

2ij. 38



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

" Z A R A G O Z A "

OBTENCION DE DERIVADOS DE DIGITOXINA Y
ENSAYOS PARA SU BIOTRANSFORMACION
EN CELULAS DE Digitalis purpurea
EN SUSPENSION.

TESIS PROFESIONAL

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

México, D. F.

1 9 8 8

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

Capítulo	Página
INTRODUCCION	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVO E HIPOTESIS	12
III. MATERIALES Y METODOS	13
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	24
V. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	43
BIBLIOGRAFIA	44

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Especimen cultivado de <i>D. purpurea</i>	3
2. Estructura base de un cardiotónico	4
3. Representación de la unión de los anillos esteroidales	6
4. Biotransformación de β -metildigitoxina a β -metildigoxina	8
5. Biotransformación de β -acetildigitoxina a β -acetildigoxina	9
6. Mecanismo de reacción para la metilación de digitoxina	10
7. Mecanismo de reacción para la acetilación de digitoxina	11
8. Reacciones de biotransformación efectuadas por células de <i>Digitalis purpurea</i>	27
9. Espectro IR de la digitoxina	34
10. Espectro IR de la β -metildigitoxina	35
11. Espectro IR de la β -acetildigitoxina	36
12. Espectro RMN de la digitoxina	38
13. Espectro RMN de la β -metildigitoxina	39
14. Espectro RMN de la β -metildigitoxina más agua deuterada	40
15. Espectro RMN de la β -acetildigitoxina	41
16. Espectro RMN de la β -acetildigitoxina más agua deuterado	42

INDICE DE TABLAS

	Página
1. Algunas modificaciones estructurales en la genina de cardiotónicos	7
2. Composición del medio nutritivo Schenk-Hildebrant	22
3. Medio nutritivo Schenk-Hildebrant con fitohormonas	23
4. Caracterización de la β -metildigitoxina	24
5. Caracterización de la β -acetildigitoxina	28
6. Asignación de señales de los espectros IR para la digitoxina y sus derivados	33
7. Desplazamientos químicos para los espectros RMN ¹ H de digitoxina y sus derivados	37

INTRODUCCION

En años recientes se ha despertado un interés hacia la obtención de fármacos a partir de recursos naturales poco estudiados en nuestro país, tal es el caso de la Digitalis purpurea, especie originaria de Europa y Asia, que actualmente se localiza en los Estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Guerrero, y Chiapas, donde crece en forma silvestre y escasa.

La D. purpurea es una de las especies altamente explotada a nivel mundial para la obtención de glucósidos cardiacos como digitoxina y gitoxina, siendo el primero un fármaco de primera elección en terapia cardiovascular y que México importa en su totalidad (IMCE 1983).

En el laboratorio de investigación en Farmacología y Biotecnología de la ENEP-Zaragoza, se está desarrollando un programa de obtención de cardiotónicos mediante procesos tradicionales y Biotecnológicos a partir de especies de Digitalis.

Los estudios relativos a la implementación de procesos biotecnológicos se muestran como una alternativa para la transformación de glucósidos cardiacos mediante cultivos de células vegetales de varias especies de Digitalis, las cuales poseen la capacidad de biotransformar sustratos como la digitoxina a digoxina y purpurea glucósido A; digitoxina y purpurea glucósido A a gitoxina y purpurea glucósido B (Furuya et al. 1970, 1972); purpurea glucósido A a acetyl lanatósido A, éste último hidroxilado en C-12 para dar lanatósido C (Reinhard 1974, 1975), -los cardenólidos hidroxilados en C-12 tal como la digoxina son los de mayor valor medicinal-. Posteriormente el empleo del derivado β -metildigitoxina como sustrato de biotransformación con células de D. lanata condujo a este mismo autor a obtener casi el 100% de hidroxilación en C-12, resultando β -metil digoxina como único producto.

En el presente trabajo se planteó la obtención de los derivados de β -metildigitoxina y β -acetildigitoxina y su ensayo como sustratos de biotransformación con cultivos celulares de D. purpurea como parte del programa de selección de cultivos capaces de realizar la hidroxilación específica en C-12.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

Los glucósidos cardiacos son uno de los grupos de fármacos de más importancia y mayor empleo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, estos fármacos obtenidos de plantas producen en el corazón un efecto inotrópico positivo [34].

La hidrólisis de estos compuestos con enzimas o por métodos químicos producen una lactona esteroideal y una o más moléculas de azúcares. La porción no azucarada del glucósido es llamada genina.

La unión entre la genina y el azúcar se establece mediante un enlace glucosídico en el grupo 3-hidroxi del esteroide y el carbono anomérico.

Los glucósidos cardiacos son obtenidos de fuentes naturales, principalmente de las especies *Digitalis lanata* y *Digitalis purpurea*, las cuales han sido utilizadas en Europa y la Unión Americana desde hace mucho tiempo.

Descripción Botánica.

La *D. purpurea* es una planta que crece en montañas de cierta altura y por todos los montes de Europa Atlántica, incluso en algunas partes de América. Esta planta es alóctona y se encuentra en México especialmente en el estado de Puebla; fue introducida al país desde Inglaterra, cultivada y dejada crecer en forma silvestre o de manera exótica -Giral F. 1986-. Es una planta que puede alcanzar y superar el metro de altura, su tallo es un poco peludo, al igual que sus hojas de forma oval ó lanceolada; estas pueden medir de 10 a 35 cm de longitud y de 4 a 11 cm de ancho.

Las flores tienen cierto pedúnculo, son muy numerosas y se caen en racimos. Su corola es campaniforme, pero vuelta hacia abajo, la cara externa de los pétalos es igual en todas las flores y el interior es rosado con manchas blancas y negras. En algunas flores es completamente blanco. Fig. 1.

Componentes de la *Digitalis purpurea*

Posee digitoxina en 0.2 a 0.3%, el purpurea glucósido A y B, digitalina, gitalina, gitoxina, glucogitaloxina, saponina, digitonina, un aceite volátil que contiene estearopteno, digitalosmina, la cual tiene un olor nauseabundo y sabor amargo, ácido antiarrínico, una enzima oxidasa en hojas recién secadas y una pequeña cantidad de ácido tánico. [9].

La proporción en la cual los componentes de la digitalis están presentes depende no sólo de la especie, la subespecie, la variedad y raza biológica a la que pertenece, también depende de



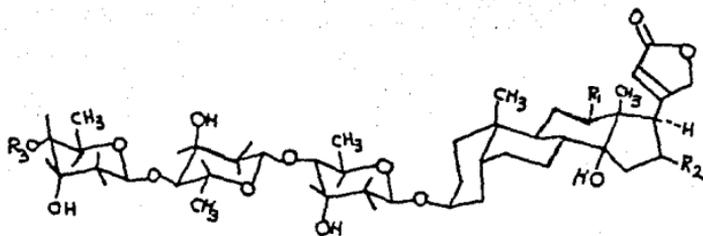
Fig. 1. Especimen cultivado de *D. purpurea*

la manera en como se desecan las hojas y como se conservan -debido a las enzimas presentes-, así como de las condiciones a las cuales ocurre la extracción.

Estructura Química y Biosíntesis

La digitoxina y la digoxina (Fig. 2) poseen un esqueleto esteroidal 14 hidroxilo y ambas contienen una lactona insaturada en posición 17 β y una unión glucosídica en posición 3 β . Sólo difieren entre sí por la presencia de un grupo hidroxilo en C-12 en el caso de la digoxina, confiriéndole una mayor potencia.

Autores como Granwold, Caspi, Jacobson et al, (18, 7, 27), han encontrado que la ruta biosintética en la planta para un cardenólido es la de un esteroide partiendo de acetyl-Co-A y teniendo como intermediarios el ácido mevalónico, el escualeno, el colesterol, la pregnenolona y la progesterona. A partir de este último intermediario la formación del anillo lactona característico de cardenólidos puede ser llevada a cabo por una ruta alternativa como la de los ácidos norcolanólicos o de los pregnanos [35].



<u>Naturales</u>	R 1	R 2	R 3
Digitoxina	H	H	H
Gitoxina	H	OH	H
Digoxina	OH	H	H
Purpurea glucósido A	H	H	Glucosa
<u>Semisintéticos</u>			
β -metildigitoxina	H	H	$-\text{CH}_3$ 3
β -acetildigitoxina	H	H	$-\text{OCOCH}_3$ 3

Fig. 2. Estructura base de un Cardiotónico.

Propiedades Farmacológicas de los Cardiotónicos

La actividad farmacológica reside en las geninas. Sin embargo las moléculas de azúcar modifican la solubilidad y las propiedades para distribuirse, ellas influyen principalmente su absorción.

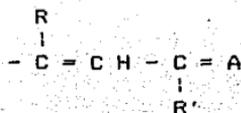
Según F. Kaiser [30] las propiedades de un cardiotónico ideal son:

- a. Absorción completa
- b. Inicio rápido de acción
- c. Reducción de la acumulación en el organismo, mediante un incremento en la velocidad de eliminación.

En general, las actividades de las geninas son de corta duración en comparación con los glucósidos cardiacos y por tanto las geninas no se emplean terapéuticamente.

Para su actividad todos los cardiotónicos tienen los sustituyentes (OH, azúcares, lactona) en posición β con respecto al plano esteroidal; un OH en posición 14 y la lactona en posición 17 β que puede ser de 5 ó 6 miembros, aunque específicamente es importante su densidad electrónica.

Donde :



A = heteroátomo

O=, -N=

R y R' = hidrógenos

Deben estar presentes las uniones cis / trans / cis de los anillos A y B, B y C, C y D respectivamente en el núcleo esteroidal del cardiotónico Fig. 3.

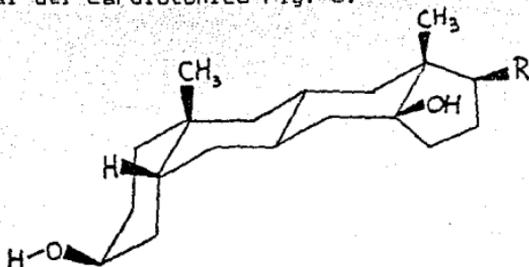


Fig. 3. Representación de la unión de los anillos esteroidales.

Finalmente cabe señalar que su mecanismo de acción no ha sido establecido, algunos autores como Gelbert [14] opinan que sólo actúan por inhibición de la bomba de Na⁺ y K⁺ ATPasa en menor o mayor grado y otros [58] señalan que actúa sobre un receptor en el músculo cardíaco pero aún no ha sido localizado.

Biotransformación

La transformación de digitoxina en digoxina se muestra difícil por vía química debido a la naturaleza lábil del grupo hidroxilo en C-14, el cual es fácilmente removido en condiciones ácidas [49]. Esta limitante para producir cardiotónicos por medios químicos de manera eficiente, ha orientado a realizar modificaciones químicas en la digitoxigenina con el objeto de aumentar su actividad farmacológica, como por ejemplo la oxidación del OH de la posición 3 de la digitoxigenina, ó la introducción de halógeno, ó de derivados sulfonados, Tabla 1.

No obstante esta diversidad de compuestos, las características intrínsecas que poseen los cardiotónicos de origen natural les confieren un uso preferente, como es el caso de la digoxina que por otra parte ha ocasionado problemas de acumulación de digitoxina en países como Alemania [22], uno de los principales productores de éste tipo de fármacos; de ahí que se buscaran alternativas para el uso de este "subproducto". Una de ellas ha sido llevada a cabo por Reinhard (2), quien añadió digitoxina como sustrato de un cultivo de células en suspensión de D. lanata y encontró la formación de digoxina junto con purpúrea glucósido A.

 TABLA 1. Algunas Modificaciones estructurales de geninas de
 cardiotónicos.

Tipo de				
Modificación	Compuesto	Autor	Efecto	Prueba
Hidroxilo en 3	3-desoxidigi- toxinigenina	Sayto [42]	Actividad si- milar a la di- gitoxigenina.	corazón de rana
Cadena lateral	prednisolona OH-14	Schutz [47]	similar a los digitá- licos.	corazón de cuyo
	tipo de este- roides 17 β -(3-furil).	Minesita [40]	idem	corazón de cuyo
N-análogos	3 α y 3 β -amino- desoxi-digito- xigenina.	Meyer [39]	efecto inotró- pico positivo	corazón de cuyo
Derivados sulfonados	Tioacetato de digitoxigenina	Huang [24]	similares a digitoxige- nina sin efeg- tos tóxicos.	corazón de rana y cuyo

Posteriormente mostró que cuando se agrega β -metildigitoxina como sustrato de las células en suspensión de *D. lanata* la transformación se dirige únicamente a la formación de β -metildigoxina, siendo este producto más potente que la digoxina. Fig. 4.

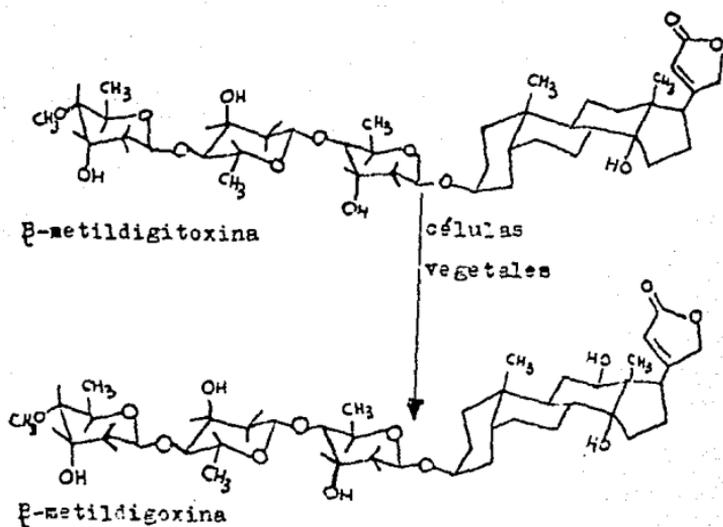


Fig. 4. Biotransformación de β -metildigitoxina en β -metildigoxina [2].

Existe la posibilidad de que si se emplea la β -acetildigitoxina como sustrato en células de *D. lanata* se transforme en β -acetildigoxina. Fig. 5.

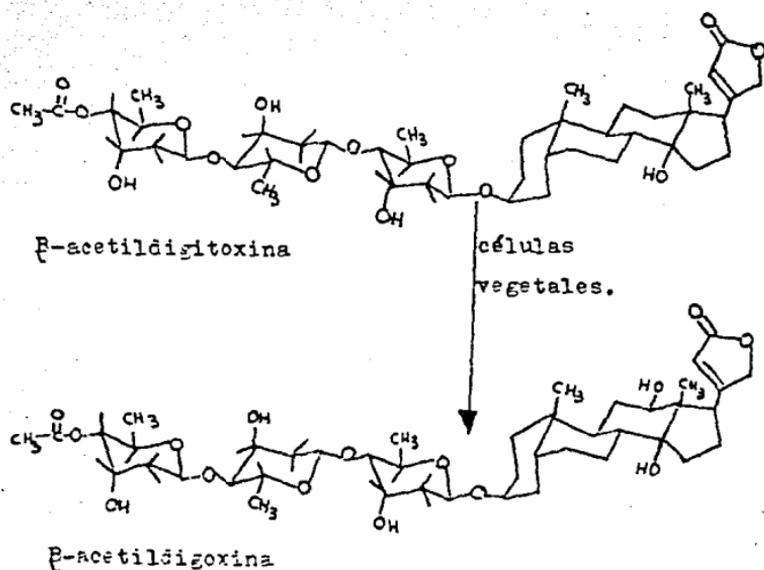


Fig. 5. Biotransformación de β -acetildigitoxina en β -acetildigoxina [2].

2. Acetilación. No obstante que existen varios métodos de acetilación [54] como por ejemplo: anhídrido acético con cloruro de zinc ó acetato de sodio como catalizador, anhídrido acético mezclado con ácido acético y ácido perclórico como catalizador; la selección del método a emplear está determinado por la naturaleza del oxhidrilo a acetilar, en este caso el oxhidrilo de la posición cuatro de la digitoxosa terminal. De ahí que los métodos antes mencionados fueran rechazados: el primero porque no es capaz de activar este OH y el segundo porque el ácido perclórico es tan fuerte que se corre el riesgo de hidrolizar los azúcares de la digitoxina (Fig.2).

El método de acetilación con ácido acético que emplea a la Diciclohexilcarbodiimida como catalizador favorece este tipo de reacción debido a que la DCC, reacciona con el ácido carboxílico produciendo un intermediario con el grupo saliente en forma de diciclohexilurea, teniéndose como resultado que la molécula de digitoxina pueda sufrir acetilación [48].

Digitoxina = R-OH

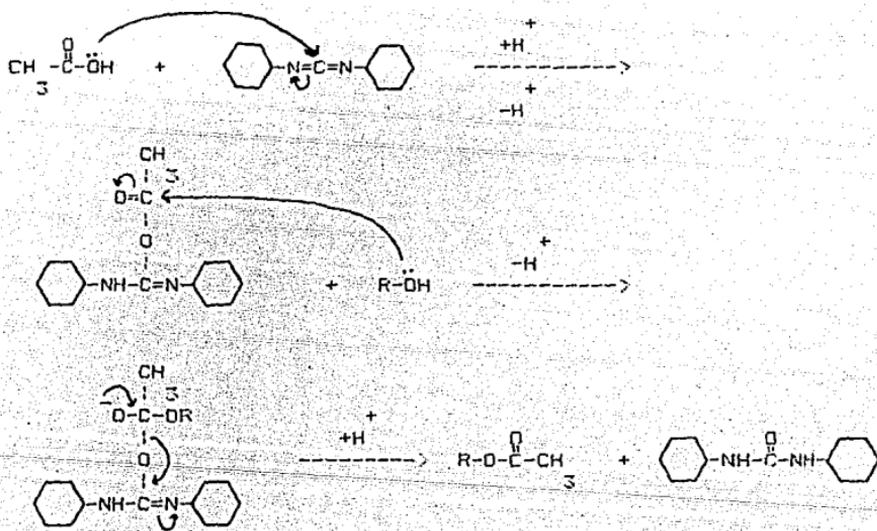


Fig. 7. Mecanismo de reacción [48] de acetilación de la digitoxina.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVO E HIPOTESIS.

A. Planteamiento del problema

La obtención de cardiotónicos con una buena actividad farmacológica se muestra difícil por vía química, debido a la naturaleza lábil del OH en C-14 que es fácilmente removido en condiciones ácidas cuando se intenta la transformación de digitoxina a digoxina como ha sido demostrado por Söndheimer [49].

De ahí que se presente la alternativa de efectuar reacciones de biotransformación por medio de células vegetales con sustratos adecuados que favorezcan la hidroxilación específica en C-12 del aglicón de estas moléculas, las cuales presentan mayor actividad.

B. Objetivos

1. Obtención y caracterización de la β -metildigitoxina y β -acetildigitoxina a partir de digitoxina estándar y obtenida de un extracto de planta D. purpurea.
2. Ensayo de los derivados de digitoxina como sustratos de biotransformación con células de D. purpurea.

C. Hipótesis

Se realizará la metilación y acetilación de digitoxina para obtener sustratos más específicos y con mayor capacidad para sufrir hidroxilación en el C-12 por acción de células de D. purpurea en suspensión.

III. MATERIALES Y METODOS.

A. Materiales

- 3 matraces Erlenmeyer de 500 ml
- 2 probetas de 50 ml
- 2 buretas de 25 ml
- 1 matraz bola 100 ml
- 1 matraz bola de tres bocas 100 ml
- 2 embudos tallo largo
- 2 barras magnéticas
- 1 recipiente de plástico 4 l.
- 1 soporte universal
- 2 anillos de fierro
- 4 pinzas de 3 dedos con nuez
- 1 embudo de separación de 1000 ml
- 1 embudo de separación de 125 ml
- papel filtro Whatman no. 40
- 1 termómetro de -10 C a 400 C
- placas de vidrio para CCF de 10 X 20 y 20 X 20 cm
- 1 cámara para cromatografía en capa fina

B. Equipo

- Tanque de nitrógeno
- Caframo mod. Warton Ont, Stirrer type RZR1
- Rotavapor mod. Buchi. Lab. Tech AG-CH-9230 Flawil/Schaeetz. 133833
- Equipo de destilación. 24/40 Pyrex
- Polarímetro/ Bausch and Lomb cat 33.40.10 serial 0921027R
- Aparato para punto de fusión Fisher-Jones.
- Balanza analítica Mettler
- Espectrofotómetro de IR Unicam SP1050
- Espectrofotómetro de RMN Varian EM 3601

C. Reactivos (R.A.)

Acetato de etilo	Merck
Acetona	"
Acido acético	"
Acido clorhídrico	"
Acido tricloroacético	"
Alúmina	"
Anhidrido acético	"
Cloramina T	"
Cloroformo	"
Diciclohexilcarbodiimida	"
Digitoxina	Sigma
Dimetilformamida	JT Baker
Etanol	"
Eter etílico	"
Eter de petróleo	"
Heptano	Merck
Hidróxido de sodio	JT Baker
Metanol	"
Nitrato de estroncio	"
Piridina	"
Sulfato de dimetilo	Merck
Sílica gel para columna	"
Sílica gel para CCF F	"
	60 254
Tolueno	JT Baker
Oxido de plomo	"

D. Metodología

1. Preparación de hidróxido de estroncio $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$

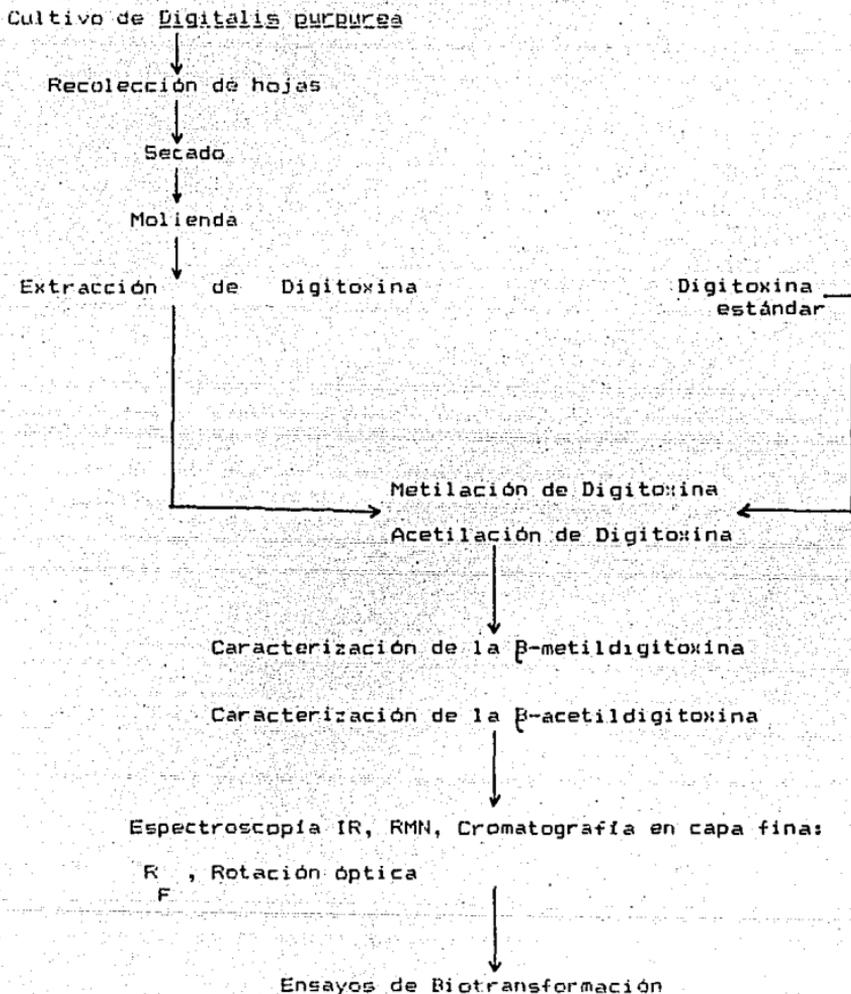
A 2 g de nitrato de estroncio disueltos en 3 ml de agua destilada se adicionaron 3 g de hidróxido de sodio disueltos en un ml de agua, la solución se colocó en hielo para obtener los cristales de hidróxido de estroncio. Si se desea purificar el producto se redisuelve en agua destilada recién hervida, se evapora, se filtra en embudo Büchner y se enjuaga con agua fría.

Se evitó la exposición prolongada del producto con el medio ambiente, ya que tiende a carbonatarse. El rendimiento fue del 75%. Debido a la fácil carbonatación que presenta el hidróxido de estroncio fue necesario efectuar su valoración, la cual se realizó de manera siguiente:

Se pesó aproximadamente 0.1 g de hidróxido de estroncio y se disolvió con 20 ml de agua recién hervida en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, se adicionó fenolftaleína y se tituló con ácido clorhídrico 0.5 N para encontrar la alcalinidad impartida como hidróxido. Para encontrar la alcalinidad impartida como carbonato, se adicionó anaranjado de metilo a la misma solución y se tituló con ácido clorhídrico.

Cada ml de ácido clorhídrico 0.5 N requerido para el punto final con fenolftaleína es equivalente a 66.45 mg de hidróxido de estroncio y cada ml de ácido clorhídrico 0.5 N requerido para el punto final con anaranjado de metilo es equivalente a 36.9 mg de carbonato de estroncio.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



1. Recolección

Esta se realizó cuando la planta tenía un año y medio de edad, se menciona que la máxima concentración de cardiotónicos en la planta se alcanza en días soleados y al medio día, después de este tiempo comienzan a decrecer, ya que los glucósidos emigran a otras partes de la planta. Por lo tanto la recolección se efectuó bajo las condiciones señaladas y las hojas fueron colectadas de la parte media de la planta, las más enteras y más sanas, además cuando empezaban a abrir las flores de la planta; esto se realizó en los meses de agosto a noviembre.

2. Secado

Esta operación se efectuó en las hojas recién cortadas con el fin de inactivar las enzimas responsables de la degradación de los glucósidos digitálicos. Si las hojas no eran inmediatamente secadas se guardaban en un cuarto frío a -5 grados centígrados.

El secado se llevó a cabo en una estufa de charolas con corriente de aire a 60 grados centígrados, aunque previamente se realizó un presecado del material por simple exposición al sol.

3. Molienda

Una vez secadas las hojas, se molieron dos veces en un molino manual para obtener un tamaño de partícula malla 20-30.

Si no se van a usar pronto, las hojas deben conservarse en frascos de cristal y tapón esmerilado siendo envasadas en días de buen sol y aire seco, ya envasadas se deben guardar al abrigo de la luz y la humedad.

4. Aislamiento del extracto crudo de digitoxina

a. Se molieron 500 g de hoja seca.

b. Se adicionaron cuatro litros de etanol al 60% y se agitó mediante un caframo a la velocidad 8^opbr veinticuatro horas.

- c. Se concentró el extracto en un rotavapor hasta eliminar la máxima cantidad de etanol.
- d. Se eliminó la grasa con 750 ml de una mezcla de éter de petróleo-heptano (1:1), agitando con un caframo a la velocidad 10 por 30 min y dejando reposar un día completo.
- e. La fase orgánica se separó de la acuosa y se procedió a eliminar las clorofilas con una solución de 75 g de acetato de plomo en 500 ml de agua destilada a una temperatura controlada de 59 grados centígrados.
- f. Las clorofilas precipitadas se eliminaron por filtración con embudo Büchner.
- g. Al filtrado obtenido del paso anterior se le extrajo el conjunto de glucósidos cardíacos con tres porciones de 350 ml c/u (por separado) de cloroformo por 20 minutos, utilizando el caframo a la velocidad 9.
- h. Se concentró el cloroformo y se procedió a separar la digitoxina cruda.
- i. La digitoxina cruda se separó mediante placas preparativas usando como sistema de elución cloroformo-metanol (9:1).
- j. Para terminar de purificar el crudo obtenido, se dispersó en una solución de acetato de etilo - metanol - agua (77:1.5:1.5), de esta manera se disuelven las clorofilas remanentes y precipita la digitoxina cruda [37].

5. Obtención de la β -metildigitoxina

Esta reacción se llevó a cabo con burbujeo de nitrógeno. En un matraz -de tres bocas- de 100 ml, se depositaron 500 miligramos (6.5×10^{-4} mol) de digitoxina previamente secada y se disolvieron en una mezcla de 3.35 ml de dimetilformamida con 3.35 ml de tolueno, se agregaron 0.65 g (5×10^{-3} mol) de hidróxido de estroncio (previamente valorado) y 0.335g (4.29×10^{-3} mol) de alúmina activada.

La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos, enseguida se adicionaron 1.15 ml (1.1×10^{-2} mol) de sulfato de dimetilo disuelto en 6.15 ml de tolueno por goteo a través de un embudo de adición, y se continuó la agitación de la mezcla por 4 horas a temperatura ambiente.

Al cabo de este tiempo la mezcla se diluyó con 25 ml de cloroformo, se filtró sobre sílica gel, se lavó con 15 ml de cloroformo y se agregaron 6 ml de piridina; se concentró a vacío y se separó la β -metildigitoxina por cromatografía preparativa, empleando como sistema de elución cloroformo-metanol (9:1), el proceso se realizó con el estándar y con el crudo de digitoxina.

6. Obtención de la β -acetildigitoxina

En un matraz bola de 50 ml, se disolvieron 500 miligramos
-4
(6.5×10^{-4} mol) de digitoxina en 7 ml de piridina, se mezclaron
por 5 minutos, y se colocaron en baño maría a 5 C, después se
agregaron mediante un embudo de adición 1.5 ml de una mezcla de
ácido acético-anhidrido acético (2:1), junto con 1.5 gramos
-3
(7.2×10^{-3} mol) de dicitclohexilcarbodiimida previamente fundida;
se dejó agitar; se filtró a gravedad y se adicionó el filtrado a
hielo para dar un precipitado de β -acetildigitoxina; el precipi-
tado se recuperó por filtración en embudo Büchner y se puri-
ficó por cromatografía preparativa, empleando como sistema de
de elución cloroformo-metanol (9:1). Se realizó la acetilación
en el estándar de digitoxina y en el crudo de digitoxina obtenido
de la planta.

7. "Ensayos de Biotransformación" [3]

Cultivo en suspensión

En condiciones de asepsia se tomaron 5 g de tejido calloso de *D. purpurea*, se disgregó y se depositó en un matraz de cultivo que contenía 50 ml de medio nutritivo Schenk-Hildebrandt, A-1; A-2; A-3 ó D (tabla 2 y 3), el cultivo se dejó desarrollar hasta su máximo crecimiento (previamente determinado en cada medio). A partir de esta suspensión se procedió a hacer un subcultivo tomando una alícuota del sobrenadante que se depositó en 30 ml de medio fresco correspondiente. El subcultivo se dejó desarrollar por 3 días a 24 grados centígrados, agitación 100 rpm y fotoperíodo normal; enseguida se agregó el sustrato β -metildigitoxina (1mg/ml) disuelto en metanol al 50%, se continuó la incubación del cultivo y cada tres días se tomó una alícuota del medio para evaluar la transformación del sustrato. Cada alícuota de la cinética de biotransformación se filtró; el filtrado se extrajo con 5 ml de cloroformo por tres veces, se juntaron estos extractos y se evaporaron a sequedad bajo presión reducida. El residuo se redisolvió en 0.5 ml de cloroformo-metanol (1:1), de ésta solución se depositó una muestra en una placa cromatográfica de sílica gel, así como estándares de digitoxina, β -metildigitoxina, y β -metildigoxina. La placa se desarrolló en un sistema de disolventes cloroformo-metanol 9:1, los compuestos se detectaron por revelado con solución de ácido tricloroacético-cloramina T y calentamiento a 100 grados centígrados.

TABLA 2. Composición del medio nutritivo Shenck-Hildebrand

<u>Solución A</u>	mg/ml
KNO ₃	2500
MgSO ₄ .7 H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
CaCl ₂ .2 H ₂ O	200

<u>Solución B</u>	
MnSO ₄ .4 H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	5
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	1
KI	1
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.2
Na MoO ₂ .4 H ₂ O	0.1
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.1

<u>Solución C</u>	
FeSO ₄ .7 H ₂ O	15
Na EDTA	20

Sacarosa	30 000
pH	5.8

TABLA 3. Medio nutritivo Schenk-Hildebrandt con fitohormonas

Clave	2,4-Diclorofenoxiacético mg/ml	Cinetina mg/ml
A-1	1	-----
A-2	2	-----
A-3	3	-----
D	1	1

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

A. Crudo de digitoxina

Se obtuvieron 3.6 g de crudo de cardiotónicos totales que re presentan un 0.62% en base seca con respecto a los 500 g de hoja, considerándose aceptable puesto que entra en el rango reportado en la literatura (0.15-0.4 % con no menos de 0.3% como digitoxina), [59,16].

B.1 β -metildigitoxina

Los resultados de caracterización de la β -metildigitoxina se sumarian en la tabla 4 y se discuten a continuación.

TABLA 4. Caracterización de la β -metildigitoxina.

	Rendimiento	R F	Punto de fusión	Rotación óptica
Reportado	58%	0.72	215-219 °C	+ 2.3 °
Experimental	44.5%	0.72	150 °C, 210 °C	+ 2.36 °

1. Rendimiento

Los factores que influyeron de manera importante en el rendimiento de la reacción fueron:

a. Control estricto de la humedad. La cual fue un factor crítico ya que de estar presente el agua, el ion alcóxido revertía al OH original (ver mecanismo de reacción pág. 10). Una manera de evitar la humedad en el seno de la reacción fue la presencia de alúmina [55] y la otra no menos importante fue la purificación y destilado de disolventes.

b. Cantidad y tipo de base empleada. El hidróxido de estroncio fue la base adecuada para sustraer el protón del OH de la posición 4 de la digitoxosa terminal -dadas las características de que ese hidroxilo es de un carbohidrato- [51], sin ocasionar la degradación de la digitoxina [46], como ocurre en el caso de emplearse hidróxido de sodio.

La concentración relativamente alta del nucleófilo -ion alcóxido- y de la base -hidróxido de estroncio- permitieron una reacción del tipo SN (bimolecular), así como de los disolventes

2

apróticos como la dimetilformamida y el tolueno los cuales fueron capaces de no solvatar el ion alcóxido formado por lo que probablemente aumente su nucleofilicidad y permite el progreso de la reacción. [20].

c. Agente metilante -sulfato de dimetilo-, debido a la temperatura y humedad ambientes este reactivo empieza a hidrolizarse en ácido sulfúrico y metanol, por lo que fue necesario agregar piridina que actuó como una base débil [31], para evitar que el ácido sulfúrico producto de la hidrólisis del agente metilante degradara a la digitoxina metilada pasado el tiempo de reacción de metilación.

El burbujeo de nitrógeno permitió contar con una atmósfera inerte y evitar que la base se carbonatara en detrimento de la reacción. La temperatura baja ayudó a que la reacción de metilación sólo se dirigiera a un hidroxilo de la digitoxina.

Las limitaciones del método de la reacción de metilación fueron las siguientes:

- La dimetilformamida; aunque éste disolvente favorece la reacción de metilación, tiene el inconveniente de que provoca baja recuperación de la β -metildigitoxina, por la dificultad de eliminarla [11], lo cual trae como consecuencia disminución del rendimiento.

-El hecho de contar con una mezcla de reacción de dos fases, una líquida constituida por tolueno, dimetilformamida y sulfato de dimetilo en los cuales se encuentra disuelta la digitoxina y una fase sólida constituida por el hidróxido de estroncio y la alúmina ya que en la literatura se reporta que estas reacciones por no tener una adecuada superficie de contacto producen rendimientos bajos [32].

Con respecto al método reportado de purificación y recuperación de la β -metildigitoxina que consistió en una distribución multiplicativa -mediante el uso de disolventes- se observó que disminuía el rendimiento, por lo tanto se optó por emplear la cromatografía preparativa, obteniéndose mejores resultados.

2. Determinación de R_F

Una vez realizada la reacción de metilación tanto en el crudo como en el estándar de digitoxina, se tomaron placas de cromatografía en capa fina donde se reveló un compuesto con un R_F de 0.72, mayor al de la digitoxina que quedó sin reaccionar e igual al de la β -metildigitoxina estándar. Esta determinación es muy importante porque permite corroborar si la reacción de metilación ha ocurrido. Cabe señalar que el crudo contenía cierta cantidad de gitoxina la cual probablemente se metiló dando lugar a la aparición de un compuesto con un R_F mayor a la gitoxina.

F

3. Punto de Fusión.

Este fue determinado con el objeto de identificar a la β -metildigitoxina, la cual mostró dos puntos de fusión, 150 y 210 grados centígrados que pueden ser interpretados como modificaciones polimórficas [33].

4. Rotación Óptica

Al comparar el dato $[\alpha]_D^{20} = +2.3^\circ$ reportado en la literatura, con el que se determinó de $+2.36^\circ$, se infiere que se tiene un compuesto de pureza óptica aceptable [56].

5. Ensayos de biotransformación

Las diferentes cinéticas de biotransformación con adición de digitoxina al cultivo celular de *D. purpurea* mostraron la conversión a purpura glucósido A, estos resultados concuerdan con los reportados por Reinhard. Por otra parte cuando se adicionó β -metildigitoxina a los cultivos, se observó la aparición incipiente de digitoxina y digoxina (fig 8); la formación de éste último producto origina una serie de especulaciones respecto al tipo de reacciones que efectúan los cultivos celulares de *D. purpurea*, ya que se esperaba la transformación específica a β -metildigitoxina.

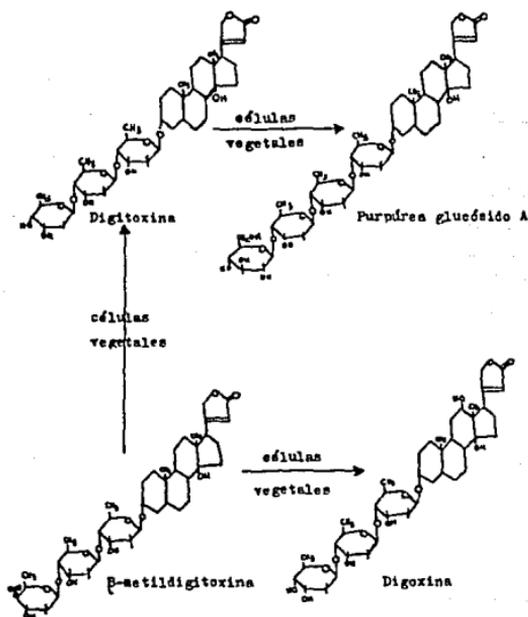


Fig. 8. Reacciones de biotransformación efectuadas por las células de *D. purpurea*.

B.2 β -acetildigitoxina

Para el caso de este derivado los resultados se presentan en la tabla 5.

TABLA 5. Caracterización de la β -acetildigitoxina

	Rendimiento	R F	Punto de fusión	Rotación óptica
Teórico	-----	0.69	-----	-----
Experimental	63%	0.69	160 °C, 220 °C	+ 16.17 °

1. Rendimiento

Los factores que influyeron en la reacción de acetilación fueron los siguientes:

a. Activación del OH de la digitoxina en la digitoxosa terminal con el agente adecuado, lo cual se llevó a cabo por medio de la dicitclohexilcarbodiimida -DCC-.

b. Control de humedad. En la reacción éste se llevó a cabo mediante el empleo de anhídrido acético y un reactor perfectamente cerrado, de ahí que la adición de reactivos -DCC, ácido acético y el mismo anhídrido acético- se realizara a través de un embudo de adición y la DCC no se transformara en Dicitclohexilurea [48].

c. Temperatura, en la reacción fue controlada a 40 grados centígrados por las razones siguientes:

- Para obtener una mayor cantidad de isómero β [25].
- Porque de rebasar los 40 grados centígrados, podría ocurrir una acetilación completa de la molécula de digitoxina [26].

b. Al igual que la reacción de metilación tuvo la limitante de presentar una mezcla de reacción bifásica: la fase líquida constituida por piridina, ácido acético, anhídrido acético, en los cuales se disolvió la digitoxina, y una fase sólida formada por la DCC, lo cual repercutió de manera importante en el rendimiento, porque en estas reacciones la superficie de contacto no es alta como ya se mencionó anteriormente [32].

e. El método de purificación por cromatografía preparativa también influyó en el rendimiento; la cromatografía en columna tal vez sea una alternativa para mejorarlo.

Por último se considera que el rendimiento fue adecuado tomando en cuenta las características de éste tipo de reacciones, aunque cabe aclarar que no se pudo contar con un dato teórico.

2. Determinación de $\frac{R}{F}$

Las muestras acetiladas de digitoxina estándar y del crudo fueron aplicadas en placas de cromatografía en capa fina, donde se determinó un $\frac{R}{F}$ de 0.69 que correspondía con el estándar de

β -acetildigitoxina, el cual está acetilado en posición 3 y el que se obtuvo está acetilado también en la última digitoxosa terminal pero en posición 4; se procedió a compararlos por ser isómeros.

3. Punto de fusión

La β -acetildigitoxina presentó dos puntos de fusión (al igual que la digitoxina metilada) que fueron 160 y 220 grados centígrados, los cuales se interpretaron como un polimorfismo, como ya se mencionó anteriormente [33].

4. Rotación óptica

Esta constante tuvo el valor de + 16.17°, no se contó con un valor reportado en la literatura con el cual compararlo.

Martindale [36] señala que la forma beta de la digitoxina β acetilada obtenida del lanatóside A, es más insoluble en soluciones acuosas que la forma alfa, tanto una como la otra presentan actividad, pero si se contempla este problema desde el punto de vista estabilidad de un medicamento y haciendo analogía con el compuesto acetilado en 4, sería conveniente trabajar con la forma alfa en lugar de la forma beta.

Stoll, Kreis [50], quienes han trabajado con β -acetildigitoxina obtenida del lanatóside A, mencionan que la forma alfa de la digitoxina acetilada puede ser obtenida de la forma beta por reflujo con alguno de los siguientes disolventes: metanol, etanol, alcohol isopropílico, solución de ácido acético 0.1 N ó solución de piridina en agua, en una proporción de 5 partes de digitoxina acetilada en beta con quinientas partes de disolvente.

5. Ensayo preliminar de actividad farmacológica de la β -acetildigitoxina

Dentro de los objetivos de este trabajo estaba realizar los ensayos de biotransformación de los derivados de digitoxina considerando que la β -acetildigitoxina acetilada en 4 podría sufrir una hidroxilación en C-12, mediante células de *D. purpurea* para transformarse en β -acetildigoxina; sin embargo se optó por determinar su actividad farmacológica en base a que la β -acetildigoxina tiene la misma actividad farmacológica que la digoxina - no sería redituable obtener un producto con la misma actividad- y porque la β -acetildigitoxina obtenida del lanatóside A es menos potente que la digitoxina como fármaco -pero se prefiere por ser menos tóxica-.

Por lo tanto la determinación farmacológica consistió en probar a la β -acetildigitoxina en músculo cardíaco de perro [44], encontrándose una potencia aparentemente similar a la digitoxina,

la cual a la concentración de 5×10^{-6} ug/ml presentó actividad a los cinco minutos; a los seis minutos presentó los efectos tóxicos de un cardiotónico normal. Estos estudios habría que confirmarlos especialmente en su absorción ya que la modificación que se hizo fue en uno de los azúcares, los cuales dirigen esa propiedad en mayor ó menor grado y no el esteroide que es donde reside la actividad del cardiotónico [44].

C. Análisis espectroscópico de IR y RMN para los derivados de digitoxina

Cabe señalarse que la digitoxina es una molécula grande que al introducirle ya sea un grupo metilo ó acetilo produce en los espectros de IR y RMN, una modificación específica en las señales, no alterando en gran medida las señales de la estructura base de la digitoxina para IR (KBr) 3500, 2960, 2330, 1750, 1680-

1620, 1485-1445, 1435-1425 y 1150-1070 cm^{-1} y para H NMR [CDCl_3], (CH) Si δ 0.84 (d,3H), 1.15 (d,3H), 3.23 (s,5H), 4.0 (s,1H), 5 (s,1H), las cuales son muy similares a sus derivados, por lo tanto las señales se resumen en las tablas 6 y 7 respectivamente.

C.1 Espectroscopia para la β -metildigitoxina

a. Infrarrojo

En el espectro IR de la digitoxina metilada Fig. 10, fue difícil identificar plenamente la presencia del grupo metoxilo, el cual generalmente se observa entre 2830-2815 cm^{-1} , pero existe el problema de que la señal queda traslapada con la señal de interacción C-H que se encuentra entre 3200-2500 cm^{-1} , aunque este grupo también puede observarse entre 1460-1410 cm^{-1} , las demás señales como se aprecia en la tabla 6 y la figura 9, son similares a la digitoxina.

b. Resonancia magnética nuclear

En el espectro de resonancia para la digitoxina metilada Fig. 13 aparecen las siguientes señales:

1
H NMR [CDCl_3], (CH) Si δ 0.84 (d,3H), 1.15 (d,3H), 2.8-3.3(m,4H) 3.5 (s,3H), 4.0 (s,1H), 5.0 (s,1H).

En la región de aproximadamente 3.5 ppm se observa una señal fina característica de los hidrógenos de un metoxilo, la cual no desaparece al hacer el intercambio con agua deuterada, como se ve en la Fig. 14, con lo que se comprueba la presencia de un metoxilo en la digitoxina. Los espectros de RMN de la digitoxina metilada y de intercambio con agua deuterada son similares a los de la digitoxina estándar, tabla 7 y Fig 12. Con la salvedad de que en la señal de los hidrógenos de los oxhidrilos aparece un multiplete.

C.2 Espectroscopia para la β -acetildigitoxina

a. Infrarrojo

Las señales que nos confirman la presencia del grupo acetilo son principalmente a los 1365, 1250, 1240, 1165 cm^{-1} , Fig. 11, todas las demás señales son similares a la digitoxina estándar, Fig. 9, tabla 6.

b. Resonancia Magnética nuclear

En el espectro de resonancia para la digitoxina acetilada Fig. 15, aparecen las siguientes señales:

$^1\text{H NMR}$ [CDCl_3 , (CH_3)₃Si] δ 0.84 (d,3H), 1.15 (d,3H), 2.0 (d,3H),

3.23 (s,4H), 4.0 (s,1H), 5.0 (s,1H). La señal que se observa

aproximadamente a las 2 ppm (doblete) en la digitoxina acetilada es característica de acetilo. Esta señal no desapareció al realizar el intercambio con agua deuterada lo que viene a corroborar la presencia de este grupo, Fig. 16.

Las demás señales son similares a la digitoxina estándar Fig. 12 tabla 7.

 TABLA 6. Asignación de señales de los espectros IR de la digitoxina y sus derivados (β -metildigitoxina y β -acetildigitoxina).

Frecuencia cm ⁻¹ ✓	Intensidad de absorción	Enlaces o grupos
3680-3060 3500	f	Vibración longitudinal de OH Asociación de polímeros o enlace intramolecular.
3200-2500	m	Quelación intramolecular, puente de hidrógeno y carbonilo, si no aparece ✓CH puede aparecer como meseta.
2962-2853 2960	f	Vibraciones longitudinales C-H alcano ν_{as} , ν_s .
2830-2815 2830; 1460-1410	m	CH - en -OCH 3 3
1760-1740 1750	f	Vibraciones longitudinales de ésteres de lactona y carbonilo
1735	f / d	Ester con intensidad intermedia entre cetona y carboxilo
1680-1620	m	Vibración longitudinal del enlace C=C, alqueno conjugado.
1550-1610	f	Función C=O cuando un ácido es conjugado con otra molécula o una sal inorgánica.
1485-1445	m	Deformación C-H, ν_{as} , CH ₂ tijera alcano -CH=
1425-1435	f	Alcoholes terciarios
1240, 1165, 1380-1365 1250-1200; 1450	f	CH-O-OR
1225-1175	f	Alcoholes terciarios, deformaciones de OH y C-O
1150-1070	f	Vibración long. de C-O y alcoholes terciarios

f=fuerte, m=media, d=débil.

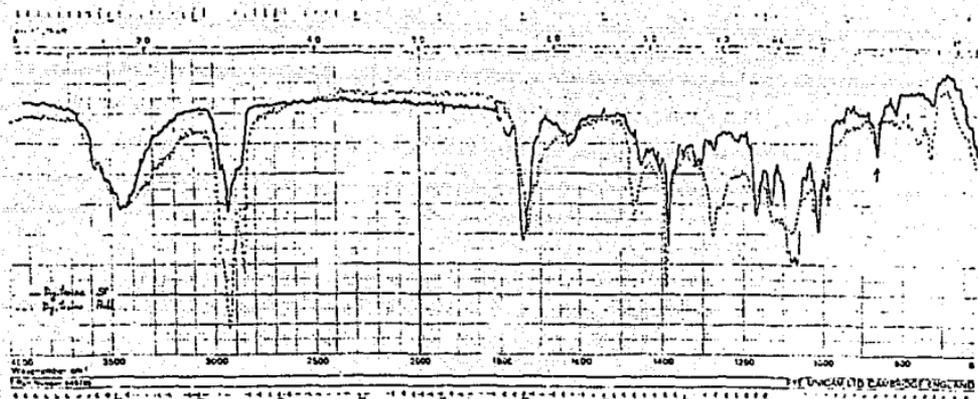


Fig. 9. Espectro IR de la Digitoxina

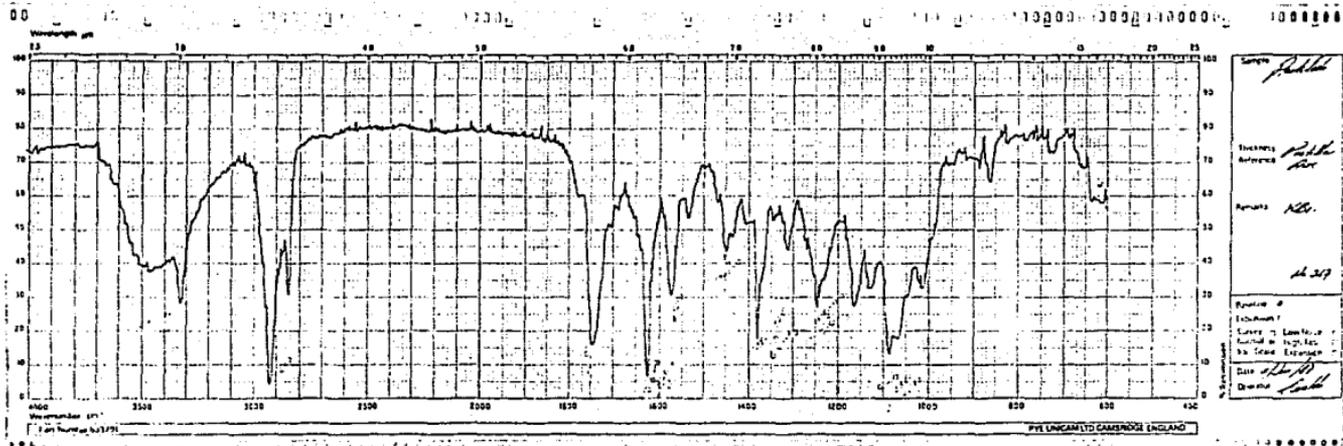


Fig. 11. Espectro IR de la β -acetildigitoxina

TABLA 7. Desplazamientos químicos para los espectros de resonancia magnética nuclear ¹H

Digitoxina, espectro 12

Desplazamiento δ	multiplicidad			
0.84	doblete	(3H)	-CH	18
			3	
1.15	doblete	(3H)	-CH	19
			3	
3.23	singulete	(3H)	-OH	14, 3', 3"
				3'', 4''
4.0	singulete	(1H)	-H	3
5.0	singulete	(1H)	-C=C-H	22

β -metildigitoxina, espectro 13

Desplazamiento δ	multiplicidad			
0.84	doblete	(3H)	-CH	18
			3	
1.15	doblete	(3H)	-CH	19
			3	
2.8-3.3	multiplere	(4H)	-OH	14, 3', 3", 3''
3.5	singulete	(3H)	-OCH	4'' β
			3	
4.0	singulete	(1H)	-H	3
5.0	singulete	(1H)	-C=C-H	22

β -acetildigitoxina, espectro 15

Desplazamiento δ	multiplicidad			
0.84	doblete	(3H)	-CH	18
			3	
1.15	doblete	(3H)	-CH	19
			3	
2.0	doblete	(3H)	-OCOCH	4'' β
			3	
3.23	singulete	(4H)	-OH	14, 3', 3", 3''
4.0	singulete	(1H)	-H	3
5.0	singulete	(1H)	-C=C-H	22

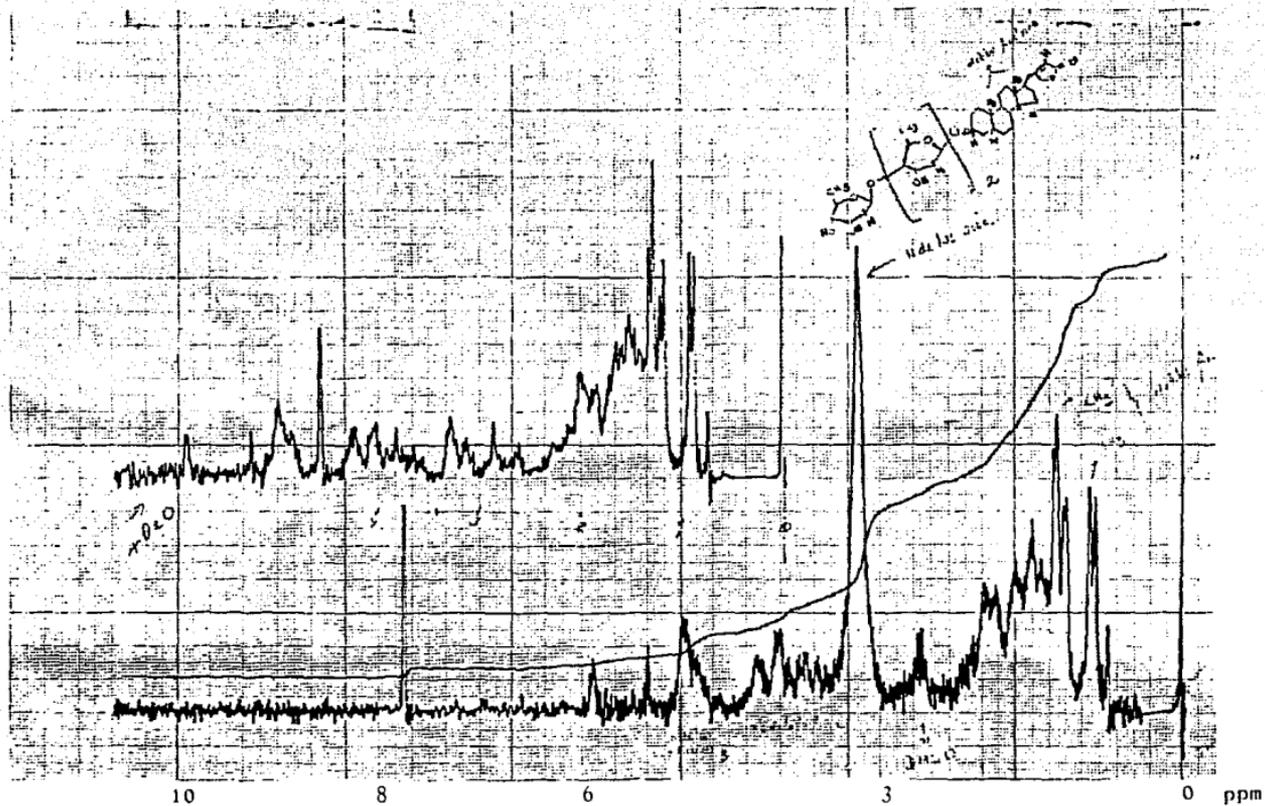


Fig.12. Espectro de RMN de la digitoxina.

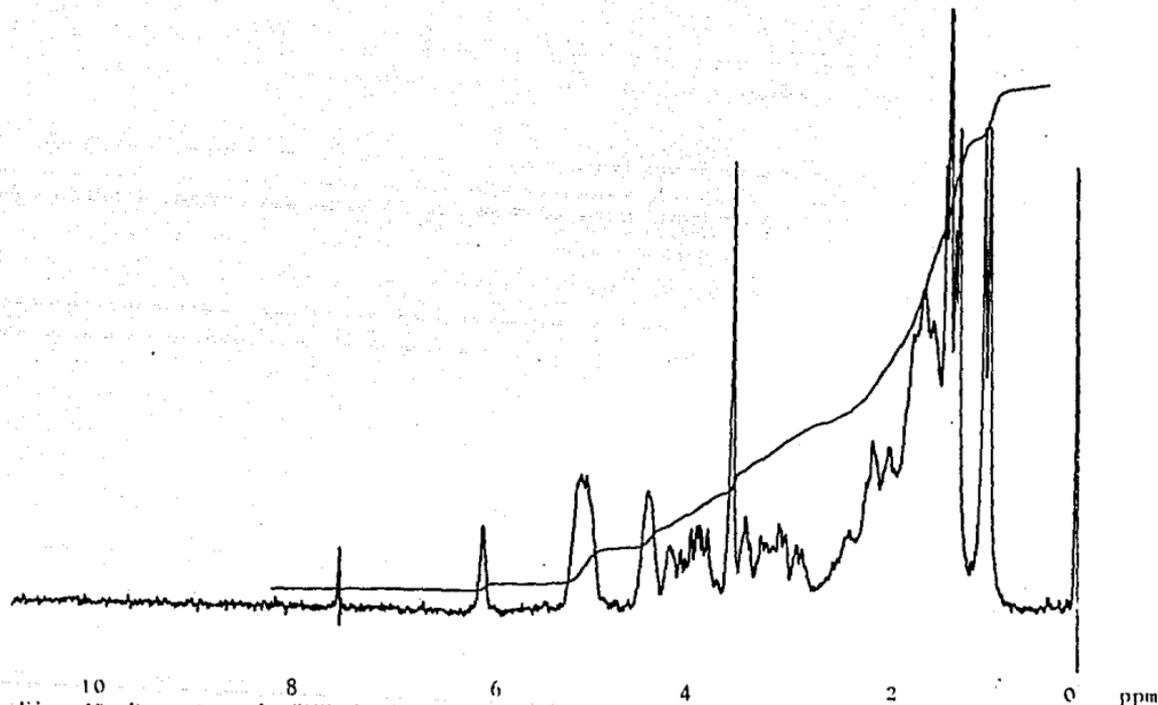


Fig. 13. Espectro de RMN de la β -metildigitoxina.

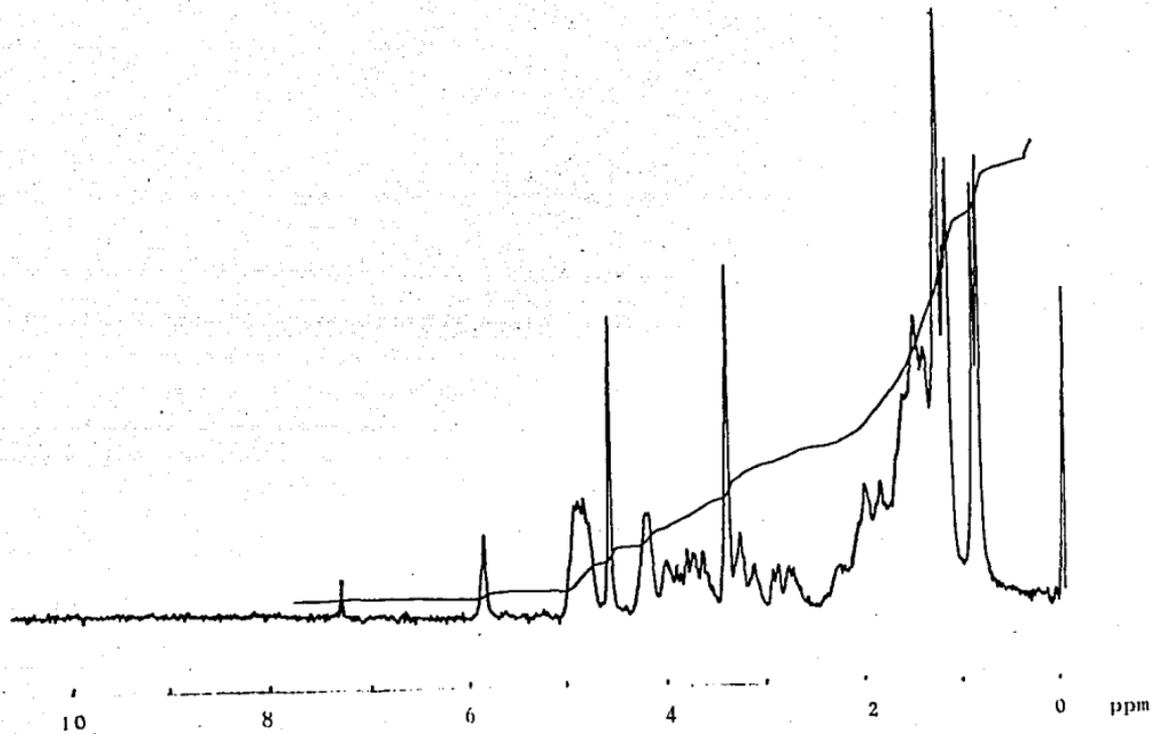


Fig. 14. Espectro de RMN de la β -metildigitoxina más agua deuterada.

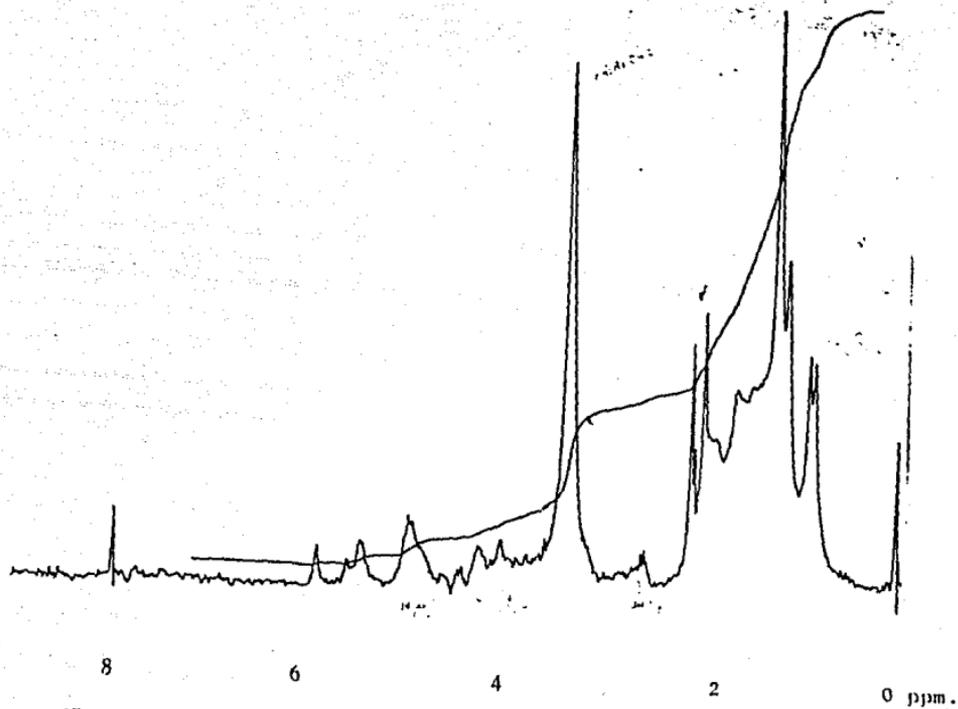


Fig. 15. Espectro de RMN de la β -acetildigitoxina.

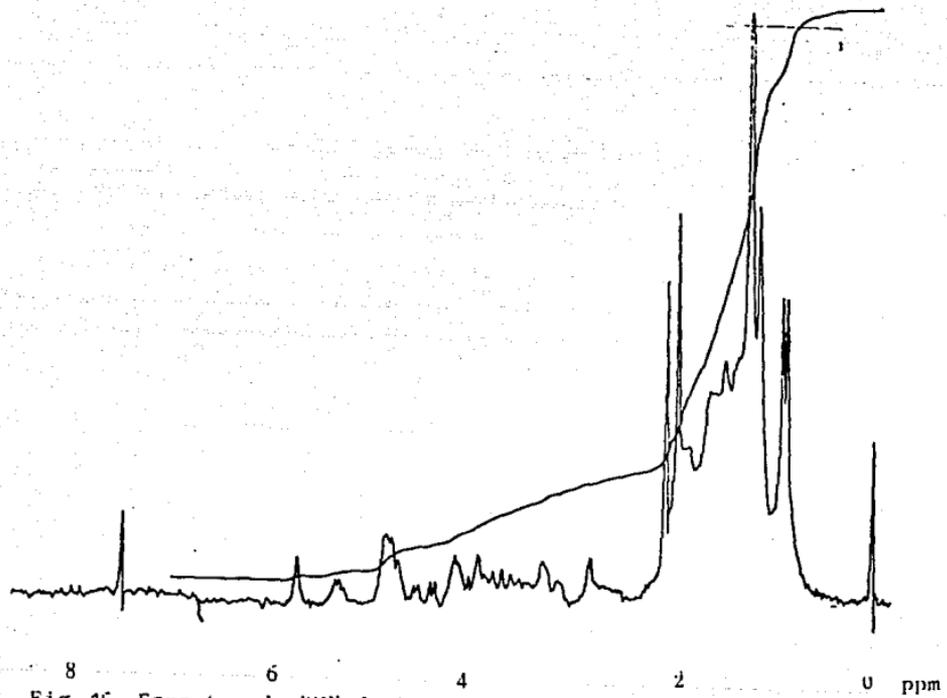


Fig. 16. Espectro de RMN de la β -acetildigitoxina más agua deuterada.

V. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.

- A. Los métodos de metilación y acetilación seleccionados fueron específicos para llevar a cabo la reacción en el OH β de la posición 4 de la digitoxosa terminal.
- B. Las determinaciones que proporcionaron mayor información para identificar a la β -metildigitoxina y β -acetildigitoxina, fueron los espectros de resonancia magnético nuclear, sobre todo el intercambio con agua deuterada, porque hicieron evidente la presencia de los grupos metilo y acetilo en la molécula de digitoxina.
- C. El contar con derivados de digitoxina permite tener sustratos con mayor capacidad de biotransformación.
- D. Los derivados de digitoxina deben ser ensayados en cultivos de células de D. lanata en suspensión, ya que las células de D. purpurea dirigen la conversión a otros productos menos útiles.
- E. En un ensayo preliminar la β -acetildigitoxina resultó tener aparentemente la misma actividad farmacológica que la digitoxina y haciendo analogía con la β -acetildigitoxina obtenida del lanatóside A, se piensa que puede tener utilidad como fármaco.
- F. Es necesario verificar si los dos puntos de fusión que mostraron los derivados de digitoxina son efectivamente debidos a un polimorfismo, mediante el estudio de rayos X ó el análisis térmico diferencial.
- G. El hecho de contar con digitoxina obtenida de la planta D. purpurea, permite contar con un suministro permanente de materia prima para la obtención de los derivados β -metildigitoxina y β -acetildigitoxina, susceptibles a biotransformación conforme a la metodología aquí establecida y con la posibilidad de tener digitálicos más potentes.

BIBLIOGRAFIA.

1. Abott, D., Andrews, R.S., Introducción a la cromatografía, Ed. Alhambra, 3a ed, España 1973, p. 59-60.
2. Alferman, A., W. Reinhard, et al. Plant biotechnology, Ed. Mantel, Cambridge England, 1983, p. 65-67.
3. Beltrán, P.E., ENEF Zaragoza, comunicación personal (1986).
4. Bowman, W.C., Textbook of Pharmacology, Ed. Blackwell Sci. 2a. ed, Londres 1970, p. 22.70-22.71.
5. British Pharmacopoeia, London Her Majesty's Stationery office 1980 department of Health and Social Security, Scottish home and Health and Social Security, Scottish home and Health department welsh office.
6. Carvalhas, M.L. and Figueira, M.A. Journal of Chromatography, 86, 254-256 (1973).
7. Caspi, E., D.O., Lewis et. al. "Biosynthesis of plant sterols conversion of Cholesterol to pregnenolone in D. purpurea" Experientia, (1966) 22, 506-507.
8. David, Eisenstein, Hehre, Salem and Hoffman, J. Am. Chem Soc. 95, 3806 (1973).
9. Edward, P. Claus, "Contenido de la D. purpurea" Pharmacognosy Varro Etyler, 5a ed, Lea and Febiger USA, 1976, p 100-101.
10. Edwards. Cromatografía, Manual mod, SA Talleres gráficos, México 1975, p. 40-43.
11. Elderfield, R.C., in VW Pigman, ML Wolfram. Advances in carbohydrate Chem, Vol, 1 (Acad, press, New York 1945) p. 159-164.
12. Estadísticas del Instituto Mexicano de Comercio Exterior 1974 1983.
13. Furuya, T., Hirohata, M, Shinohara, T. "Biotransformation of digitoxin by suspension callus cultures of D. purpurea", Chem Pharm Bull, 18, 1080-1081 (1970).
14. Gelbert, A., J. Pharm Sci, 63, 1649 (1974).
15. Giral F., comunicación personal (1986).

16. Giral y Cohan, Productos Químicos y Farmacéuticos, V III, Ed. Atlante, México 1947, p. 223-227.
17. Gisvold et al. J. Pharm Am Assoc, 39, 109-112 (1950).
18. Granvold, C., Steroids in: Encyclopedia of plant Physiology, New series, Vol 8, Section Plant products (Bell, E, A, V, Charwood eds), Springer Verlag, Berlin-New York p.340 (1950)
19. Gross, E., G., Mastronardi, Carb. Res, 10 318-321 (1969).
20. Grund y James and Pattendum, Tetrahedron lett, 757 (1972).
21. Harry, R., et al., USA pat 2,615,884, 28 oct 1952, Appl 30 junio 1949.
22. Heins et al. "Preparation of β -methylidigoxin by hidroxilation of β -methylidigitoxin in fermenter cultures of D.lanata" Planta Medica, 33, 57-62 (1978).
23. Horkissand, G., et al, "An investigation of the constitu ents of D. purpurea" J. Pharm. and Pharmacol, 10, 223-235 (1953)
24. Huang, C., L., Abranson, Wang, IRCS, Med. Sci. Libr. Compend. 5 (1), 20 (1977).
25. Hutchins, Kopp and Eliel, J. Am. Chem. Soc., 90, 7174 (1968)
26. JFM. Mc. Omie, JN. Blatchly. Organic Reactions, 19 199, (1972)
27. Jacobson G., M., "Biosynthesis of cholesterol by seedling of D. purpurea" J. Am. Chem. Soc., 89, 3338-3340 (1967).
28. Jakovljevic, I., Analitical Chem, 35(10-11) 1513-1516 (1963).
29. Jiles, Jonic, Plant Sciences Library of changes catalogeny in publication data, 1974, p. 131.
30. Kaiser, F., IRCS, Med, Sci Libr. Comp. 5 (1), 20 (1977).
31. King, Courton and Dickinson "Physical Chemistry of Organic Sol systems", Plenum Press, New York 1973, p. 331-403.
32. Kenneth, et al Chemical Stability of Pharmaceuticals, Wiley Interscience pub. USA 1979, 64, 98.
33. Klyne, W., The chemistry of steroids, Ed, J. Wand S, Londres 1957, p. 57-58.

34. Korolkovas A., and Burckhalter J. H. "Compendio esencial de química farmacéutica", Ed. Reverte, Barcelona España 1979, p. 389-395.
35. Maier, S., M., et al, Phytochemistry, 25 (6), 327-329 (1986).
36. Martindale, La Extrapharmacopoeia, Ed. Society of Great Britain and produced in Society's department of Pharmaceutical Sciences, 27th, ed, Londres.
37. Mellado, R. ENEP Zaragoza, comunicación personal (1986).
38. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, ninth ed. (1976).
39. Meyer K. Ger. Offen, 2,1371047 (1962).
40. Minesita et al., Ann Rep. Shionogi Res Lab, 18, 69 (1969).
41. Nathan, P., Joseph, Resonancia Magnética nuclear de Hidrógeno, Serie Química, Programa regional de desarrollo científico, Depto de asuntos científicos, secretaria general de la OEA, Ed, Eva Chesnau, Washintong 1973, p.109.
42. Okada, M., and Sayto "Synthesis of epoxides of anhydrocardenolides and their cleavage, synthesis of uzarigenin acetate", Steroids, 6, 645-649 (1965).
43. O., C., Dermer, Chem Rev, 14, 409 (1934).
44. Pastelín G., Instituto Nacional de Cardiología, Comunicación personal (1987).
45. Reinhard, E., Biotransformation by plant tissue cultures. In: Tissue culture and plant science 1974, Street, H., (ed). London-New York-San Francisco, Academic Press, 1974, p. 433-459.
46. Satchell, G, Rev Chem Soc, 17, 160-203 (1963).
47. Scutz, S., Heyer and Kratzer, Arzeln-Fursch, 19, 69 (1969).
48. Smith, Moffat, and Korana, J. Am. Soc., 80 6204 (1958).
49. Söndheimer, O., and Reichtein, Helv Chim acta, 39, 1876 (1956).
50. Stoll, Kreis, USA pat. 2776963 (1957 to Sandoz).

51. S. Peat, and E. J. Bourne, Advances in carbohydrate Chem, 5 146, (1950).
52. Tedder, A., Nechvatal, Química Orgánica (un metodo mecanicista). Ed. Virmo, T. IV, Bilbao Espaa 1971, p. 51-57, 90.
53. The United States Pharmacopeial Convention. "The Pharmacopea of United States of America". 20th rev.
54. Vogel, A., Textbook of practical Organic Chemistry, Ed. Longman Inc. 4a ed. New York 1970, 138-149.
55. Vogel, A., Química Analítica Cuantitativa, Ed. Kapeluz, 5a ed Argentina 1974, p. 223-227.
56. Willard, Merrit, Dean, Métodos Instrumentales de Análisis, Ed. Continental, México 1984, 6a ed. p. 302-306, 471-473.
57. Wolf, Emil, et al, USA pat. 2,224,804, 10 decem 1940, Appl 7 feb 1938.
58. W. Burguer's, Medicinal Chemistry, Ed. Manfred E. Wolf, JWI, 4a ed T III. USA, 1980 p. 72-73.
59. Wagner, H., S.Bladt, E.M.Zgainski, Plant Drug Analysis Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1984, p. 198.