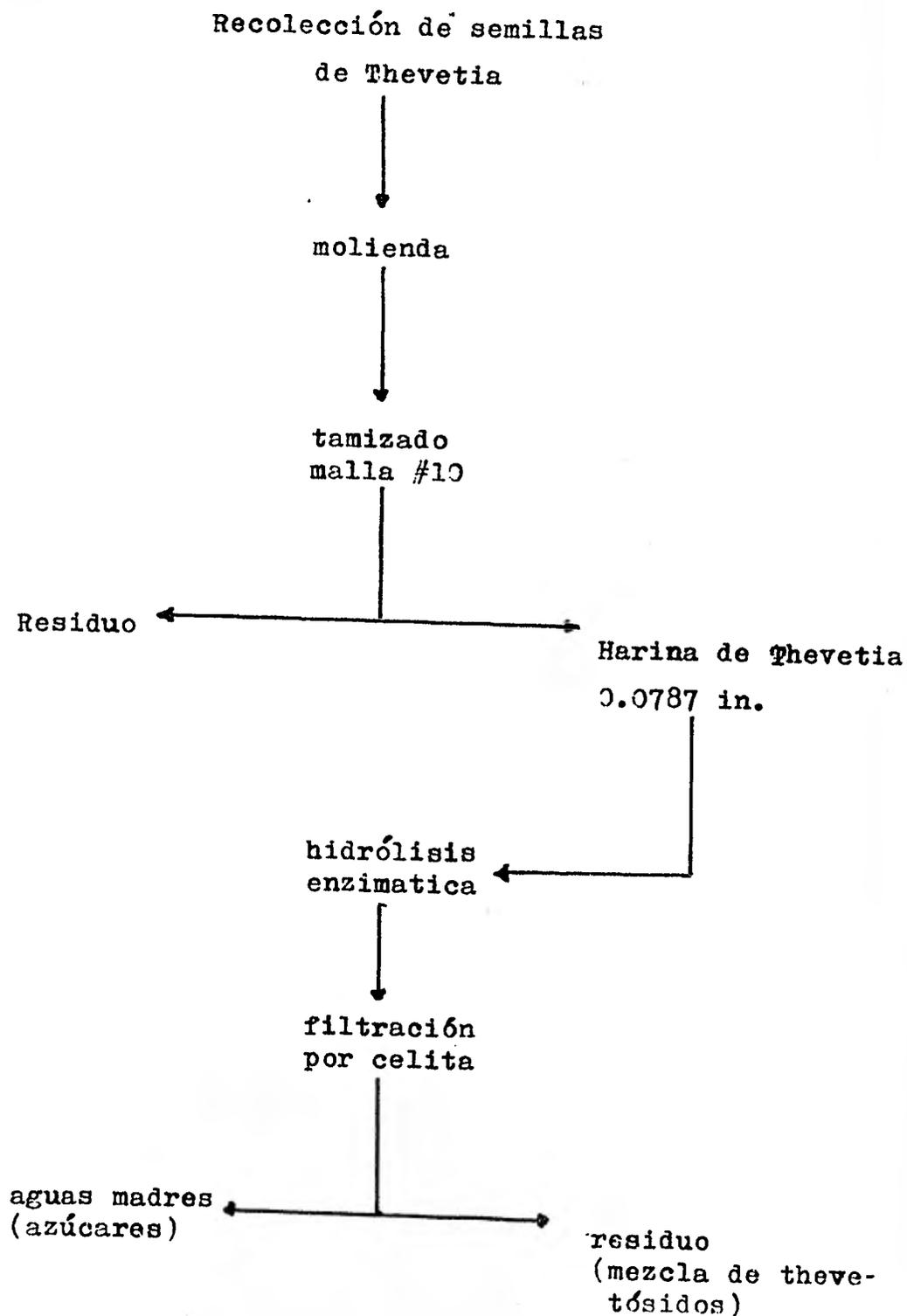
N-Yodosuccinimida

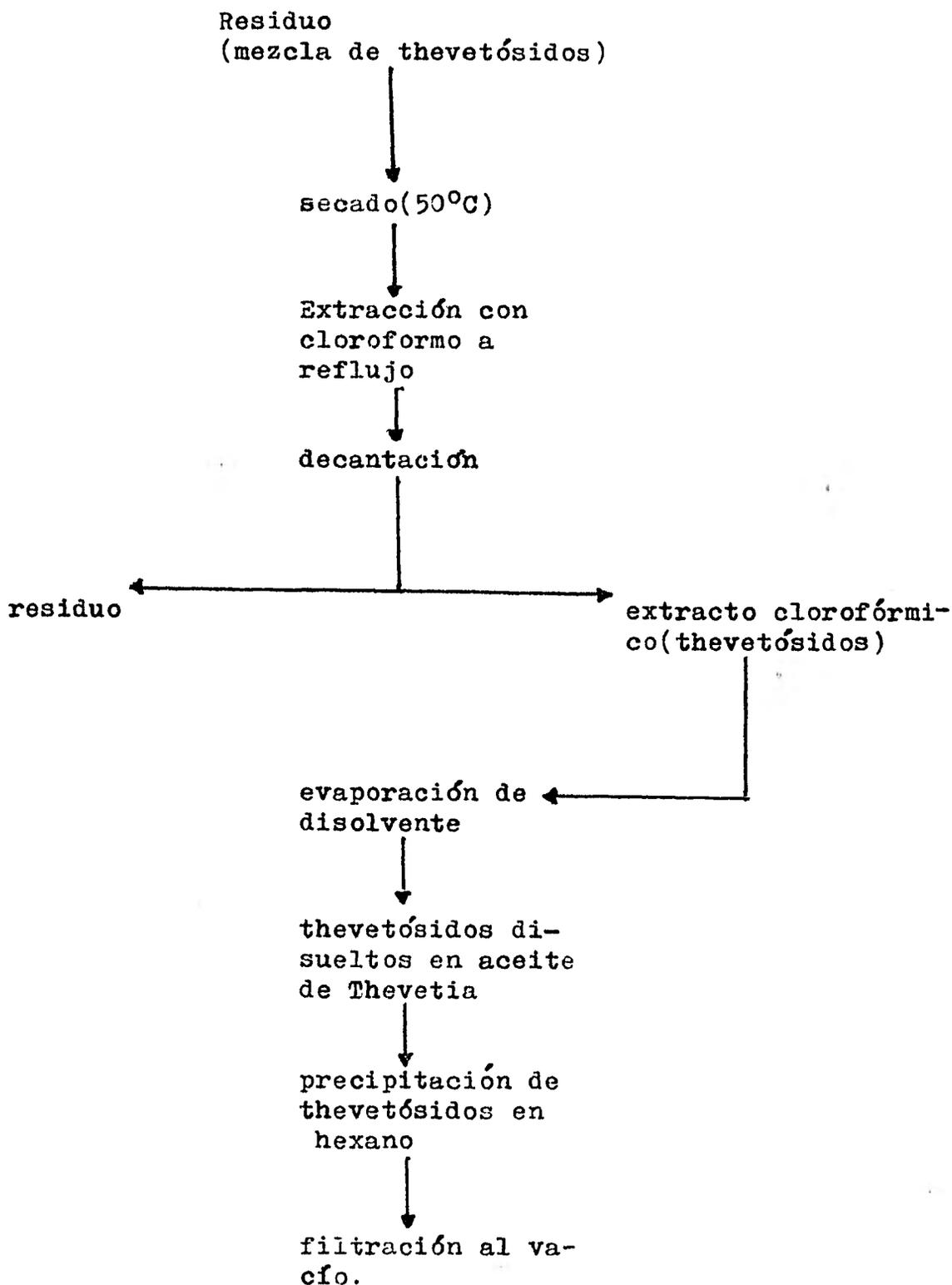
Acida de sodio, reactivo analítico

Nitrato de plata, " "

Cloruro férrico, grado reactivo.

Esquema de trabajo





Filtración al vacío

mezcla de thevetósidos

solución de aceite de Thevetia en hexano

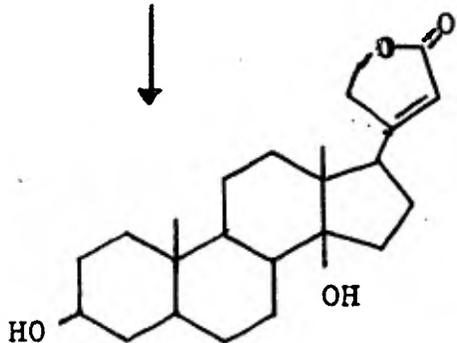
desengrasado exhaustivo (éter)

evaporación

Thevetósidos  
(mezcla)

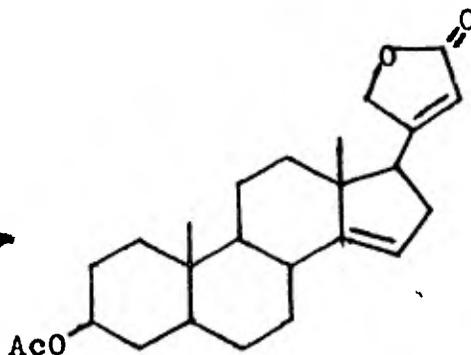
aceite de Thevetia

oxidación de Brown



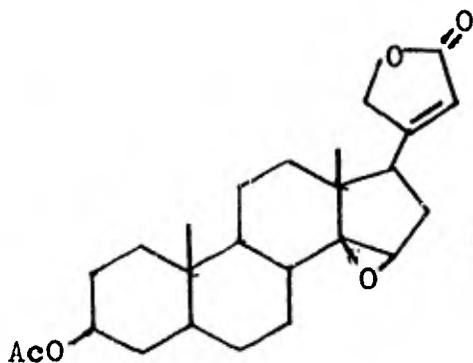
Digitoxigenina

FeCl<sub>3</sub>  
anhidrido acético



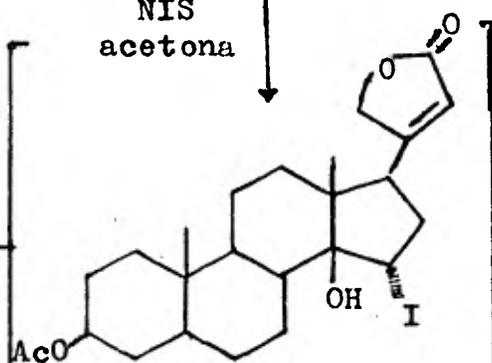
LX 3-acetoxy-14β-anhidro digitoxigenina

NIS  
acetona



3-acetoxy-14β-15β-epoxidigitoxigenina

LXII



3-acetoxy-15-Iodo-digitoxigenina

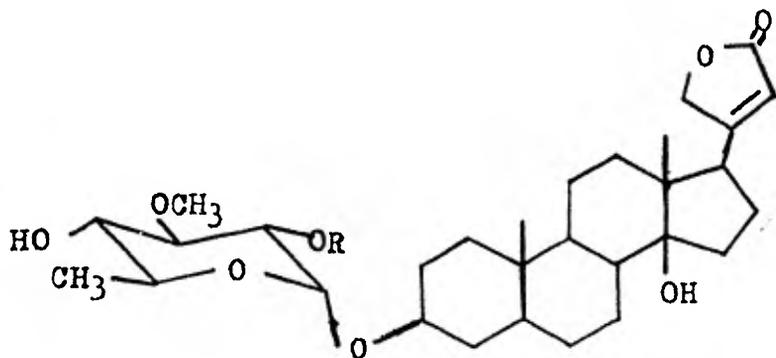
LXI

## VII. DESARROLLO

### Consideración previa

Las semillas de *Thevetia* tienen un alto contenido de triglucósidos cardenólidos, los que ya han sido previamente estudiados, estos triglucósidos son hidrolizados por enzimas endógenas de la semilla, para dar una mezcla de monoglucósidos, la cual consiste principalmente de neriifonilina(LVIII), así como una menor cantidad de monoacetato de neriifolina(LIX) y otros componentes menores.

Un método degradativo de neriifolina y monoacetato bajo condiciones suaves, para producir digitoxigenina en un rendimiento practico fue diseñado por Cruz y col.(4). Este método fue objeto de un estudio más profundo realizado por Rodri — guez(82) buscando mejorar las condiciones de reacción y el rendimiento de digitoxigenina. En la realización de esa investigación fueron utilizados los thevetósidos obtenidos en este proyecto. Estos thevetósidos fueron transformados a digitoxigenina, la que posteriormente se utilizó para la terminación del proyecto, por lo que en este desarrollo no se incluye la transformación de thevetósidos a digitoxigenina.



LVIII R= H-

LIX R= CH<sub>3</sub>CO-

## Desarrollo del trabajo

### Hidrólisis

La semilla de Thevetia se trituró en un molino de alta potencia (7 caballos de fuerza) con cuchillas, se recolectó en bolsas de tela porosa una harina semifina, la cual se tamizó a través de una malla del No. 10, abertura 2.0 mm. 5 Kg de esta harina de Thevetia se depositaron en un matraz de 20 litros con 10 litros de agua y 1.25 g de ácido de sodio (para evitar contaminación por hongos), la mezcla se incubó a 37°C por 4 días, tiempo suficiente para que la enzima thevetasa hidrolizara los triglicósidos cardiotónicos, el contenido del matraz se filtró al vacío, utilizando un filtro ayuda de tierra de diatomeas, el sólido se colocó en un recipiente de plástico y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas (opcionalmente se puede secar en una estufa, pero existe el peligro de caramelización de los carbohidratos)

### Extracción

sin haber secado completamente el hidrolizado, se depositó en un matraz de 20 L. con 6 L de cloroformo, se calentó a reflujo durante 5 horas, transcurrido este tiempo, se enfrió a temperatura ambiente y se decantó a vasos de precipitado de 4 litros, la extracción se repitió dos veces más, los extractos cloroformicos se reúnen, se evaporó el disolvente a presión reducida y quedó un residuo aceitoso que contenía la mezcla de monoglucósidos (thevetósidos).

### Aislamiento

El residuo aceitoso se adicionó lentamente y con agitación vigorosa a un matraz con 1.2 litros de hexano, de esta manera precipitó un sólido amarillo, una vez que se agregó todo el residuo se continuó agitando por una hora, después se recolectó el precipitado (mezcla de thevetósidos) en un embudo Büchner y finalmente, se desengró completamente con éter empleando un extractor soxhlet, obteniéndose 81.6 g de mezcla de thevetósidos (1.63%).

Se evaporó completamente el hexano del filtrado; dejó un residuo aceitoso que por su aspecto denominamos "aceite de Thevetia". Obtuvimos 508 ml (10%) de este aceite.

3-acetoxi-14- $\beta$  anhidrodigitoxigenina(LX)

Método A

Una mezcla de digitoxigenina (I) ( 1 g, 2.67 mmol ) , metanol(100 ml) y ácido clorhídrico concentrado al 35% (0.2 ml) se calentó a reflujo durante 18 horas, se neutralizó el ácido con solución de bicarbonato de sodio al 10%, se evaporó el metanol hasta 1/3 del volumen, se adicionó agua fría y se extrajo con cloroformo. El extracto clorofórmico se lavó con agua, secado con sulfato de sodio anhidro, decantado y evaporado hasta sequedad. El producto crudo se pasó por una columna de cromatografía con 25 g de gel de sílice y eluido con n-hexano-acetato de etilo(1:1), se recristalizó con metanol. Se obtuvieron 112 mg de 14- $\beta$  anhidrodigitoxigenina, pf. 198-200 ; IR (KBr) 3500,1780,1750,1720,1630,1450, 1175, 885  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.8(s, 3H), 0.99(s,3H), 2.7(s, 1H), 4.28(s, 1H), 4.75(t, 2H), 5.22(d,1H), 5.87(t, 1H).

A 50 mg. de 14- $\beta$  anhidrodigitoxigenina se adicionaron 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó a temperatura ambiente durante una hora, después se añadió 1 ml de agua y se calentó a 70°C por 20 min., se extrajo con cloruro de metileno. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio y se destiló hasta sequedad, el producto se recristalizó de acetato de etilo, se obtuvieron 45 mg de 3-acetoxi-14- $\beta$  anhidrodigitoxigenina, pf. 162-164 ; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 1785,1725, 1730, 1630, 895  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.8(s, 3H), 0.97(s, 3H); 2.02(s, 3H), 2.69(s, 1H), 4.7(t, 2H), 5.05(s, 1H), 5.2(s, 1H) 5.85(t, 1H).

Método B

2.0 g (5.34 mmol) de digitoxigenina se suspendieron en 5 ml de anhídrido acético, se adicionaron lentamente 50 mg (0.3 mmol) de cloruro ferrico , se disolvió totalmente el precipitado, se dejó reaccionar por 5 min a temperatura ambiente y después se adicionaron 10 ml de agua destilada, agitandose hasta precipitar el producto de color blanco, se filtró al vacío. El producto crudo se secó completamente y se recristalizó de acetato de etilo. Se obtuvieron 1.82 g de 3-acetoxi-14- $\beta$ anhidrodigitoxigenina, pf. 163-164. los datos espectroscópicos resultaron los mismos del compuesto obtenido por el método A.

3-acetoxi-14 $\beta$ -15 $\beta$ -epoxidigitoxigenina(LXII)

900 mg. de N-yodosuccinimida se disolvieron en 90 ml de acetona y 90 ml de agua, esta solución se agregó a 900 mg. de 3-acetoxi-14- $\beta$ anhidrodigitoxigenina en 135 ml de acetona, la mezcla se protegió de la luz forrando el matraz con papel aluminio y se agitó por 22 horas, se siguió el curso de la reacción por cromatografía en placa fina. Cuando la reacción no avanzó más se adicionó una solución de 900 mg. de sulfito de sodio y 18 ml de agua. La solución se concentró hasta 1/3, se extrajo con cloruro de metileno, los extractos se reunieron, se secaron sobre sulfato de sodio y el disolvente se evaporó hasta sequedad. El producto crudo se cromatografio en columna con 20g. de gel de sílice y eluidó con hexano-acetato de etilo(3;2), se recritalizó de acetona-éter de petroleo, se obtuvieron 180 mg de 3-acetoxi-14 $\beta$ -15 $\beta$ epoxidigitoxigenina, pf. 174-175 IR (KBr) 1785, 1750, 1730, 1625, 1250, 1025, 890  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.94(s, 3H), 1.01(s, 3H), 2.05(s, 3H) 2.72(s, 1H), 3.45(s, 1H), 4.75(q, 2H), 5.05(s, 1H), 5.73 (t, 1H); espectro de masas m/e 414 ( $\text{M}^+$ ), calculado 414.

Resultados

En el método descrito para la extracción y aislamiento de thevetósidos, al tamizar la harina de Thevetia se obtuvieron 46% de harina fina y 54% de cascara o desecho.

Del 46% de harina el 10% es aceite y 1.632% son thevetósidos. El rendimiento global de thevetósidos y aceite resulta ser 0.75% y 4.6% respectivamente.

Al analizar los datos espectroscópicos para las sustancias preparadas, se obtuvieron los siguientes resultados:

14- $\beta$ -anhidrodigitoxigenina

Espectro de infrarrojo (espectro num. 1)

---

| $\nu$ cm <sup>-1</sup> | Intensidad     | Grupo funcional                        |
|------------------------|----------------|--|
| 3500 y 1175            | fuerte y media | -OH alargamiento                       |
| 2870 y 2930            | fuerte         | C-H (sat) "                            |
| 1780, 1750 y 1728      | fuerte         | C=O(butenólido)                        |
| 1630                   | fuerte         | C=C alargamiento                       |
| 1450                   | fuerte         | -CH <sub>2</sub> - flexión en el plano |
| 1382                   | media          | -CH <sub>3</sub> flexión en el plano   |
| 1050                   | fuerte         | C-O(butenólido)                        |
| 985 y 850              | media          | C=C-H flexión en el plano              |

---

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H (espectro num.2)

---

| desplazamiento $\delta$ | multiplicidad  |                      |
|-------------------------|----------------|----------------------|
| 0.8                     | singulete (3H) | -CH <sub>3</sub> 1.8 |

| desplazamiento | multiplicidad               |                       |
|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| 0.99           | singulete(3H)               | -CH <sub>3</sub> , 19 |
| 2.70           | singulete(1H)               | -H , 17 $\alpha$      |
| 4.28           | singulete(1H)               | -H, 3 $\alpha$        |
| 4.75           | triplete (2H)<br>$J = 2$ Hz | -CH <sub>2</sub> - 21 |
| 5.22           | doblete(1H)                 | -C=C-H 15 $\alpha$    |
| 5.87           | triplete(1H)<br>$J = 2$ Hz  | -H, 22                |

En 1.6 ppm se observa una señal, que desaparece con agua deuterada y fue asignada al -OH 3  $\beta$  .

3-acetoxi-14- $\beta$ -anhidrodigitoxigenina

Espectro de Infrarrojo(espectro num. 3)

| $\nu$ cm <sup>-1</sup> | Intensidad | Grupo funcional            |
|------------------------|------------|----------------------------|
| 2945 y 2870            | fuerte     | C-H(sat) alargamiento      |
| 1788, 1754, 1730       | fuerte     | C=O(butenólido)            |
| 1633                   | fuerte     | C=C alargamiento           |
| 1455                   | fuerte     | -CH <sub>2</sub> - flexión |
| 1380                   | fuerte     | -CH <sub>3</sub> flexión   |
| 1265 y 1040            | fuerte     | C-O (butenólido)           |
| 895 y 860              | media      | C=C-H flexión              |

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H

| desplazamiento $\delta$ | multiplicidad |                       |
|-------------------------|---------------|-----------------------|
| 0.8                     | singulete(3H) | -CH <sub>3</sub> , 18 |
| 0.97                    | singulete(3H) | -CH <sub>3</sub> , 19 |

|                         |               |                                 |
|-------------------------|---------------|---------------------------------|
| desplazamiento $\delta$ | multiplicidad |                                 |
| 2.02                    | singulete(3H) | -OCOCH <sub>3</sub> , 3 $\beta$ |
| 2.68                    | singulete(1H) | -H, 17 $\alpha$                 |
| 4.7                     | triplete(2H)  | -CH <sub>2</sub> -, 21          |
| 5.05                    | singulete(1H) | -H, 3 $\alpha$                  |
| 5.2                     | singulete(1H) | -C=C-H 15 $\alpha$              |
| 5.35                    | triplete(1H)  | -H, 22                          |
|                         | $J = 2$ Hz    |                                 |

Los rendimientos obtenidos para la síntesis de 3-acetoxi-14- $\beta$ -anhidro digitoxigenina fueron;

Método A 9.43 %

Método B 86 %

3-acetoxi-14 $\beta$ -15 $\beta$ -epoxidigitoxigenina

Espectro de Infrarrojo(espectro no. 5)

| $\nu$ cm <sup>-1</sup> | intensidad | grupo funcional            |
|------------------------|------------|----------------------------|
| 3400-3500              |            | agua residual              |
| 2940 y 2875            | fuerte     | C-H(sat.) alargamiento     |
| 1735, 1750 y 1730      | fuerte     | C=O(butenólido)            |
| 1625                   | media      | C=C alargamiento           |
| 1455                   | fuerte     | -CH <sub>2</sub> - flexión |
| 1380                   | fuerte     | -CH <sub>3</sub> flexión   |
| 1250                   | fuerte     | -O-(epóxido) alarg.        |
| 1025                   | fuerte     | C-O(butenólido)            |
| 890 y 865              | media      | -C=C-H flexión             |

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  (espectro num. 6)

| desplazamiento $\delta$ | multiplicidad        |   |
|-------------------------|----------------------|---|
| 0.94                    | singulete(3H)        | $-\text{CH}_3$ 18                         |
| 1.01                    | singulete(3H)        | $-\text{CH}_3$ 19                         |
| 2.05                    | singulete(3H)        | $-\text{OCOCH}_3$ 3 $\beta$               |
| 2.72                    | singulete(1H)        | $-\text{H}$ 17 $\alpha$                   |
| 3.45                    | singulete(1H)        | $-\text{H}$ 3 $\alpha$                    |
| 4.75                    | cuadruplete(2H)      | $-\text{CH}_2-$ 21                        |
|                         | $J = 2.5 \text{ Hz}$ |   |
|                         | $J = 1.5 \text{ Hz}$ |   |
| 5.05                    | singulete(1H)        | $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ 15 $\alpha$ |
| 5.73                    | triplete (1H)        | $-\text{H}$ 22                            |
|                         | $J = 2.5 \text{ Hz}$ |   |

El rendimiento obtenido para este compuesto fue de 20%.

En el espectro de masas se observa una señal para el ion molecular a 414, la masa molecular calculada para el epóxido fue de 414.

### VIII DISCUSION

En la técnica desarrollada para el aislamiento de mono glucósidos cardenólidos a diferencia de otras técnicas ya - publicadas, se hidrolizan los triglucósidos de la harina de la semilla de Thevetia sin desgrasar, lo que implica un aho rro de disolventes y menor trabajo. Por ejemplo, en el méto do descrito por Helfenberger y Reichstein(83), la harina es desengrasada antes de hidrolizarse , realizando un gasto de 6 litros de hexano por cada kilogramo de harina de Thevetia. Además, al trabajar con grandes cantidades de material, esta operación se complica. Sin embargo, si se trabaja con el material sin desgrasar(lo que no afecta en la hidrólisis) en la extracción con cloroformo y evaporación del mismo, el volumen se reduce aproximadamente a 10%. Cuando se precipita y filtra la mezcla de monoglucósidos, el material se reduce a un 4% que es fácilmente desengrasado con poco disolvente. En total, el gasto para 1 kg. de harina de Thevetia es de 400 ml de hexano y el trabajo es disminuido, porque ahora so lamente hay que desgrasar 40 g.

En lo que respecta a la síntesis de cardiotónicos; el método A, que es una técnica ya publicada, nos proporciona 9.48% de 3-acetoxi-14- $\alpha$ -anhidrodigitoxigenina y el método B; 86%, esta técnica fue desarrollada en nuestros laboratorios. Además, en el primer método se utilizan dos pasos para llegar al compuesto deseado; en el primer paso son necesarias 18 horas de reflujo y el empleo de cromatografía de columna por la presencia de los isómeros y anhidrodigitoxigenina.

Sin embargo, en nuestro método, se emplean únicamente 5 mi nutos en la reacción y el producto es fácilmente purificado por recristalización.

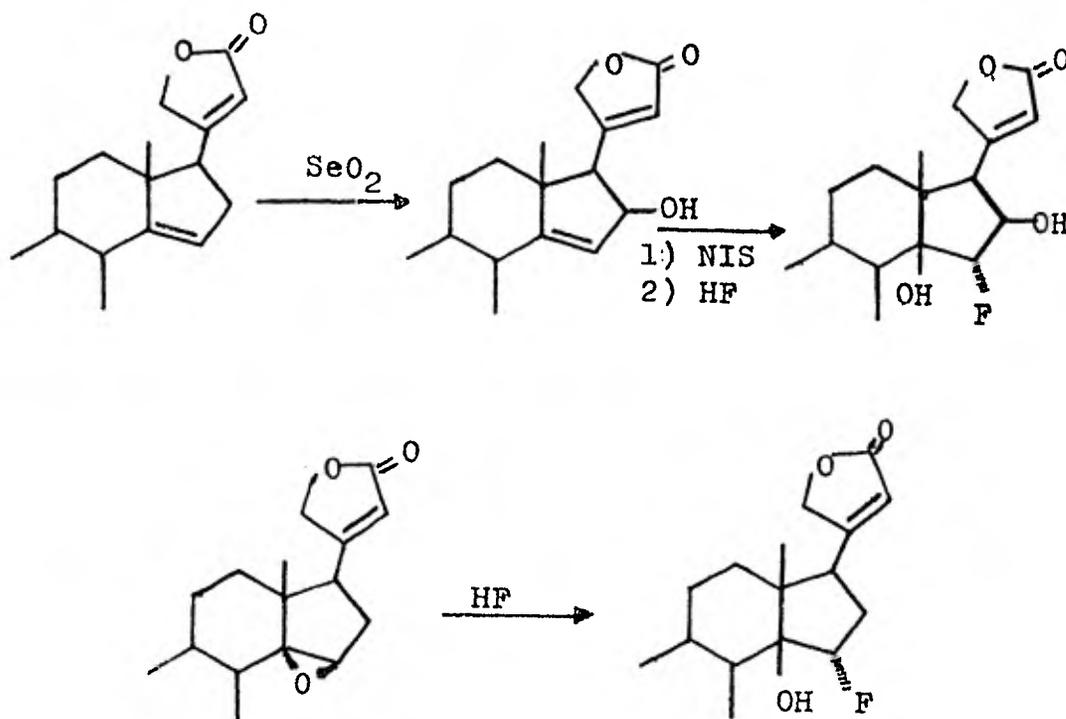
En la preparación del 3-acetoxi-14 $\alpha$ -15 $\beta$ epoxidigitoxigenina, se sospecha de la presencia del intermediario(LXI), que se transforma rápidamente al epóxido, por lo que no se puede aislar. Además, esta reacción no es completa porque se aisló también materia prima.

## IX. CONCLUSIONES

- 1.- En este trabajo se desarrolla un método para la utilización del fruto de las especies de *Thevetia*, como fuente para la obtención de monoglucósidos cardiacos, que por degradación oxidativa se transforma a digitoxigenina, la que es una materia prima para el desarrollo de la investigación en cardenólidos.
- 2.- Esta técnica resulta ser más práctica y económica que técnicas ya publicadas.
- 3.- Se muestran métodos químicos para la preparación de 3-acetoxi-14- $\beta$ anhidrodigitoxigenina y 3-acetoxi-14 $\beta$ ,15 $\beta$ epoxidigitoxigenina, intermediarios en la síntesis de nuevos cardenólidos.
- 4.- El 3-acetoxi-14 $\beta$ ,15 $\beta$ epoxidigitoxigenina tiene uso potencial como cardiotónico. Falta aún probar su espectro terapéutico.

## X PROPUESTAS

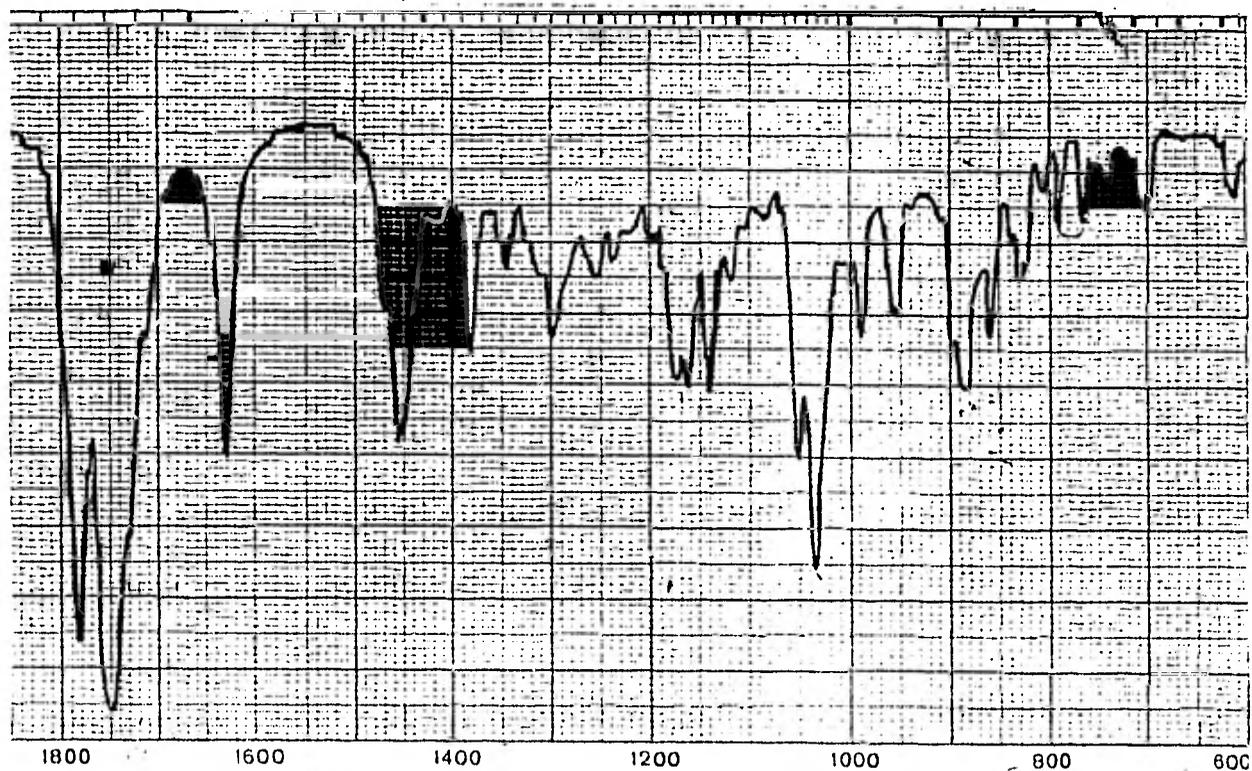
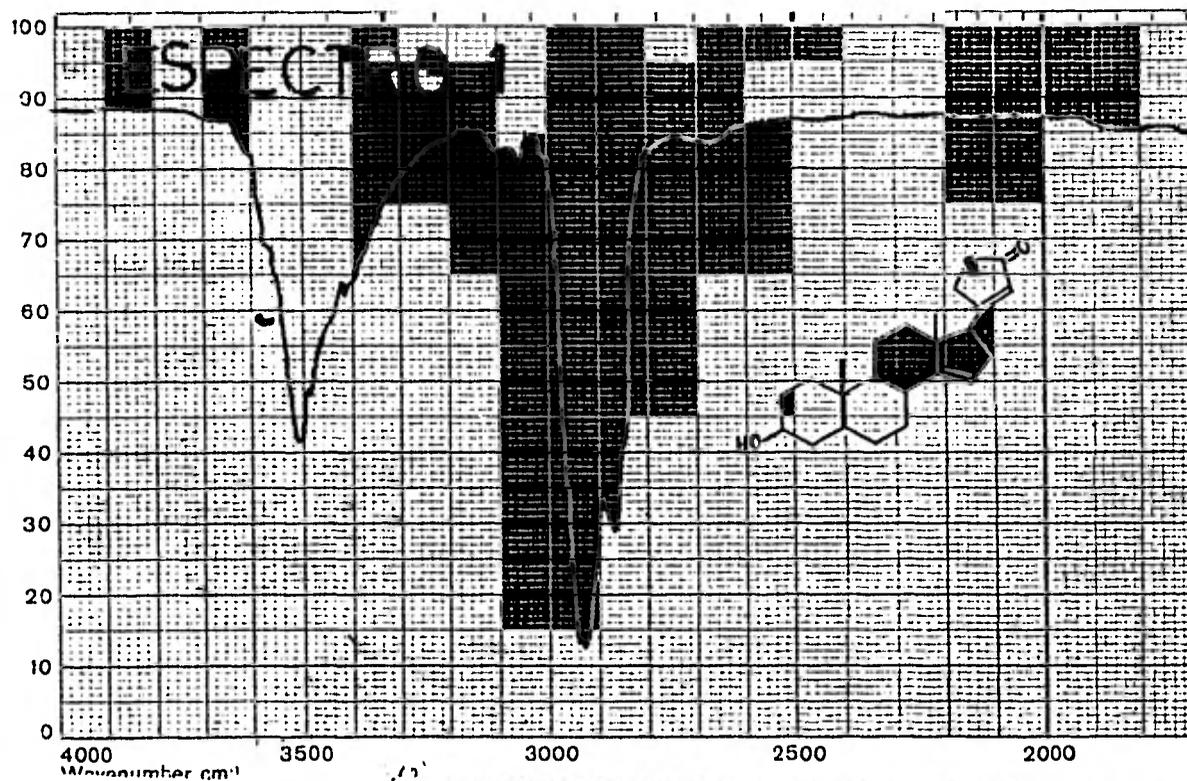
Como ya se mencionó anteriormente, la  $\beta$ -anhidrodigitoxigenina y el epóxido son posibles intermediarios en la síntesis de nuevos cardenólidos, en base a esta consideración se proponen las siguientes síntesis.



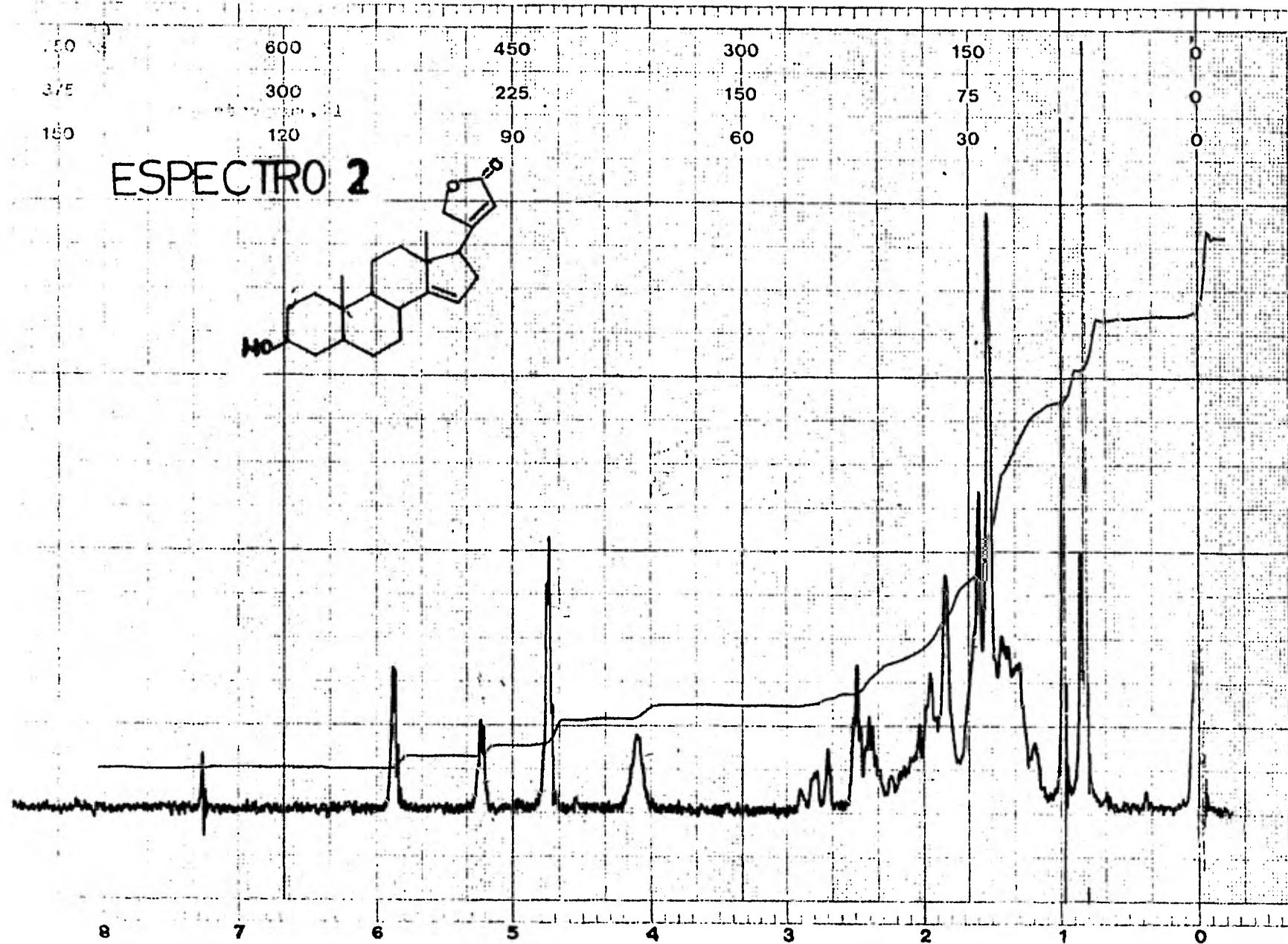
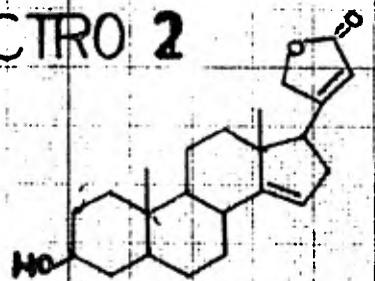
Se proponen estos compuestos porque los 16-hidroxycardenólidos y los compuestos fluorados tienen propiedades farmacológicas muy apreciables.

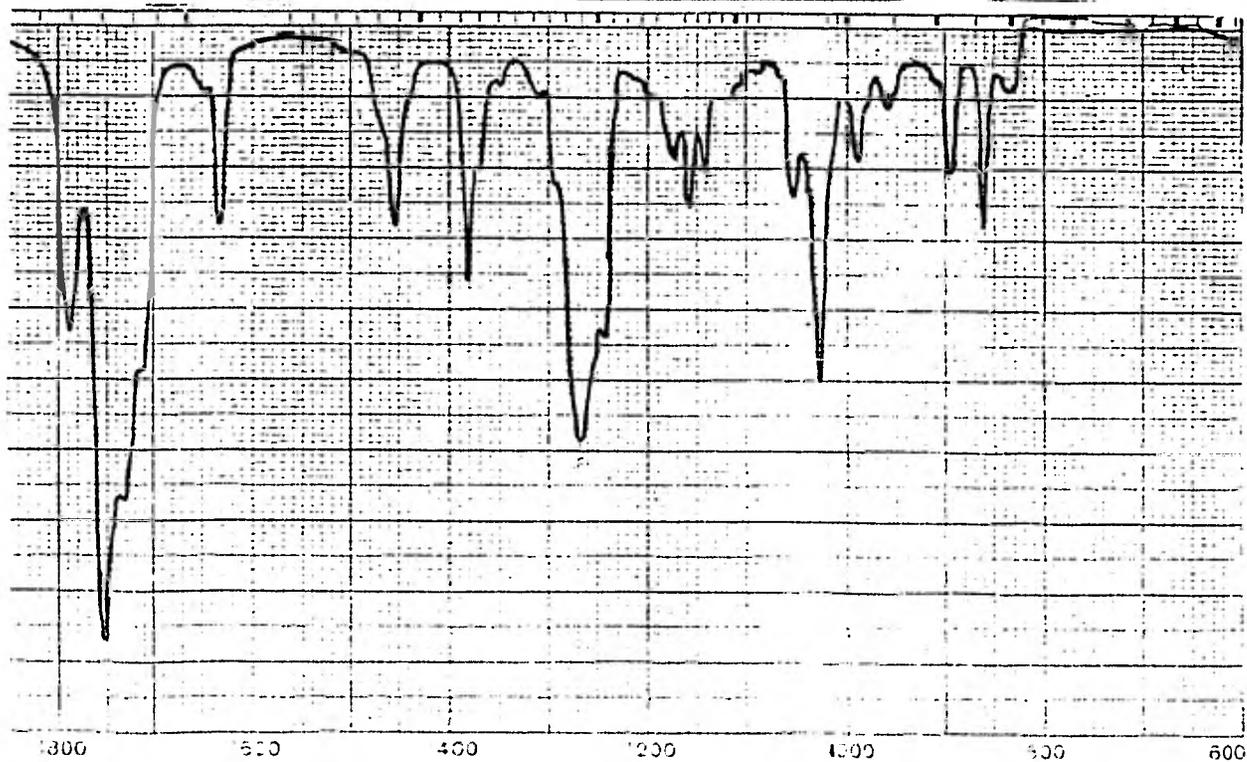
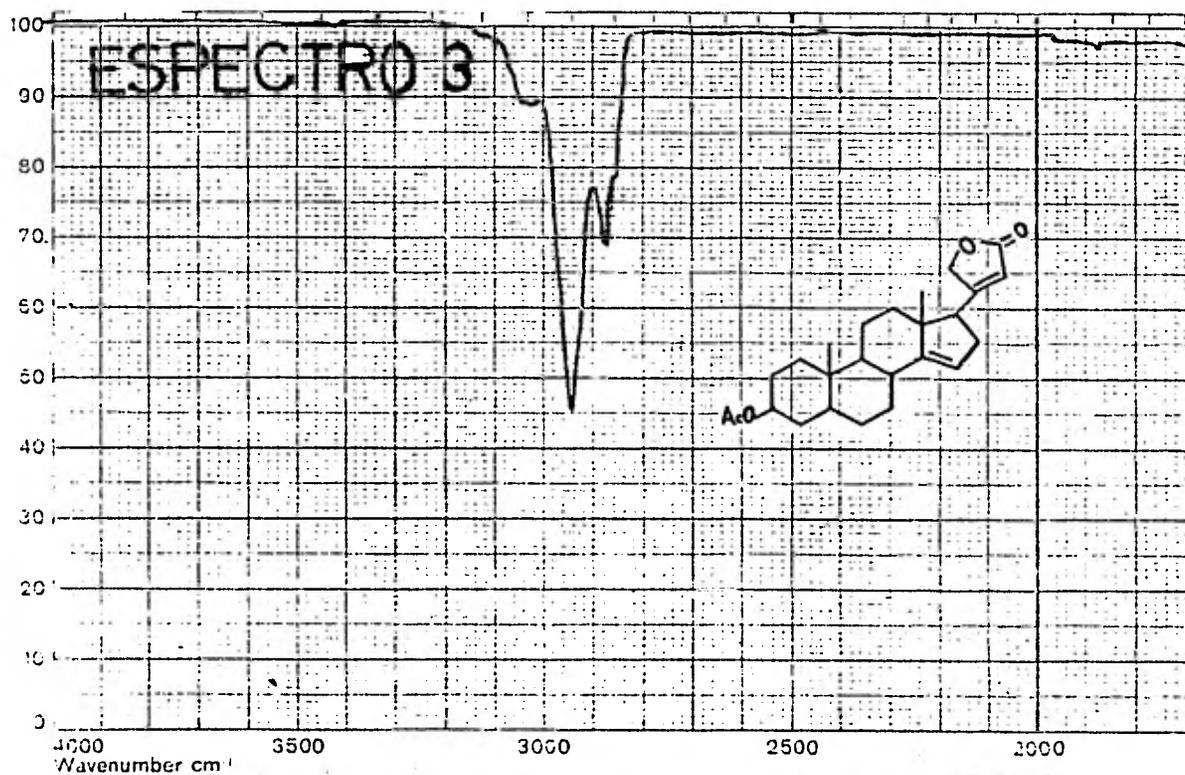
También queda aún por realizar una cuidadosa evaluación biológica de la 3-acetoxi-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxidigitoxigenina.

X I      A N E X O

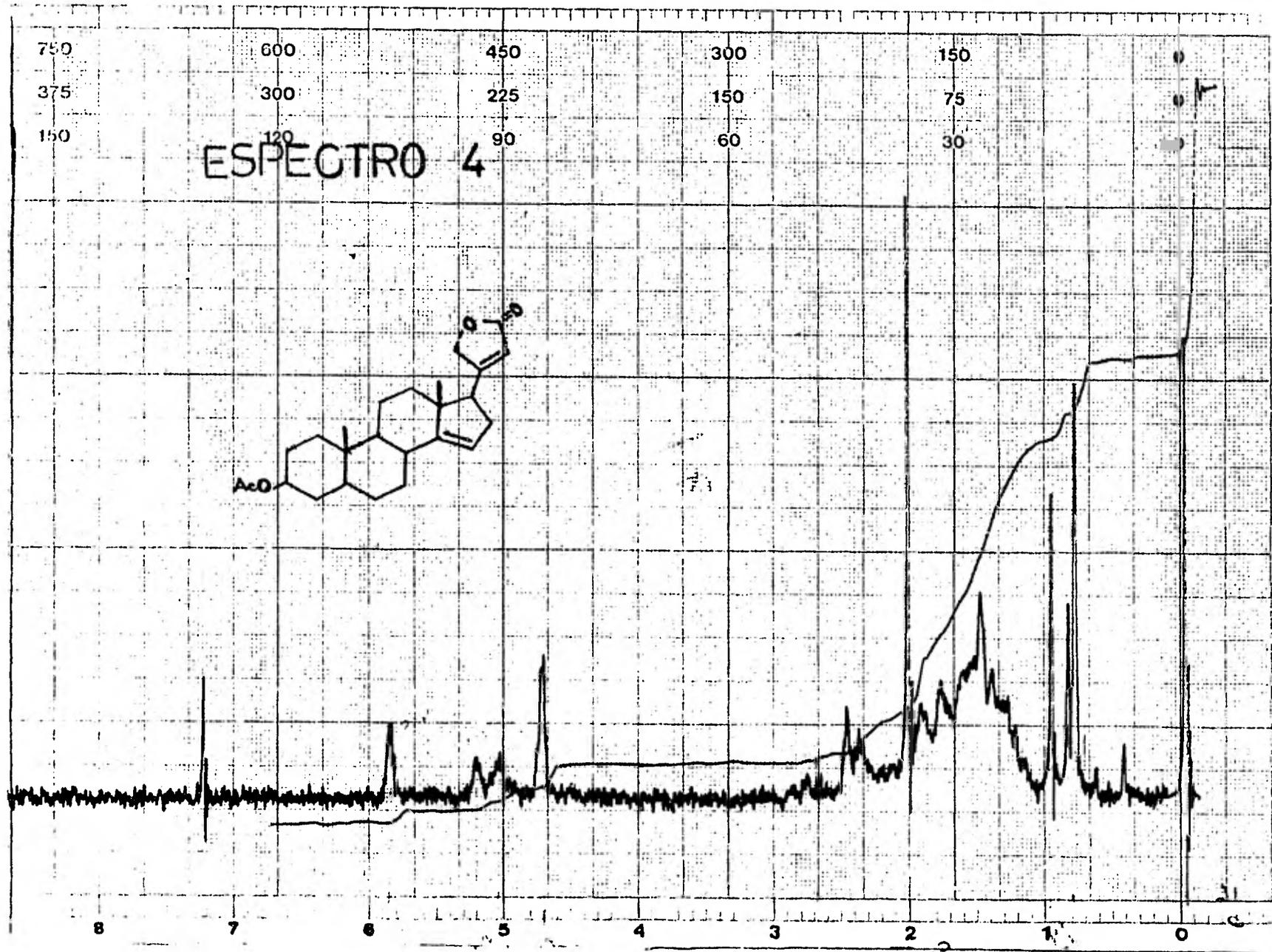
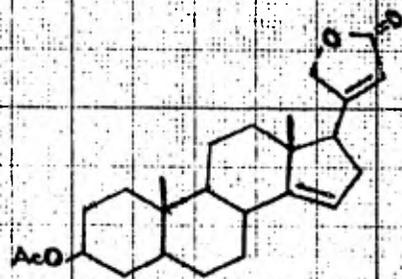


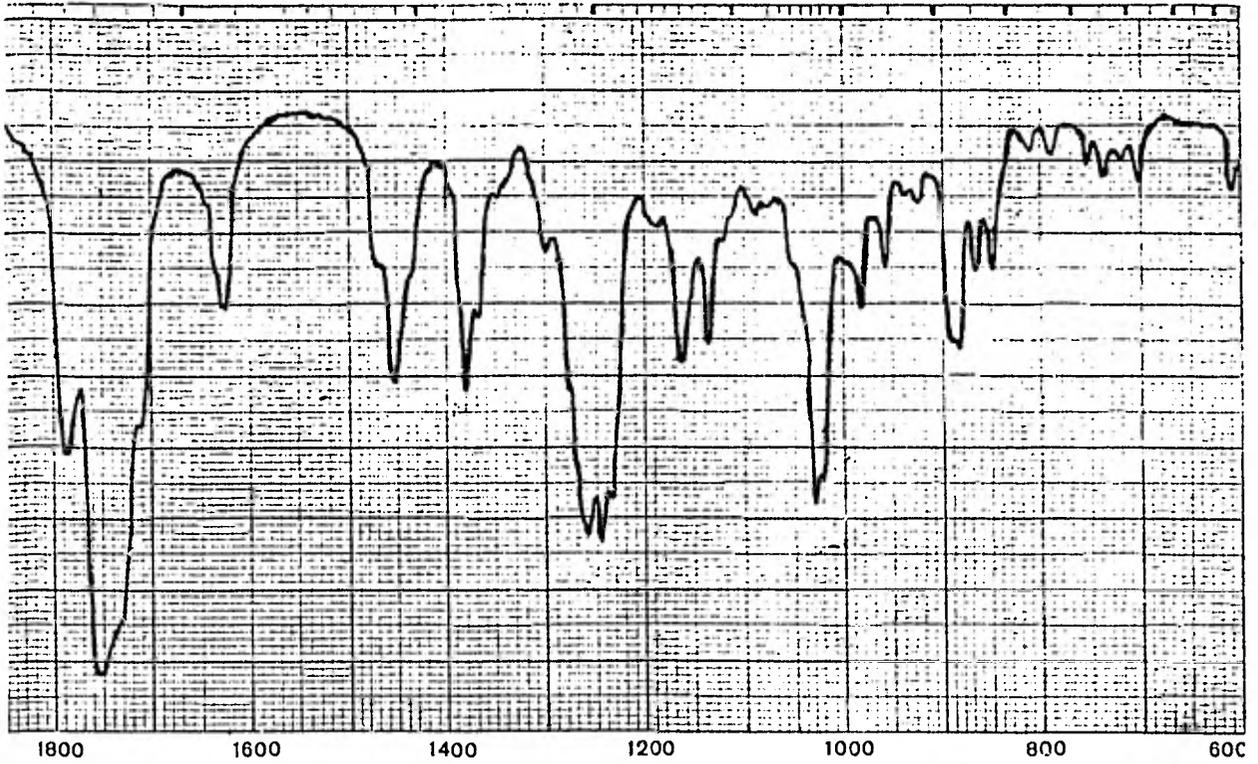
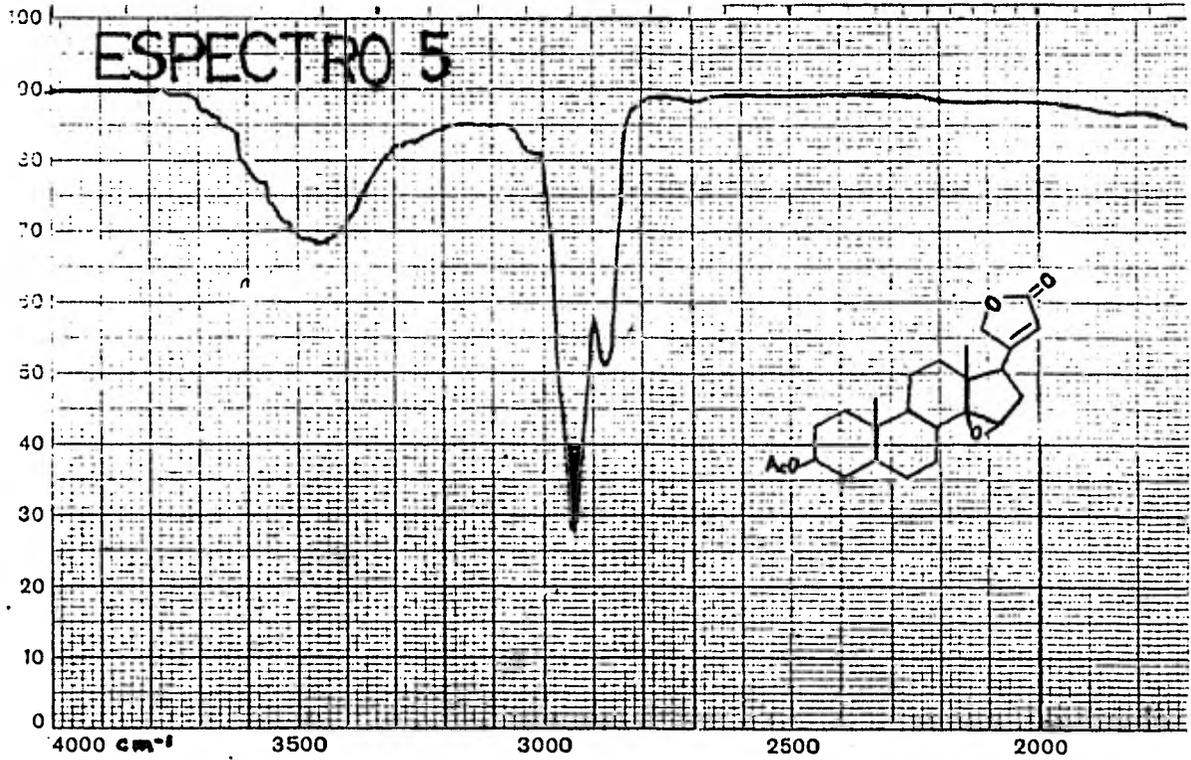
# ESPECTRO 2





# ESPECTRO 4





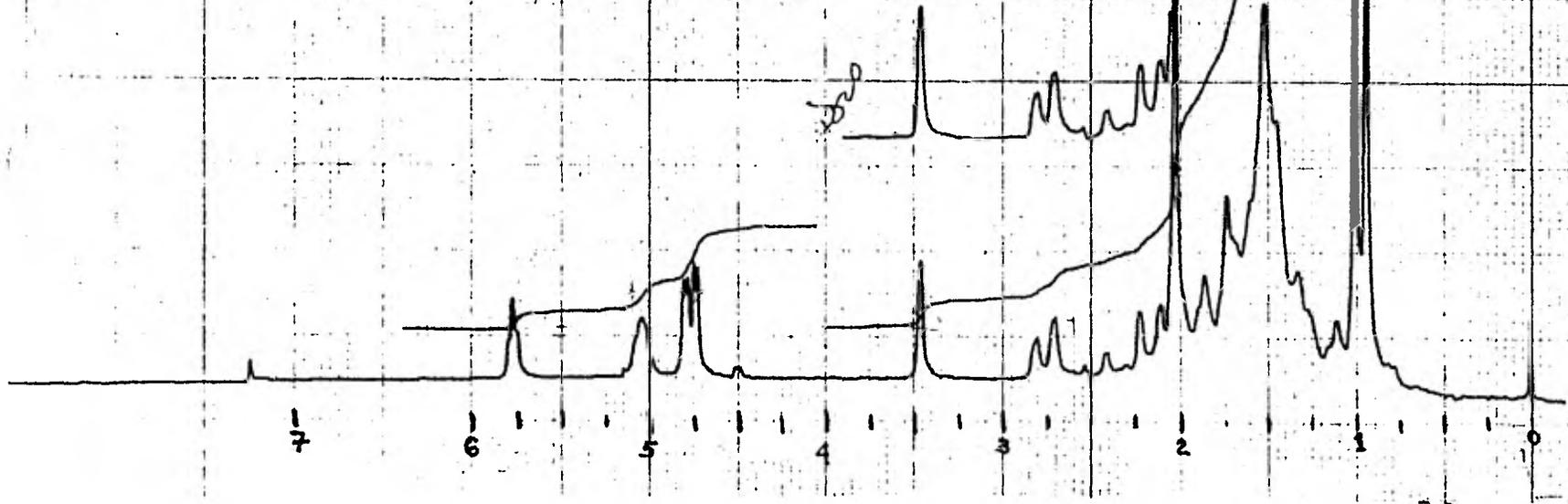
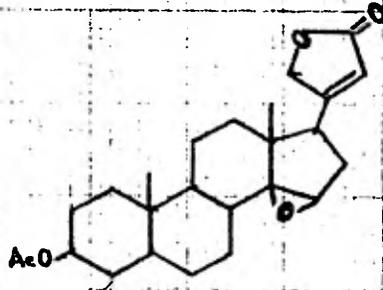
1500  
750  
600  
450

1000  
500  
400  
300

500  
250  
200  
150

0  
0  
0  
0

# ESPECTRO 6



XII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- G.K. Moe y A.E. Farah en "The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5<sup>a</sup> ed. p. 653. Ed. L.S. Goodman y Gillman. Macmillan Publ. Co. Inc. New York 1975.
- 2.- Herbario del Instituto de Biología
- 3.- Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional
- 4.- Cruz, I. García, J. Iriarte, J.P. Muchowsky y I.Regla J.Org. Chem., 42,3580(1977)
- 5.- Ch.Tamm, en; Proc. 1st International Pharmac. Meeting Estocolmo, Vol.3, p.11, Ed. W. Wilbrand, Pergamon Press Oxford 1963.
- 6.- K.K. Chen en; Proc. 1st International Pharmac. Meeting: vol 3, p. 27-43 , Ed. W.Wilbrand Pergamon Press, Oxford 1963
- 7.- K.R.H. Repke, Pharmazie. 27,693(1972)
- 8.- L.Ruzicka, P.A. Plattner, H.Heusser y K Meier. Helv.Chim. Acta. 30,1342(1947)
- 9.- N.Danieli, Mazur y F.Sondheimer, J.Amer.Chem.Soc. 84, 875(1962)
- 10.- W.Fritsch, V.Staue y H.Ruschig, Ann. Chem.699,195(1966)
- 11.- J.M.Ferland, Y.Lefebvre, R.Deghenghi y K. Wiesner. Tetrahedron. Lett. 30,3617(1966)
- 12.- Ch.R.Engel y G. Bach, Steroids 3,593(1964)
- 13,- M.Okada y Y.Saito. Steroids 6,645(1965)
- 14,- W.Fritsh y col. Ann.Chem 1974(4)
- 15.- G.Kruger. Can. J.Chem. 1974, 52(24) p.4133-42
- 16.- U.Valcavi, B.Cursi, S.Innocenti; P. Martelli. Farmaco. Ed. Sci. 597, 30(1975)

- 17.- Y.Saito, Y.Kanemasa y M.Okada. Chem.Pharm. Bull.18, 629(1970)
- 18.- W.Zürcher, E.Weiss-Berg y Ch.Tamm, Helv. Chem. Acta. 52,2449(1969)
- 19.- T.R.Witty, W.A.Rémers y H.R Besch. J.Pharm. Sci.64, 1248(1975)
- 20.- K.Meyer, Planta Med. Suppl. 4,1971
- 21.- P.C.Marshall en; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds 2<sup>en</sup> Ed. Vol II parte D. p 360. Ed. S.Coffrey. Elsevier. Publ. Co. Amsterdam, London. New york 1970
- 22.- J.G.Baumgarten en; Die Herzwirksamen glykoside, p.212 thieme. Verlag. Leipzig 1963
- 23.- T.Shiegi. H.Tsuru, Y. Saito y M.Okada. Experientia. 29,449(1973)
- 24.- M.S.Ragab, H.H.A.Linde y K.Meyer, Helv. Chem. Acta. 45, 1794(1962)
- 25.- S.Schutz, K.Meyer y H.Krätzer, Arznein-Forsch. 19,69 (1969)
- 26.- D.Bovet, Science, 129,1255(1959)
- 27.- H.Minato y T.Nagasaki, J.Chem. Soc.C. 1966,377
- 28.- T. Minesita y col. Ann. Rep. Shionogi Res. Lab, 18, 94(1968)
- 29.- R. Deghenghi en ; Chemistry of Natural Products 6-Internat. Simp. Mexico City. 1969.p 153. Butterworths London. 1970
- 30.- R.Mendez, G.Pastellin y E. Kabela . J. Pharmac. Exp. Ther. 183,189(1974)
- 31.- G.R. Pettit y B.Green, J.Org. Chem. 35,1381(1970)

- 32.- D. Satoh y K. Aoyama. Chem. Pharm. Bull, 18,1239(1970)
- 33.- T. Nambara y S.Goya, ibid. 18,1658(1970)
- 34.- B.G.Katzung, J.A.Muñoz y M.E.Wolff. Experientia 26,  
1189(1970)
- 35.- M.E. Wolff, W.Ho y HH.Chang. J.Pharm Sci. 57,1450(1968)
- 36.- Idem. J.Med. Chem. 13,657(1970)
- 37.- W.Eberlein, J.Nickl, J.Heider, G.Daharns y H. Machleit  
Chem. Ber., 105,3686(1972)
- 38.- W.Eberlein, J.Heider, W. Kobinger, y W. Dierderen  
Ger.Offen 2,145,476(1973)
- 39.- F.N.Willaescusa y G.R.Pettit, J.Med.Chem, 15,781(1972)
- 40.- F.Dittrich, P.Franke, R.Megges Y H. Portius. Ger(Este)  
107,452(1974)
- 41.- D.Satoh, T.Hashimoto. Chem.Pharm.Bull, 24,1950(1976)
- 42.- D. Fullerton, T.M.Gilman, M.C.Pankaskie, J. Med. Chem.  
20 ,841(1977)
- 43.- R.Megges, H.J.Portius y K.R.H.Repke. Pharmazie 34,328  
(1978)
- 44.- R.Thomas, J.Boutagy y A.Gelbart, J.Pharm.Sci. 63,1649  
(1974)
- 45.- J.Boutagy, A.Gelbart y R.Thomas. Aust.J.Pharm..Sci.2,  
41(1973)
- 46.- W.Eberlein, J.Heider y H.Machleidt, Chem.Ber. 107,1275  
(1974)
- 47.- N.Danieli, Y.Mazur y F.Sondheimer, Tetrahedron, 23,715  
(1967)
- 48.- K.O.Haustein, F.Markwardt y K.R.H.Repke, Eur. J.Pharm.  
10,1(1979)
- 49.- K.O.Haustein y J.Hauptmann, Pharmacology. 11,129(1974)

- 50.- M.Vasalle, J.Karis y B.F.Hoffman, Am.J. Physiol. 203, 433(1962)
- 51.- K.Meyer, Helv.Chem. Acta 35,2444(1952)
- 52.- U.Stache, K.Radschheit, W.Fritsch. y W.Haede; Ann.Chem. 603,(1974)
- 53.- T.Shiegei, M.Katori, H.Murase y S.Imai, Experientia 20, 512(1964)
- 54.- M.Okada y Y.Saito, Chem.Pharm.Bull 15,352(1967)
- 55.- M.Okada y Y.Saito, Chem.Pharm.Bull 16,2223(1968)
- 56.- F.G.Henderson y K.K.Chen, J.Med.Chem. 8,577(1965)
- 57.- B.K.Naidoo, T.R.Witty, W.A.Remers y H.R.Besch, J.Pharm. Sci. 63,1391(1974)
- 58.- E.Hauser, U.Boffo,L.Meister,L.Sawlewicz,H.H.A.Linde y K.Meyer, Helv.Chem.Acta 56,2782(1973)
- 59.- K.Meyer. Ger.Offen., 2,1371047(1962)
- 60.- H.J.Schmidt, K.D.Hoffmann, G.Kammann y H.Tönjes,Pharmazie 34,327(1979)
- 61.- C.L.Huang,H.N.Abranson, V.M.Wang. IRCS; Med.Sci.Libr. Compend.1977,5(1), 20
- 62.- F.Kaiser ibid. 4,52(1971)
- 63.- S.R.Megges y K.Repke en; "Proceeding of the First International Pharmacological Meeting"Estocolmo, 1961,Vol 3 p.271, W.Wilbrandt y P.Lindgren. Ed.Pergamon Press,Oxford Inglaterra,1963
- 64.- H.Kubinyi. Ger. offen 2,004 543(1971)
- 65.- F.Erjanec y S.Adamic , ibid. 155,251(1965)
- 66.- A.E. Farah,A.A.Alonsi.Life Sciences V.22 (1978)1139-48
- 67.- M.A.Kimble y R.M.Elenbaes, J.Am.Pharm. Ass. 14.362(1974)
- 68.- Cardiac Glycoside Therapy en; Evaluations of Drug Interactions p.295.American Pharmaceutical Association. Washington, 1973,1st ed.

- 69.- K.Repke Internist 7,413(1966)
- 70.+ K.S.Lee y W.Klaus, Pharmac Rev. 23,193(1971)
- 71.- F.Godfraind, Biochem Pharmac 24,823(1975)
- 72.- K.RH.Repke,R.Schön,W.Henke, W.Schönfeld y F.Dittrich,  
Ann.N.V.Acad.Sci. 242,203(1974)
- 73.- G.T.Okita, F.Richardson y BF.Roth-Scheater J.Pharm.exp.  
ther. 185,1(1973)
- 74.- T.Akera,S.I.Baskin, T.Tobin y T.M.Brody, Recent Adv.Stud.  
Struc.Metab.4,149(1974)
- 75.- T.Peters,R.H.Raben y O.Wassemann Eur. J.Pharmac. 26,  
166(1974)
- 76.- R.V.Marty,A.M.Kidwai y E.E.Daniel J.Pharmac exp ther.  
188,575(1974)
- 77.- B.G.Katzung,J.A.Munoz, D.Y.Shirachi,A.J.Trevor,H.H.chang  
y M.E.Wolff. Experientia 26,1189(1970)
- 78.- W.Güntert y H.H.A.Linde, Experientia 33,697(1977)
- 79.- A.E.Ruoho,L.E.Hokin,R.J.Hokin, R.J.Hemingway y S.M.Kupchan  
Science 159,1354(1968)
- 80.- M.E.Wolff y W.Ho. J.Pharm.Sci, 56,705(1967)
- 81.- J.E.Doherty y J.J.Kane Drugs 6,182(1973)
- 82.- Tesis. R.Rodriguez "Obtención de digitoxigenina de se-  
millas de thevetia" UNAM. ENEP "ZARAGOZA". 1982.
- 83.- H. Helfenberger y T. Reichstein, Helv. Chim. Acta, 31,  
1470(1948)
- 84.- L.F.Fieser y M. Fieser, Steroids, Reinhold Publishing  
Corporation, New York. 1959.