

Tesis de Posgrado

Estudio comparativo de los métodos de obtención de dehidroandrosterona

Schreyer, Sarah

1941

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Schreyer, Sarah. (1941). Estudio comparativo de los métodos de obtención de dehidroandrosterona. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0259_Schreyer.pdf

Cita tipo Chicago:

Schreyer, Sarah. "Estudio comparativo de los métodos de obtención de dehidroandrosterona". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1941. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0259_Schreyer.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS y NATURALES

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METODOS DE OBTENCION DE

DEHIDROANDROSTERONA

Tesis: 259

Tesis presentada para optar al titulo de Doctor en Química

SARAH SCHREYER

1941

Tengo el agrado de presentar a la consideración de los señores Profesores, el presente trabajo de tesis, con el que opto al título de Doctor en Química.

Complacencia agradecer al Dr. Alfredo Sordelli, su deferencia al poner a mi disposición los elementos necesarios para la realización del mismo en el Instituto Bacteriológico.

Mi sincero reconocimiento al Dr. Venancio Deulofeu por su gentil y valiosa dirección en el desarrollo de esta tesis.

Carabid Meyer

Nuestros conocimientos sobre la secreción interna del testículo son relativamente recientes, aunque pueden citarse como puntos iniciales de referencia, los trasplantes glandulares en gallos efectuados ya en 1762 por Hunter y en 1849 por Berthold. Sigue a estos, un trabajo que alcanza gran resonancia, el de Brown-Séquard en 1889, titulado: " Experiencia para demostrar el poder dinamógeno en el hombre, de un líquido extraído de testículos de animales ", y que describe, la acción fisiológica que tiene sobre el hombre y los animales un extracto obtenido por maceración de testículos en pequeña cantidad de agua y filtración por filtro Pasteur. No hace ninguna hipótesis sobre la posible naturaleza de la sustancia activa; pero pone en evidencia, la existencia de una secreción del testículo cuya falta, se demuestra por los fenómenos que aparecen en el animal al ser castrado, y que pueden en parte, ser eliminados, como ya lo demostró Berthold al efectuar el trasplante de glándulas, y como lo demuestra este autor al inyectar el citado extracto.

Se pueden citar como trabajos importantes sobre el efecto de la castración en gallos, los de Steinach (1894), los de Walker (1908) y los de Pézard (1911), que son la base para demostrar la presencia de actividad hormonal, observando el crecimiento de las crestas en capones. Pézard utilizaba en lugar de los trasplantes de glándulas, la inyección de líquido testicular y observó una regresión en el tamaño de las crestas al suspender las inyecciones; sus resultados no pudieron ser verificados con las cantidades que él indicaba.

El primer trabajo que demuestra claramente la acción de un extracto testicular y que prueba que este puede ser preparado,

fué hecho por Mc Gee (1927), quien obtuvo un extracto alcohólico que concentró a vacío, hasta tener una suspensión acuosa de lípidos que extrajo con benzol, y el residuo de este extracto lo incorporó a aceite de olivas. Cada inyección diaria equivalía a 150-500 grs. de tejido.

Se observó un crecimiento en las crestas al cabo de cinco inyecciones diarias, siendo este crecimiento mucho menor que el observado con extractos provenientes de erina.

Fueron los investigadores americanos Koch, Gallagher y Moore (1929- 1930), los que llegaron a efectuar tests cuantitativos por primera vez, repitiendo en forma sistemática las experiencias de Pézard y otros investigadores sobre regeneración de crestas en capones. Siendo estos ensayos, ligeramente modificados en cuanto a forma y lugar de inyección y otros detalles de menor importancia, los que constituyen la base de unos de los tests más utilizados para la titulación de hormona masculina.

El primer método de dosificación de Gallagher y Koch (1928-1929) determinaba la menor cantidad de substancia que producía un crecimiento visible de las crestas, lo que era poco exacto. Llegaron a la conclusión, que las variaciones individuales, no dependen de la edad y peso de los animales, ni del tamaño o forma inicial de la cresta.

Los investigadores citados, llegaron a la conclusión que conviene el empleo de una dosis que provoca un aumento de 3 a 7 mm en el largo y alto de las crestas al cabo de cinco inyecciones.

Segun los autores americanos, la unidad gallo, es la cantidad que inyectada diariamente, durante cinco días, produce un aumento de término medio 5 mm. en el largo más alto de las crestas de por

lo menos cinco capones Leghorn.

Los investigadores Freud, de Frémery y Laqueur (1930, 1931, 1932) determinan el aumento total planimétrico, de la sombra de la crsta sobre papel fotográfico. La unidad gallo es la cantidad de substancia hormonal, que provoca un aumento de 15-20% del área total de la cresta.

Posteriormente se han utilizado otros métodos para la investigación y titulación de hormona masculina, como por ejemplo, el que utiliza el desarrollo de la vesícula seminal en ratas.

Trabajos de Womach y Koch (1930) y Koch y Gallagher (1934) demuestran que el crecimiento de las crestas es afectado por la exposición diversa a la luz y por el tamaño inicial de las mismas, mientras que Greenwood, Blyth y Callow (1935) llaman la atención sobre el efecto del disolvente usado para la hormona.

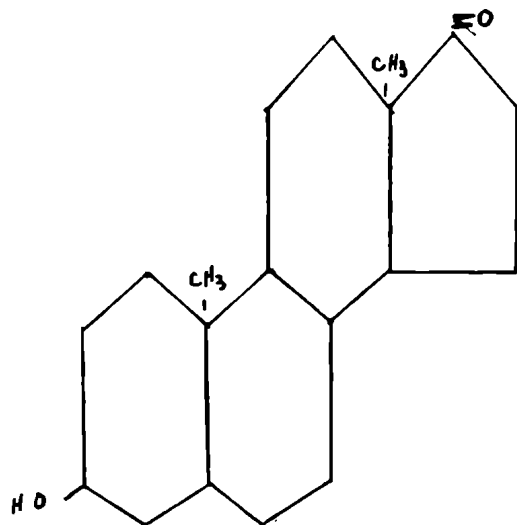
Es con el auxilio de estos métodos que fué posible estudiar la distribución de la hormona masculina en la naturaleza y es así, como se encontró que aparte de los testículos había substancias con esa actividad en la sangre y orina de los animales machos, habiéndose demostrado así mismo su presencia en la orina de mujer.

La primera substancia cristalizada con actividad de hormona masculina fué obtenida por Butenandt y Tscherning (1934) quienes describen el método utilizado en un trabajo titulado : " Sobre androsterona, una hormona masculina cristalizada " Aislamiento y purificación a partir de orina masculina.

Estos autores parten de un extracto clorofórmico de orina que tratan con éter y luego purifican por extracción alcalina, arrastre con vapor de agua, saponificación alcalina y ácida y extracción final con éter de petróleo. Por evaporación del disolvente obtienen

un aceite que contiene el principio activo. Esta sustancia activa que a diferencia de la foliculina es neutra, se asemeja a ésta en su carácter cetónico, pudiendo por lo tanto ser precipitada con fenilhidrasina, hidroxilamina, semicarbazida etc. El mejor resultado se obtiene con la hidroxilamina, pues da una oxima fácil de purificar y que arrastra la totalidad del principio activo. De esta oxima por hidrólisis se pone en libertad el principio activo cristalizabile, al que estos autores, pusieron el nombre de androsterona. Por sublimación en alto vacío obtienen una sustancia cristalizada en forma de hojuelas, soluble en disolventes orgánicos e insoluble en agua, a la que atribuyeron la fórmula bruta $C_{19}H_{30}O_2$. El peso molecular calculado para esta fórmula es 290, siendo el determinado experimentalmente 283.

Además de aislar y purificar la androsterona estos autores tratan de caracterizarla químicamente. De los dos oxígenos que posee suponen que uno pertenece a un grupo hidroxilo y otro a un grupo carbonilo; esta suposición se confirma por un lado, por la posibilidad de obtener un acetato y un propionato y por el otro la oxima, semicarbazona etc. Determinan además que es un cuerpo saturado por la imposibilidad de absorber hidrógeno y halógenos, y que el hidroxilo es secundario transformandose en carbonilo, por oxidación con CrO_3 . Por reducción obtienen el hidrocarburo básico $C_{19}H_{32}$ al que denominan androstano. Llegan a la conclusión que se trata de una cetona tetracíclica saturada no aislada hasta ese momento a la que atribuyen la fórmula de trabajo hipotética:

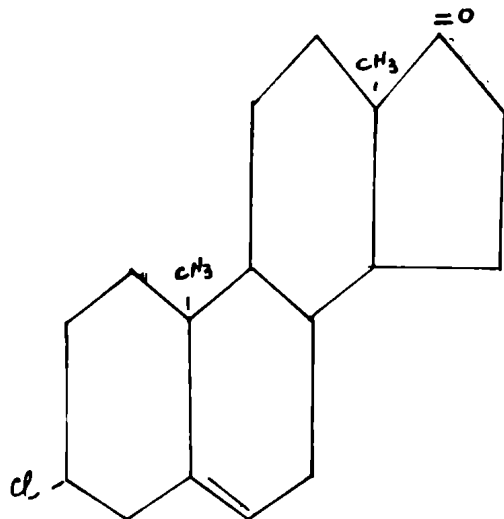


Una segunda substancia con actividad de hormona masculina fué aislada como producto secundario por Butenandt y Dannenbaum (1934) del extracto de orina.

Evaporando el extracto con éter de petróleo, del cual se ha separado la androsterona con alcohol, queda un residuo de color obscuro no cristalizabile. Efectuando un fraccionamiento de este éter de petróleo con benzol- éter de petróleo primero y con una mezcla de éter de petróleo- alcohol 85% luego, se puede aislar del alcohol por adición de semicarbazida, una semicarbazona bruta poco soluble que se descompone a 240°C, y constituida sin duda por una mezcla de substancias. Por recristalización de alcohol propílico se obtiene una pequeña cantidad de semicarbazona de p.f. 275°C que cristaliza en forma de hojuelas. Hidrolizando con ácido y extrayendo la mezcla con alcohol, da lugar a la separación del producto activo.

Esta substancia activa se puede recristalizar de alcohol metílico en forma de prismas de p.f. 157°C (sin corr.), solubles en disolventes de lípidos. El análisis elemental demuestra que se trata de un producto halogenado, de fórmula bruta $C_{19}H_{27}OCl$ perteneciendo el oxígeno a un grupo carbonilo.

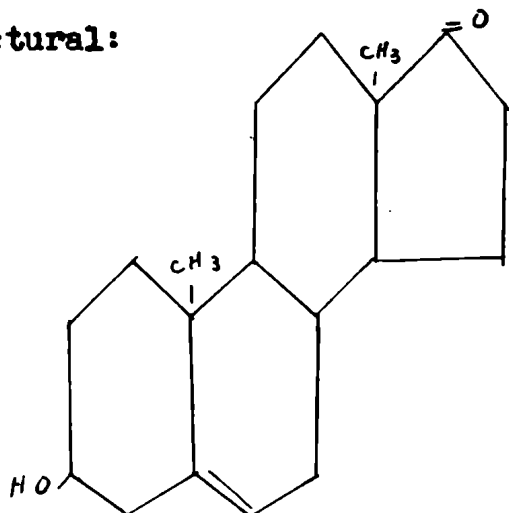
Es por lo tanto una cetona no saturada que por hidrogenación catalítica toma una molécula de hidrógeno, y a la que atribuyen la fórmula:



Es imprecisa la posición de la doble ligadura.

Suponen los autores que esta clorocetona debe ser un derivado que se origina durante el tratamiento de la orina para aislar la androsterona, ya que solo después de hervir el extracto clorofórmico con HCl, se puede determinar Cl en el mismo.

Basandose en la similitud estructural de la clorocetona con la androsterona, pensaron en la posibilidad de pasar de una a otra, y fué así, que obtuvieron una nueva sustancia activa a partir de la clorocetona inactiva, tratando de llegar a la androsterona. Esta sustancia, a la que denominaron dehidroandrosterona, es una cetona no saturada de fórmula bruta $C_{19}H_{28}O$ y a la que atribuyen la fórmula estructural:



De la clorocetona se llega a ella reemplazando primero el cloro por un grupo éster, Butenandt utiliza benzoato de potasio, e hidrolizando luego el éster formado. Esta oxiketona que tiene dos hidrógenos menos que la androsterona, cristaliza en largas agujas blancas de p.f. 148°C (sin corr.). Los citados autores llegaron luego a la androsterona saturando previamente la doble ligadura.

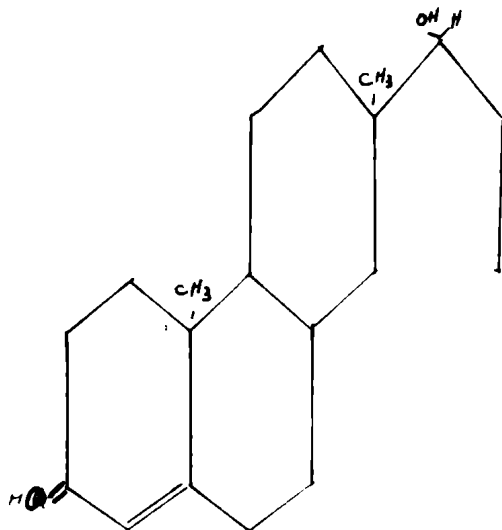
Entre tanto varios investigadores demostraban que parecía haber diferencias entre las sustancias activas obtenidas de la orina y los extractos obtenidos de testículo.

Químicamente las diferencian Gallagher y Koch (1933) en un trabajo titulado " Acción del álcali sobre hormona testicular " en el cual, luego de exponer una serie de experiencias efectuadas, llegan a la siguiente conclusión: La hormona masculina extraída de testículo es destruida por álcali siendo en cambio resistente la obtenida de orina; la inestabilidad de una y la estabilidad de la otra no se debe a la presencia de impurezas. La naturaleza de la acción destructora del álcali no la conocen, pero aseguran que no es debida a la aparición de un factor inhibidor, ya que agregando hormona activa a un preparado inactivado, el conjunto tiene actividad biológica.

Laqueur, David, Dingemans y Freud (1935) demostraron la gran diferencia de actividad biológica existente entre la hormona obtenida de testículo y la aislada de orina; comprobaron estos autores que la unidad gallo corresponde a 10 gammas para la hormona extraída de testículo.

Estas diferencias quedaron aclaradas cuando David (1936) logra obtener cristalizada la sustancia activa del testículo.

Ya anteriormente Mc Gee (1927) y Gallagher y Koch (1929-1934) habían obtenido extractos purificados muy activos, pero no habían conseguido aislar la sustancia pura. Para llegar a ésta, David parte del extracto obtenido con alcohol de los órganos finalmente molidos, este extracto alcohólico evaporado a vacío es extraído con benzol, la solución bencénica evaporada a sequedad y el residuo tratado con acetona. Se purifica ulteriormente por extracción con hexane, alcohol diluido y luego éter y agitación de la solución con soda al 10%. David después de fraccionar este residuo parcialmente purificado con éter de petróleo y alcohol de 70% extrae la sustancia con benzol y agita con H_2SO_4 de 75%. La solución ácida luego de diluida, es extraída con éter y el residuo que queda luego de evaporar el éter, se somete a un arrastre de vapor a vacío, el destilado por recristalización da un producto cristalino puro. Esta sustancia a la que dieron el nombre de testosterona, responde a la fórmula bruta $C_{19}H_{28}O_2$ y tiene p.f. $154^{\circ}C$. Se obtuvieron a partir de ella, la oxima y el acetato. La testosterona carece de carácter fenólico y por el espectro característico se puede determinar que se trata de una cetona no saturada en alfa, beta de fórmula estructural:



Mientras se desarrollaban estos estudios, Kuzicka y sus colaboradores (1934) lograron llevar a la práctica un método de producción de hormona masculina que parte del colesterol y el cual resultó de la mayor trascendencia para la evolución de la química de estas substancias.

Ya en 1903 Windaus en su tesis presenta una tentativa de oxidación de colesterol con vistas de aclarar su constitución.

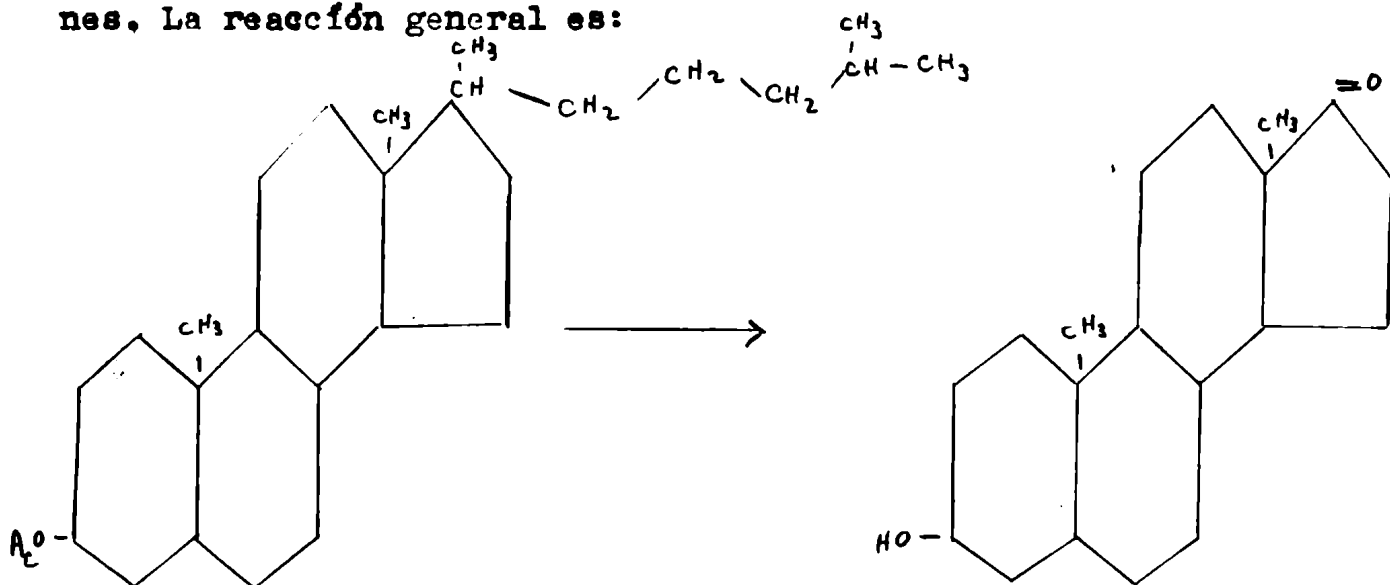
En 1913, Windaus y Resau. logran aclarar completamente, la constitución de la cadena lateral del colesterol al mismo tiempo que establecen la posibilidad de separarla del resto de la molécula. Mediante la oxidación del colesterol con CrO_3 , en medio acético, y arrastre de los productos de oxidación con vapor, recoge una cetona volátil que da una semicarbazona de p.f. 153-154°C y de fórmula $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ON}_2$ idéntica a la obtenida de la metil isohexilcetona por otros métodos, demostrando así la estructura de esa cadena.

Ninguno de los primeros autores aisló en forma pura la cetona que debía formarse sobre el gran resto de la molécula del colesterol. Fueron los hallazgos de substancias con actividad masculina, que parecían poseer una estructura similar a la del colesterol, pero carentes de su cadena lateral, los que dieron el impulso necesario para estudiar de nuevo ese tipo de oxidación.

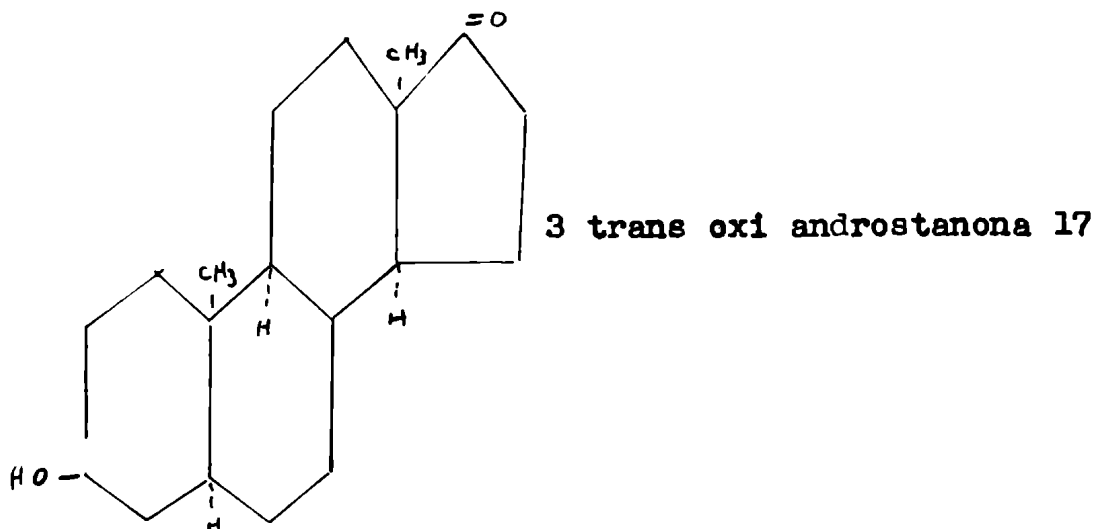
Esta serie de investigaciones las iniciaron Kuzicka y sus colaboradores (1934), cuyo primer trabajo se llama: " Obtención de 3 cloro y 3 oxi etioalloeolanona 17" Síntesis de un compuesto con las propiedades de hormona masculina, y dan en éste cuenta, de la oxidación con CrO_3 del cloruro de colesterilo resultante del tratamiento del colesterol con cloruro de fósforo.

Además de productos ácidos lograron encontrar que se producía una cetona, la 3 cloro etio colanona 17 (hoy 3 cloro androstanona 17). La aplicación del método al acetato de dihidrocolesterol, les dió una oxiketona, 3 oxi androstanona 17, de forma igual pero no idéntica a la androsterona de Butenandt.

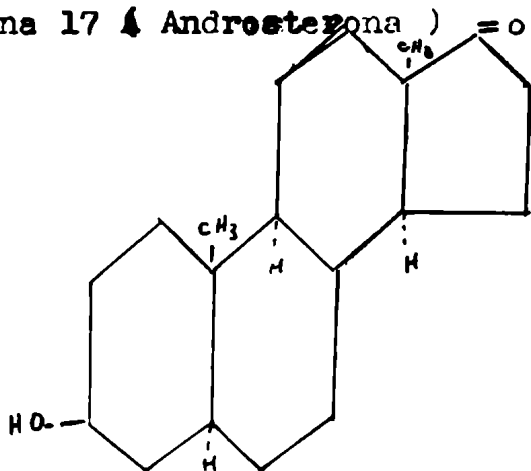
En su segundo trabajo Ruzicka (1935), emprendió la oxidación de los cuatro dihidrocolesteroles estereo isómeros entonces conocidos; empleando en todos los casos una técnica similar cual es la oxidación del acetato correspondiente con CrO_3 y aislamiento de la cetona policíclica por el empleo de reactivos de estas funciones. La reacción general es:



Corresponden las cuatro oxiketonas obtenidas a las fórmulas que a continuación se detallan. A partir del dihidrocolesterol se obtiene la trans, trans, trans, trans 3 oxi etiallocolanona 17

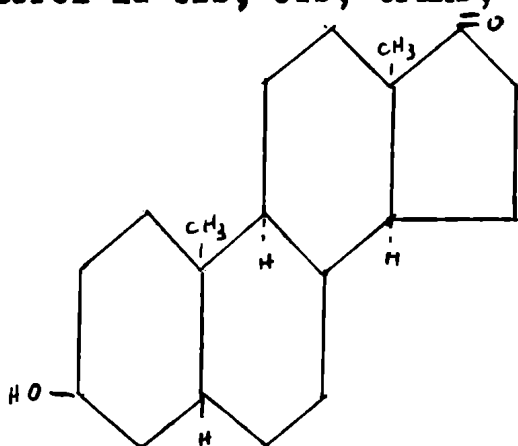


Del epi dihidrocolesterol, la cis, trans, trans trans e epi oxi etio-
alocolanona 17 ~~Androsterona~~) = O



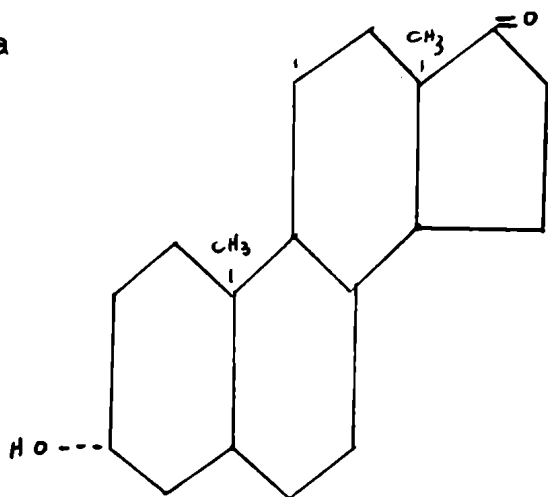
3 cis oxiandrostanona 17

Del coprosterol la cis, cis, trans, trans 3 oxi etiocolanona 17



3 trans oxialloandrostanona 17

y del epicoprosterol, la trans, cis, trans, trans 3 epi oxietiocola-
nona



3 cis oxialloandrostanona 17

Comparando los datos físicos de las cuatro oxicetonas, con los ob-
tenidos por Butenandt para la androsterona, se observó que coinci-
den con los de la 3 epi oxietioalocolanona 17 y se comprobó que
ambos cuerpos eran idénticos, por lo tanto la androsterona es la

Por medio de una prueba de precipitación con digitonina efectuada por Schoeller, Serini y Gehrke (1935) para la dehidroandrosterona, se comprobó que pertenece a la serie de esteroides naturales trans y por lo tanto la posición del hidroxilo en el carbono tres es opuesta en la androsterona y la dehidroandrosterona.

Desde el punto de vista químico la síntesis de la dehidroandrosterona es la más importante de todas; porque permitió partiendo de ella por una serie de reacciones muy simples, obtener diversas hormonas. En primer lugar Ruzicka y Wettstein (1935) obtuvieron seguidamente a la síntesis de la dehidroandrosterona, la testosterona (Δ^4 17 trans oxianandrosterona 3) similar en sus constantes físicas, constitución y actividad a la hormona aislada por David, Laqueur, Dingemans y otros directamente de testículo. Esta hormona es considerada por diversos autores como la primera producida en el organismo y producto madre de las otras dos.

Butenandt y Schmidt Tomé (1939) prepararon a partir de la dehidroandrosterona la hormona de cuerpo lúteo denominada progesterona y Serini, Logeman e Hildebrandt (1939) a partir de la misma sintetizaron desoxicorticosterona.

Existen dos métodos para obtener testosterona a partir de la dehidroandrosterona.

El primer método que es el clásico, fué utilizado por Ruzicka y Wettstein (1935) y consiste en reducir la dehidroandrosterona a androstenediol con sodio y alcohol propílico, acetilar parcialmente para proteger el grupo hidroxilo en posición 17 y oxidar finalmente con CrO_3 para llegar a la Δ^4 17 trans oxianandrosterona 3.

En el segundo método propuesto por Mamoli y Vercellone (1937) y también aplicado por Westphal y Hellman (1937) lo mismo que por

cetona derivada del epidihidrocolesterol con el hidroxilo en posición cis y es actualmente llamada 3 cis oxianandrostanona 17.

Probando las cuatro cetonas biológicamente, observan además que la cis oxianandrostanona 17 es la más activa, siendo las últimas dos inactivas aún inyectando 1000 gammas.

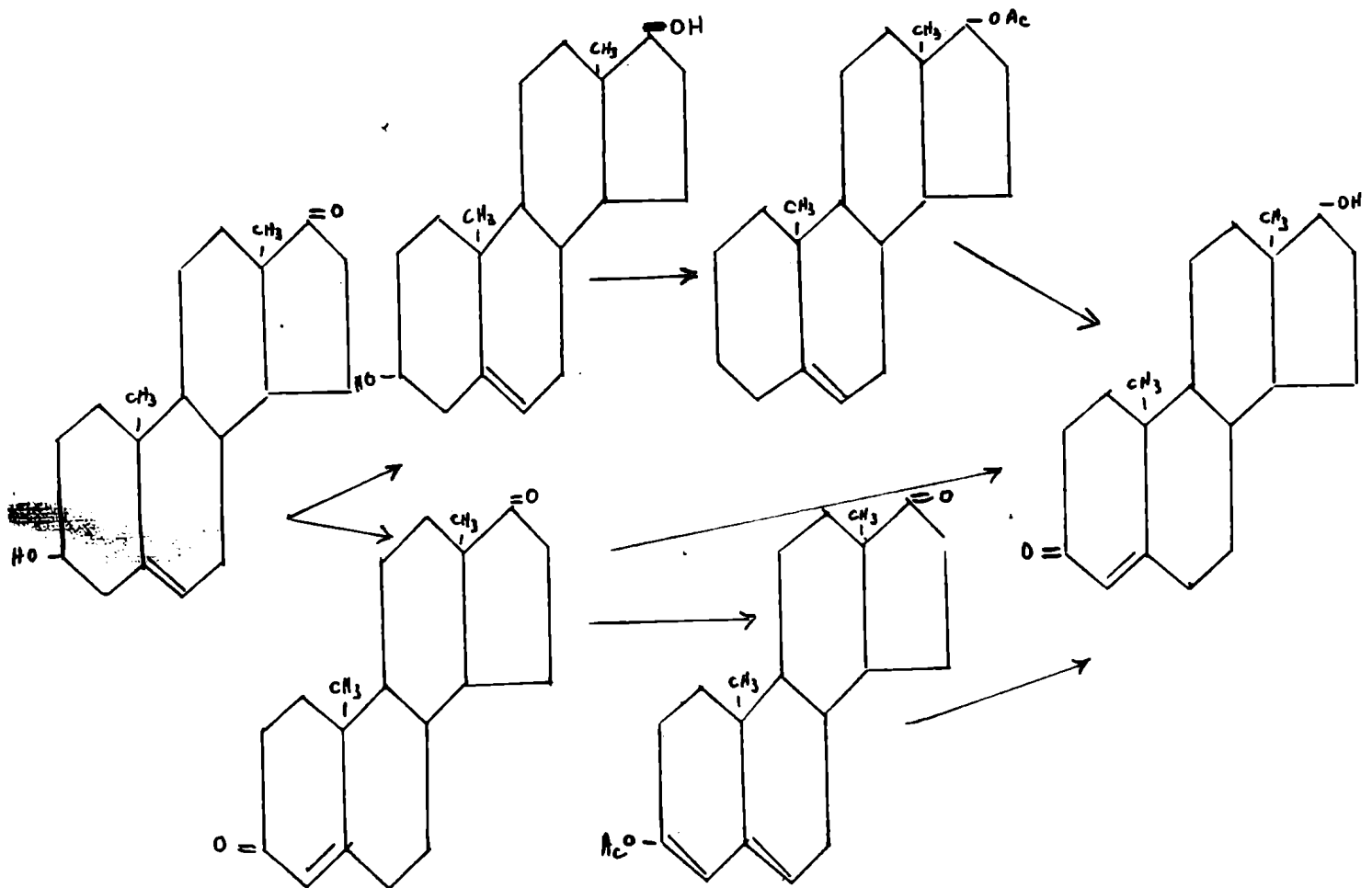
La preparación sintética de la androsterona aclara, por primera vez, de una manera definitiva la constitución de una hormona sexual. Siendo uno de los casos más notables en que se aclaró por síntesis la constitución de una sustancia natural compleja sobre cuya estructura no se tenían mayores datos anteriores.

Siguiendo con sus trabajos sobre derivados del colesterol Ruzicka y Wettstein (1935) llegan a obtener otro cuerpo de acción andrógena, aunque menor que la androsterona y que tiene gran importancia por ser el punto de partida para la obtención por medio de operaciones químicas sencillas, de toda una serie de hormonas.

Este cuerpo que es la transdehidroandrosterona se obtiene a partir del acetato de colesterol, dibromado para proteger la doble ligadura y oxidando con CrO_3 . Utilizando temperaturas de 80-90°C como las empleadas en la oxidación del dihidrocolesterol no se obtuvo ningún resultado. Ruzicka comprobó que la temperatura óptima es la de 50°C y llegó después de debromurar, a aislar la semicarbazona de la

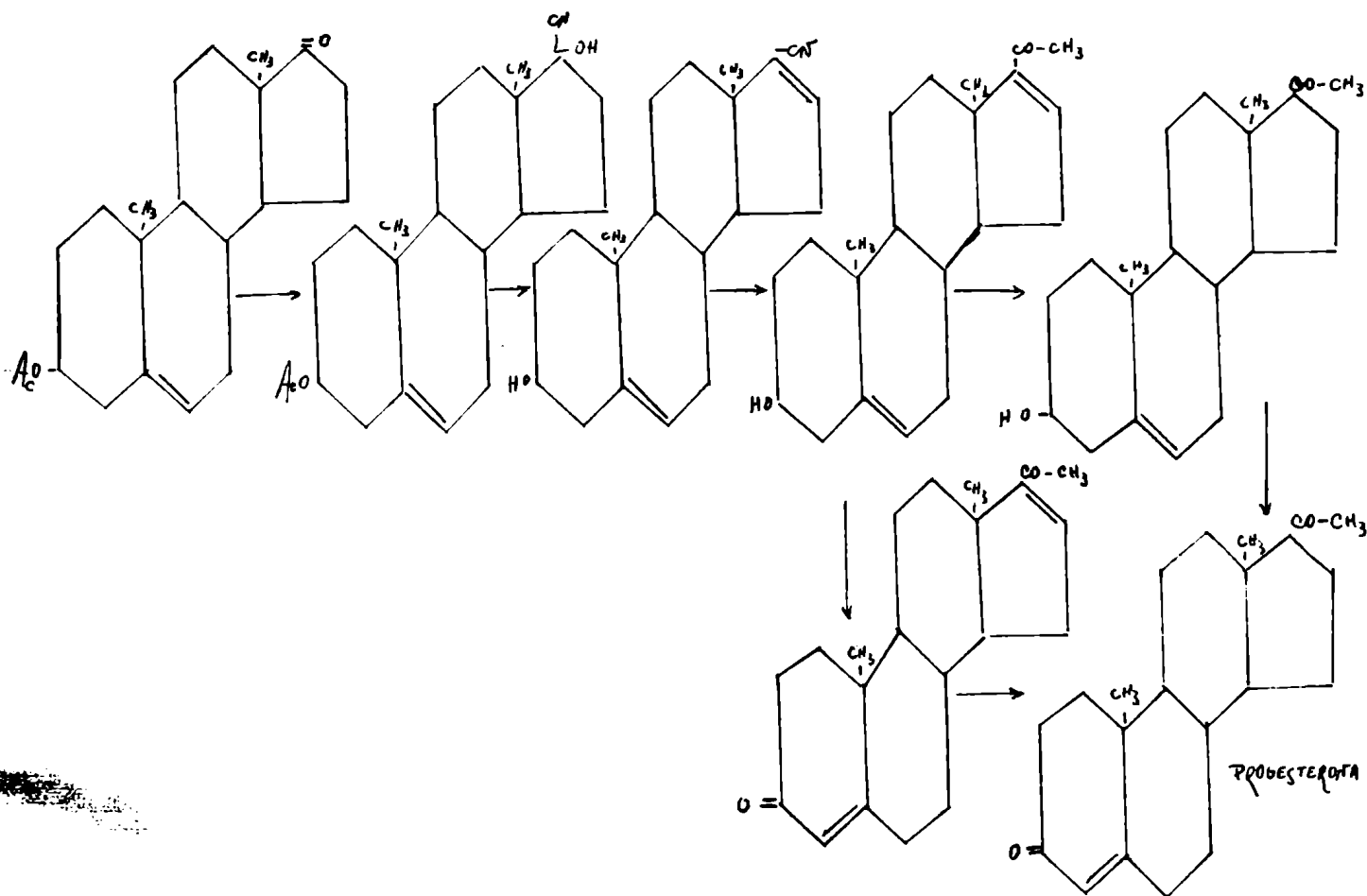
3 trans acetoxianandrostenona 17 con un rendimiento mejor que para las cetonas saturadas. Por hidrólisis suave y saponificación posterior se obtiene la Δ^5 3 trans oxianandrostenona 17 que presenta dos formas cristalinas, agujas de p.f. 140°C y hojuelas p.f. 152°C. Es similar a la dehidroandrosterona obtenida por Butenandt y Dannenbaum a partir de la clorocetona aislada del extracto de orina.

Serini y Koster (1938) se realiza mediante el pasaje intermedio por la semicarbazona o el éter enólico, para proteger el grupo cetónico en el carbono tres y luego se reduce el cetónico en el carbono diez y siete. Fue simplificado por Miescher y Fischer (1939) quienes luego de oxidar la dehidroandrosterona sin proteger el grupo cetónico reducen directamente utilizando el método de Meerwein-Ponndorf y aplican el reactivo de Girard para aislar el producto.

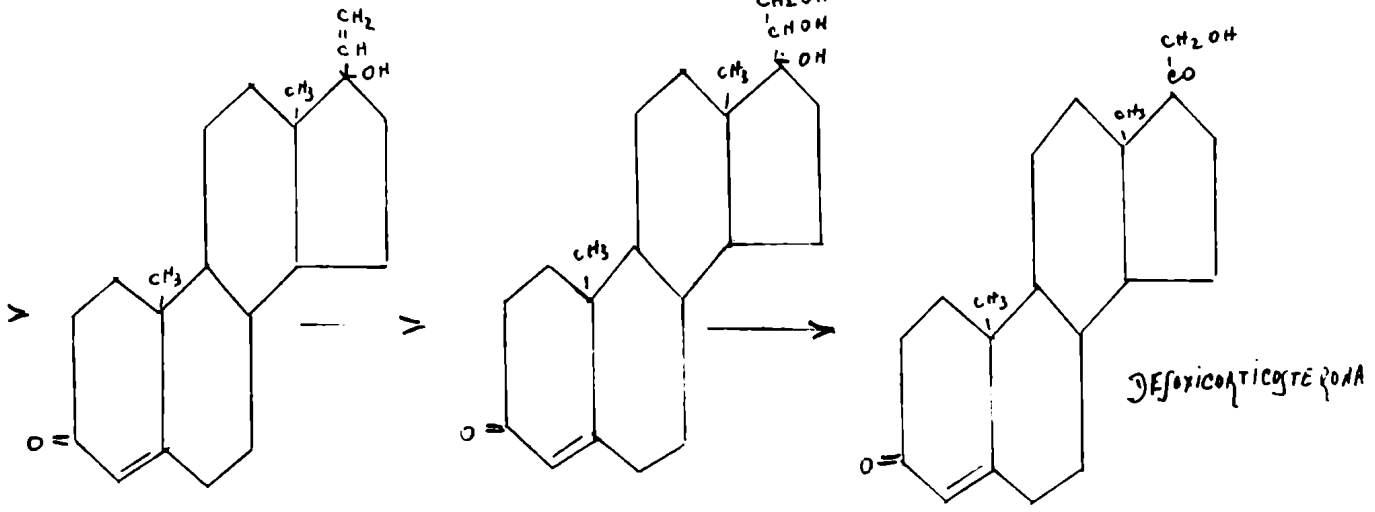
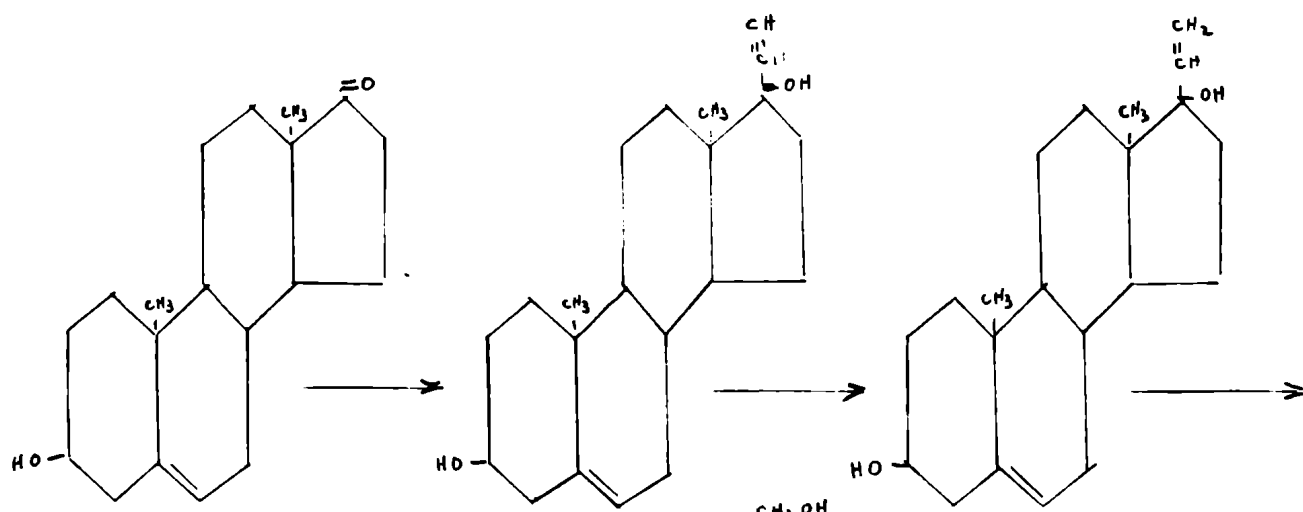


Para llegar a la progesterona Butenandt y Schmidt Tomé (1939) parten de la dehidroandrosterona y protegen el hidroxilo en carbono tres, acetilando. Mediante la adición de ácido cianhídrico, se obtiene la correspondiente cianhidrina, que por deshidratación, adición de ioduro de metil magnesio e hidrólisis de la cetimida pri-

maria, se transforma en el pregnadien 5,6 el 3 ona 20. La doble ligadura en carbono 16 se satura por reducción empleando Ni como catalizador; por ulterior oxidación se obtiene la progesterona.

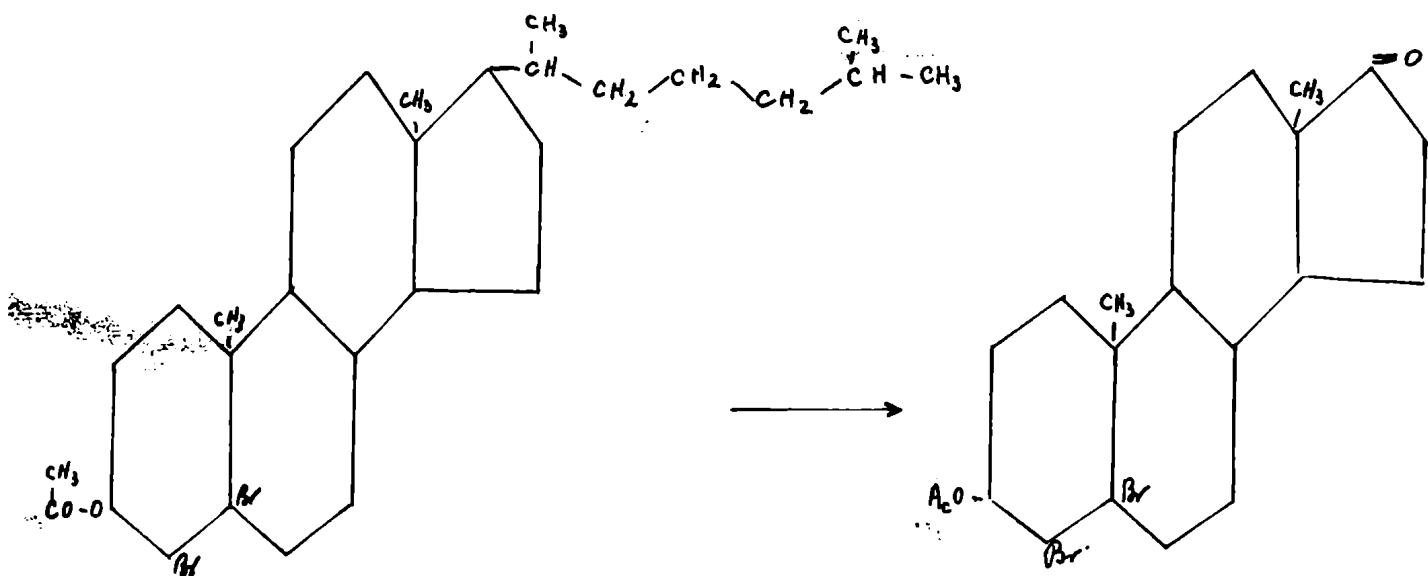


Puede llegarse de la dehidroandrosterona a la desoxicorticosterona por el método de Serini Logeman e Hildebrandt (1939). La dehidroandrosterona pasa a 17 etinil androsten diol 3-17 por acción de acetileno, éste se hidrogena a 17 etenil androsten diol 3-17 el que se oxida en el carbono tres formando un grupo cetónico, al pregnadien el 17 ona 3 se le adicionan dos hidroxilos en la doble ligadura alifática por medio de ácido ósmico. Por pérdida de agua se llega a la desoxicorticosterona.



OBTENCIÓN DE LA DEHIDROANDROSTERONA

Los métodos propuestos para la obtención de la dehidroandrosterona, que se aísla bajo la forma de su semicarbazona, tienen todos la misma base. Para evitar la formación de productos perjudiciales, que se producirían en el proceso de oxidación, debido a la existencia de la doble ligadura y del hidroxilo del colesterol, es necesario protegerlos, saturando la primera con Br y acetilando a dicho hidroxilo. La oxidación se realiza por lo tanto sobre el acetato de dibromocolesterol, y la reacción corresponde a:



Como oxidante, se emplea en todos los métodos CrO_3 , y aunque se ha demostrado la formación de una sustancia con actividad masculina, en la oxidación del colesterol con KMnO_4 , no se ha podido aislar en ningún caso el producto cristalino.

Las diferencias fundamentales, aun dentro del mismo oxidante, son las variaciones de temperatura y el empleo de H_2SO_4 para aumentar la intensidad del proceso oxidativo.

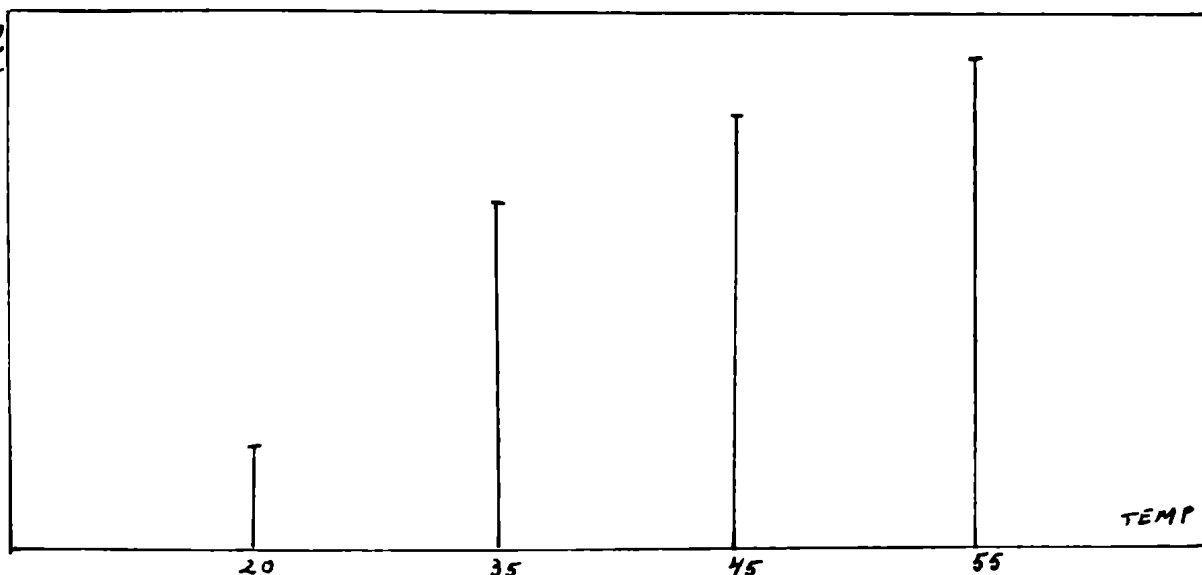
Huzicka y Wettstein (1935) que utilizaron por vez primera el método de oxidación del colesterol en cierta escala, operaron a 45°C como temperatura máxima, y encontraron como ya hemos mencionado antes, que trabajando a alta temperatura, es imposible aislar la sustancia.

A pesar de esta afirmación, Wallis y Fernholz (1935), lograron obtener la semicarbazona de la dehidroandrosterona, oxidando el colesterol a 65°C.

A diferencia de estos dos métodos que utilizan las mismas condiciones de oxidación, introduce Butensandt una modificación, que consiste en la adición de H_2SO_4 a la mezcla oxidante, manteniendo la temperatura a 50°C.

El colesterol es a la temperatura ambiente (20°C), relativamente resistente a la oxidación por el CrO_3 . Como se detalla en la parte experimental, el consumo de O a esa temperatura es pequeño, 1,2 átomos por mol de colesterol, siendo el tiempo de oxidación, 24 hs. La elevación de la temperatura a 35°C, y la adición de H_2SO_4 a la mezcla oxidante, determinan un consumo de O, de 10 átomos por mol de colesterol, de 12,8 átomos cuando se opera a 45°C y de 14 átomos cuando la reacción tiene lugar a 55°C.

At de O
por mol
de colesterol.



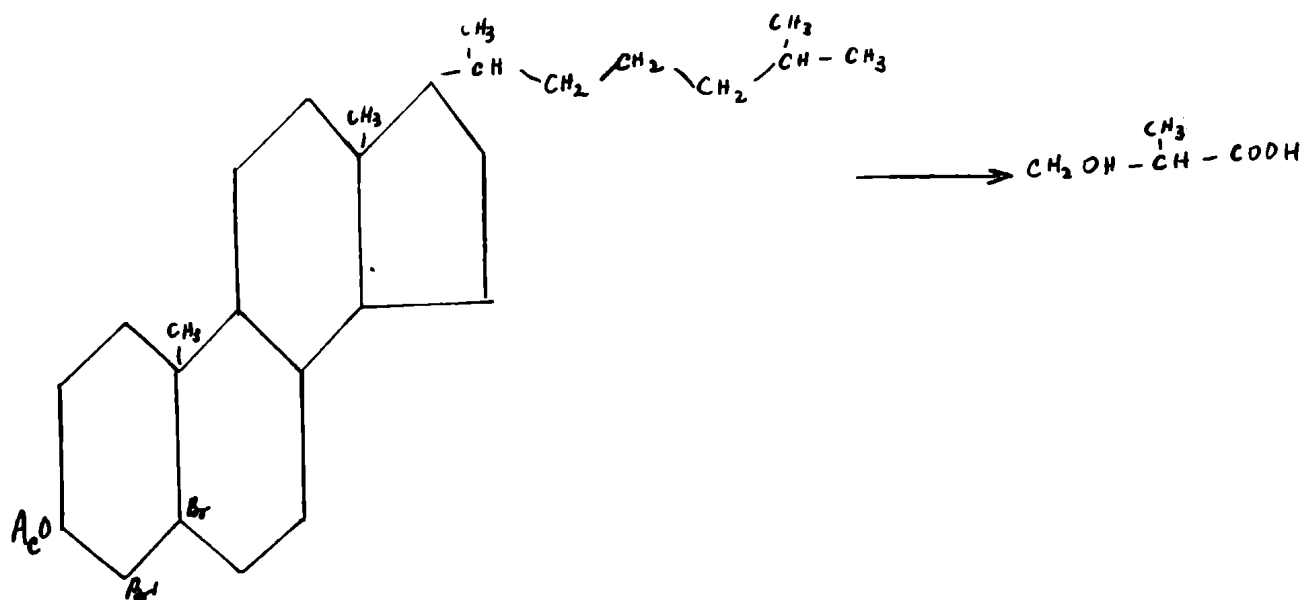
Del elevado consumo de oxígeno, muy superior al calculado por la reacción estequiométrica, se deduce, que en un momento determinado, se produce en la molécula una oxidación tal, que una buena parte de los productos primeramente logrados, son nuevamente oxidados.

Se han obtenido consumos similares de oxígeno en el método de Wallis y Fernholz y el de Butenandt, en el primero el gasto de O de 9,6 a 11,6 átomos gr. por mol de colesterol, oscilando en el segundo el gasto, entre 7,2 y 13,4 átomos por mol de colesterol.

Es evidente que la ausencia de H_2SO_4 en el método de Wallis y Fernholz está compensada por la temperatura mayor empleada, ya que es el H_2SO_4 el que acelera la oxidación en el método de Butenandt.

La importancia del H_2SO_4 , se puede deducir de los bajos consumos observados en el método de Kuzicka, en el cual el gasto de oxígeno osciló entre 5 y 5,3 átomos por mol de colesterol.

Concluida la oxidación, deben realizarse una serie de operaciones destinadas a separar en lo posible las fracciones cetónicas de las otras, debiéndose efectuar además el proceso de debromuración, que se lleva a cabo con Zn y ácido acético, destinado a regenerar la doble ligadura primitiva. Entre los varios productos obtenidos en la oxidación por CrO_3 , además de la dehidroandrosterona, se encuentran varios productos ácidos, eliminables de la solución etérea por lavado con $HONa$ diluido, y entre los cuales puede mencionarse el ácido hidroxibutírico, que se produce por oxidación de la cadena lateral.



Se forman también sustancias volátiles, incluidas cetonas, que algunos autores, eliminan por arrastre con vapor de agua, aunque el proceso no parece siempre necesario; queda así finalmente, una fracción neutra donde existen cetonas no volátiles entre las cuales se halla la dehidroandrosterona.

La separación de esta se ha efectuado en todos los métodos, como semicarbazona, de la cual por hidrólisis y purificación ulterior se obtiene la dehidroandrosterona.

El rendimiento del método queda determinado por la cantidad de semicarbazona obtenida. Nuestros rendimientos han sido muy variables de 180 a 420 mgs de semicarbazona pura (p.f. 265°C) por cada 30 gra de acetato de dibromocolesterol, utilizando el método de Butenandt, y de 483 mgs. en el caso del método de Huzicka, siendo esta semicarbazona más impura, de un p.f. 260°C.

Con el método de Wallis y Fernholz el rendimiento ha sido mayor, pero de una semicarbazona muy impura, de p.f. 230°C y de purificación prácticamente imposible. Lo mismo ha ocurrido, cuando se ha intentado aumentar el rendimiento por concentración excesiva del agua madre de donde debe cristalizar la semicarbazona.

En el cuadro que va a continuación se hace un sumario de los resultados obtenidos:

				Consumo de O	Rendimiento	P.F.
Butenandt	15	grs de acetato de dibromocelastrol		----	180 mgs.	265°C
"	15	" "		12 at de O ₂	94 mgs.	263-265°C
"	15	" "		7,2 " " "	116 mgs.	265°C
"	15	" "		12 " " "	118 mgs	----
"	30	" "		9,6 " " "	420 mgs.	265 C
"	30	" "		13,4 " " "	1018 mgs.	240°C
Wallis y Fernholz	30	" "		9,6 " " "	-----	-----
"	30	" "		11,4 " " "	-----	-----
"	30	" "		11 " " "	1500 mgs.	240°C
Ruzicka	30	" "		5 " " "	483 mgs.	260°C
"	30	" "		5,3 " " "	-----	-----

Se ve claramente que no hay una relación definida entre el consumo de oxígeno y los rendimientos, siendo estos sumamente variables y deben existir otros factores que los determinan, aparte de la intensidad de la oxidación.

Para nosotros; el método más práctico es el de Butenandt. Con él hemos obtenido siempre semicarbazona, lo que no ha ocurrido con los demás; la presencia de H₂SO₄ parece regular la oxidación y permite realizarla en un tiempo más corto que el empleado para los otros métodos. Butenandt hidroliza la semicarbazona y luego purifica la dehidroandrosterona por destilación a vacío. En nuestro caso ese tratamiento es innecesario si se purifica la semicarbazona por cristalización antes de hidrolizarla.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación previa del acetato de dibromo colesterol

Se calientan a reflujo 50 grs. de colesterol en 100 ml de anhídrido acético durante 1 hora. El acetato cristalino formado, se filtra, lava con ácido acético, y se disuelve en 500 ml de éter. La solución se trata con 8 ml de Br disueltos en 250 ml de acético. El acetato de dibromocolesterol formado se filtra, lava con acético y luego con éter de petróleo y se seca; el producto tiene un p.f. 116°C.

Preparación de la semicarbazona de la dehidroandrosterona

Método propuesto por Butenandt (1935)

15 grs de acetato de dibromocolesterol se disolvieron completamente en 750 ml de ácido acético, calentando hasta 80°C, y una vez todo disuelto se lleva la solución a 50°C (1°C). Se añaden a la misma en el transcurso de una hora y conservando siempre la temperatura 50 grs de CrO₃ disueltos en una mezcla de 35 ml de agua y 90 ml de acético; y 5,6 ml de H₂SO₄ concentrado diluidos en 75 ml de acético. Al comenzar la operación el CrO₃ se reduce inmediatamente, virando al verde, dejando de ser visible el viraje al cabo de un cierto tiempo de iniciado el agregado de oxidante, pues una porción del añadido no reacciona de inmediato. Terminada la adición se mantiene la temperatura y la agitación durante 3 hs.; al cabo de las cuales se deja enfriar la solución y se le adiciona una solución de 10 grs de acetato de potasio en 100 ml de acético y 150 ml de alcohol etílico. El CrO₃ no consumido es reducido, y la solución toma una coloración verde botella, apareciendo además un precipitado blancuzco. El total de la solución se concentra a vacío, manteniéndose la temperatura del baño entre 45-50°C, hasta un volumen de 150 ml.

Se le añaden entonces 750 ml de agua, lo que produce un abundante precipitado; la suspensión acuosa se extrae con éter a fondo.

En la solución etérea se encuentran la mayor parte de los productos orgánicos de alto peso molecular, derivados de la oxidación del colesterol, y algo de sales de cromo como lo indica el color de la solución. Para eliminar las fracciones ácidas se lava primero dos veces con agua que elimina el alcohol y ácido acético y luego con solución de NaOH 2N, hasta que una extracción se mantenga alcalina. Luego se lava por dos veces con HCl diluido al 10%.

El éter contiene en ese momento tan solo los productos neutros de la oxidación, y se evapora a baja temperatura. Se obtiene un jarabe que se disuelve en 30 ml de acético, a la solución se añaden poco a poco y agitando 10 grs de polvo de Zn , calentando la mezcla durante 10' a baño maría hirviente. En esta forma se elimina el Br unido al colesterol o a sus productos de oxidación.

Esta mezcla se extrae nuevamente con éter, previa dilución con agua, el éter lavado y evaporado a sequedad, da un jarabe color caramelo produciéndose por enfriamiento la precipitación de una substancia blancuzca, que es el colesterol sin transformar. Esta masa se seca perfectamente en desecador con vacío, disolviéndola luego en 20 ml de alcohol absoluto; a esta solución se le adiciona una de 2 grs de clorhidrato de semicarbazida y 2 grs de acetato de sodio. Esta solución se prepara agregando unas gotas de agua a la semicarbazida y calentando, al agregar el acetato de sodio, el agua de cristalización es suficiente para provocar la disolución total, por agregado de alcohol absoluto se produce la precipitación del ClNa , que se elimina por centrifugación.

Hervida la mezcla 4 hs. a reflujo, se deja enfriar y se diluye con

agua, se forma un precipitado que se extrae con éter, quedando insoluble la semicarbazona, que se filtra, lava con éter y seca. En este caso se aislaron 180 mgs. de semicarbazona en forma de cristales aciculares de p.f. 265°C.

Segunda preparación según Butenandt:

En esta operación se emplearon exactamente las mismas cantidades que en la anterior, realizándose la titulación del CrO_3 presente al final de la misma, que resultó ser de 8,7 grs, es decir que se consumieron 21,3 grs equivalentes a 12 átomos gr. de O por cada mol de acetato de dibromo colesterol. En este caso al diluir con agua y añadir éter a la solución hervida con semicarbazida, no se produjo inmediatamente la separación de cristales de semicarbazona, apareciendo estos solo al cabo de varios días. Se comprobó que efectivamente eran cristales de semicarbazona y pesaban 94 mgs. siendo su p.f. 263-265°C.

Tercera preparación según Butenandt:

Se emplearon las mismas cantidades que en los casos anteriores. Por razones no determinadas el consumo de CrO_3 fué tan solo de 12 grs. correspondientes a 7,2 at gr por mol de colesterol. El rendimiento en semicarbazona fué de 166 mgs. con un p.f. de 265°C. Se hizo evaporar un poco la solución alcohólica antes de añadir el agua y éter.

Cuarta preparación según Butenandt:

Se procedió como en el caso anterior, salvo una pequeña modificación en la técnica, consistente en la neutralización con HONa al 5% después de efectuada la debromuración. Para esto se tuvo en cuenta, la posible acción nociva de la soda, sobre los productos aun bromu-

rados. El consumo de CrO_3 fué de 20 grs correspondientes a 12 atomos gr de O por mol de colesterol. El rendimiento fué de 128 mg. siendo el p.f. de la semicarbazona 265°C

Quinta preparación segun Butenandt:

En esta operación se emplearon cantidades dobles a las utilizadas en las anteriores, 30 grs de acetato de dibromocolesterol de p.f. 113°C , se disolvieron en 1500 ml de ácido acético, y se oxidaron con 60 grs. de CrO_3 y 11,2 ml de H_2SO_4 en las condiciones anteriormente citadas. El exceso de CrO_3 se destruyó por adición de 200 ml de alcohol, despues de añadir 20 grs de acetato de potasio disueltos en 200 ml de acético. La concentración a vacio se realizó manteniendo el baño entre $45-50^\circ\text{C}$ y los 2200 ml de la solución original se llevaron a 250 ml. Se diluyó con 800 ml de agua y se extrajo con alrededor de 800 ml de éter distribuidos en varias extracciones.

La solución etérea se lavó dos veces con 100 ml de agua, añadiendo al residuo de la solución etérea evaporada 60 ml de ácido acético y agregando luego poco a poco y agitando 20 grs de polvo de Zn , la mezcla se calentó 30' a baño maria hirviente. Se extrajo con 500 ml de éter y este éter se trató con solución de HONa al 5%, hasta que el líquido de lavado fuera alcalino al fenol red. Se emplearon en total 460 ml de solución. Este éter fué luego lavado con HCl al 10%, dos veces, empleando 50 ml por vez. Evaporado el éter, el residuo se desecó a vacio dando una masa pastosa, cuyo peso era de 9,5 grs. Esta masa disuelta en alcohol absoluto, se trató en las condiciones habituales, con solución de semicarbazida, preparada con 4 grs de clorhidrato de semicarbazida y 4 grs de acetato de sodio. Se concentró la solución alcohólica hasta la mitad de su volumen,

luego de hervir a reflujo durante 4 hs, se obtuvieron 420 mg de semicarbazona de p.f. 265°C.

En esta operación se comprobó que al terminar de añadir la solución oxidante, el consumo de CrO_3 había sido de 30,8 grs o sea 9,8 átomos gr. de O por mol de colesterol y que al cabo de una hora este consumo se había elevado a 32 grs o sea 9,6 at gr de O por mol, lo que significa que el consumo es pequeño al final.

Sexta preparación según Butenandt

Se emplearon cantidades iguales que en el caso anterior, es decir 30 grs de acetato de dibromo colesterol que se oxidaron con 60 grs de CrO_3 . El consumo de O, fué de 13,4 átomos gr. por mol de acetato de dibromocolesterol. En esta experiencia se procedió a concentrar la solución alcohólica de semicarbazona, antes de echarla en agua y extraerla con éter. Se procedió así haciendo la suposición que los rendimientos bajos en semicarbazona podrían ser consecuencia de una mayor solubilidad de la misma en un exceso de alcohol. Se observó que concentrando excesivamente se obtiene una semicarbazona muy impura. Se obtuvieron 1018 mg de p.f. 240°C descomponiéndose la sustancia al fundir

Preparación de la semicarbazona de la dehidroandrosterona
según Muzicka y Wettstein (1935)

Primera preparación:

30 grs de acetato de dibromocolesterol, preparados como se indicó en el método de Butchardt, se disolvieron en 1100 ml de ácido acético y la solución se mantuvo a 45°C en la forma más constante posible. En el transcurso de 4 hs, se añadieron 39,5 grs de CrO_3 disueltos en 105 ml de acético al 90%. La mezcla se continuó calentando con agitación constante, durante 5 hs. más, a 45°C en forma uniforme. Al cabo de este tiempo se calculó el gasto de CrO_3 , titulando el exceso del mismo, este consumo de CrO_3 resultó ser de 16,7 gr. lo que equivale a 5 átomos gr. de O por mol de colesterol. El CrO_3 en exceso se redujo con alcohol y la mezcla total se evaporó a vacío con una temperatura del baño de 45°C, llevándose a un volumen de 300 ml. El residuo se diluyó con agua, 1 lt, y se sometió a un arrastre de vapor a vacío, extrayéndose luego el residuo con éter, el éter se lavó con 100 ml de solución de H_2SO_4 al 5%, 100 ml de solución saturada de CO_3HNa y 200 ml de agua. Evaporado el éter se procedió a eliminar el Br, para lo cual se disolvió la masa en 60 ml de acético y se agregaron poco a poco y agitando 20 grs. de polvo de Zn, calentando la mezcla durante media hora en baño maría hirviente. Filtrado el Zn, se diluyó con agua y se extrajo con 300 ml de éter, repartidos en varias veces, se lavó el éter con 90 ml de HONa 2N. Evaporado el éter, el residuo se disolvió en 50 ml de alcohol absoluto, y se trató con una solución, también en alcohol absoluto, de 4 grs de clorhidrato de semicarbazida y 4 grs de acetato de sodio.

Se obtuvieron cristales impuros de semicarbazona (p.f. 240°C) que por esa razón se recrystalizaron de metanol, dando 483 mgs de p.f. 260 C.

Otros ensayos con el método de Huzicka:

Se hicieron otros tres ensayos con el método indicado, ninguno de los cuales dió resultado. En ninguno de ellos la temperatura se mantuvo tan constante como en el citado ensayo, y en uno se trabajó a 50 °C. Los detalles que los diferencian son los siguientes:

Ensayo segundo : Se emplearon 10 gra de acetato de dibromocolesterol disueltos en 500 ml de acético y 11,5 gra de CrO₃ para oxidar, siendo la temperatura de 45-50°C. El consumo total de CrO₃, fué de 5,7 gra lo que equivale a 5,2 at gr de O por mol de colesterol.

Ensayo tercero: Se emplearon 15 gra de acetato de dibromocolesterol y 19 gra de CrO₃. La temperatura fué de 45-60°C. El consumo total de CrO₃ fué de 8,8 gra lo que equivale a 5,2 átomos de O por mol de colesterol.

Ensayo cuarto: Se emplearon 15 gra de acetato de dibromocolesterol y 17 gra de CrO₃, manteniendose la temperatura entre 45-50°C. El consumo de O, fué de 5,2 átomos gr. por mol de colesterol.

Marcha del consumo de oxígeno :

Primera hora	CrO ₃ gastado	5,1	grs	equivalentes	a	3	at	gr	por	mol
Segunda	"	"	"	7,2	"	"	"	4	"	"
Tercera	"	"	"	7,2	"	"	"	4	"	"
Cuarta	"	"	"	8,1	"	"	"	5	"	"
Quinta hora	<hr/>									
Sexta	"	"	"	8,1	"	"	"	5	"	"

Preparación de la semicarbazona de la dehidroandrosterona
según Wallis y Fernholz (1935)

Primera preparación:

30 grs de acetato de dibromocolesterol, preparado según el procedimiento indicado en el método de Butenandt, se disolvieron en 700 ml de ácido acético glacial y se los llevó a 65 °C a baño maría. Manteniendo uniforme la temperatura, se añaden con agitación 50 grs. de CrO_3 disueltos en 50 ml de agua y 200 ml de ácido acético. La mezcla se mantuvo 6 hs más con agitación y temperatura constante. Se habían gastado al cabo de ese tiempo 36 grs de CrO_3 o sea 9,6 átomos gr. de O por mol de colesterol.

Se enfrió la solución, se voló en 3 lts de agua y se extrajo con éter. A la solución éterea lavada con HCl diluido al 10%, para eliminar las sales de Cr, se le añaden 30 grs de polvo de Zn y 200 ml de ácido acético y se destiló el éter. La mezcla que queda se calentó a baño maría hirviente durante 2 hs. para separar totalmente el Br orgánico, se extrajo nuevamente con éter, y la solución éterea se lavó con HONa al 8%. Aparece en estas extracciones un precipitado, que no es sino la sal de sodio del ácido hidroxicoleónico, que se forma durante el proceso de oxidación, pero que hemos desechado en nuestra experiencia. Eliminadas todas las sustancias ácidas se evaporó el éter y los productos neutros de la oxidación se sometieron a un arrastre con vapor para eliminar la fracción volátil. El residuo orgánico bien seco se disolvió en 20cc de alcohol absoluto y se trató con una solución de 4 grs de clorhidrato de semicarbazida y 4 grs de acetato de sodio en 30 ml de alcohol absoluto.

Hervida a reflujo durante 2 hs, la mezcla resultante se diluyó con agua y se extrajo con éter, no se separó nada de semicarbazona en esta experiencia.

Segunda preparación:

Se repitió el mismo procedimiento del caso anterior, el consumo de O en este caso de 11,4 at gr de O por mol colesterol. En esta oportunidad no se pudo aislar tampoco semicarbazona cristalizada.

Tercera preparación: Se realizó según las normas dadas para los casos anteriores, salvo que la mezcla alcohólica con la semicarbazida luego de hervida, se concentra para eliminar alcohol antes de echarle el agua y éter. El consumo de O fué de 11 atomos gr. por mol de colesterol. Dió 1500 mgs. de un producto cristalino muy impuro que funde a 230°C descomponiéndose, e imposible de purificar por recristalizaciones sucesivas de benzol- alcohol metílico.

Obtención de la trans dehidroandrosterona

1) Purificación de la semicarbazona

Se partió de semicarbazona de p.f. 265 °C obtenida por el método de Huttenandt, que fué recristalizada dos veces de cloroformo-metanol obteniéndose cristales incoloros de p.f. 270°C.

Una concentración de las aguas madres nos dió una nueva cantidad de cristales incoloros de p.f. 270°C.

2) Obtención de la trans dehidroandrosterona

200 mgs. de semicarbazona purificada se hirvieron durante media hora en 15 cc de una mezcla de 10% de HCl d1,19 y 90 cc de alcohol de 96°. Terminada la ebullición se añadió abundante agua, con lo cual apareció una turbidez. La solución se extrajo cinco veces con éter, se lavó con HONa diluido y con agua. Secado y evaporado dió directamente cristales que funden a 142°C. Recristalizados de benzol-éter de petróleo se los obtiene en formas de finas agujas que funden a 144°C. En la literatura se señala que la trans dehidroandrosterona presenta dos formas de cristales, una fundiendo a 140-141°C y la otra 152-153°C. Para la mezcla corriente de ambas se da p.f. 146- 148°C.

Estudio del consumo de oxígeno a diversas temperaturas

Temperatura 25°C A 5 grs de acetato de dibromocolesterol disueltos en 250 ml de acético se le añadieron 9,4 grs de CrO_3 disueltos en 12 ml de agua y 30 ml de acético. La mezcla se mantuvo durante 24 hs, a 20°C. Titulando la mezcla al comenzar la operación tenía un equivalente de 8,7 átomos gr. de O; titulada nuevamente al cabo de las 24 hs el equivalente era de 7,5 átomos gr. por lo tanto el consumo de O fué de 1,2 at gr por mol de acetato de dibromocolesterol.

Temperatura 35°C A 2 grs de acetato de dibromocolesterol disueltos en 100 ml de acético se le añadieron 4 grs de CrO_3 disueltos en 12 ml de acético y 0,8 ml de H_2SO_4 en 10 de acético. Se mantuvo la mezcla durante 4 hs, a 35 °C. Titulado el exceso de CrO_3 se calculó un gasto de O de 10 átomos gr. por mol de colesterol.

Temperatura 45 °C 15 grs de acetato de dibromocolesterol se disolvieron en 750 ml de acético y se trataron con 29 grs de CrO_3 disueltos en 50 ml de acético y 5,6 ml de H_2SO_4 en 75 ml de acético. El consumo de O fué de 12,8 átomos gr por mol de colesterol. Como se empleó una cantidad relativamente grande de acetato de dibromocolesterol se intentó el aislamiento de la semicarbazona de la dehidroandrosterona, obteniéndose unos pocos cristales de p.f. 265°C y que eran evidentemente ese producto.

Temperatura 55 °C Se partió igualmente de 15 grs de acetato de dibromo colesterol y se utilizaron las mismas cantidades de oxidante que en el caso anterior. El consumo de O fué de 14 átomos gr. por mol de colesterol, no habiéndose aislado nada de semicarbazona.

OBTENCION DEL COLESTEROL

Siendo el colesterol la materia prima necesaria para la obtención de la dehidroandrosterona, encontramos conveniente prepararlo. Hicimos en primer lugar la búsqueda bibliográfica correspondiente sobre los diversos métodos posibles, pero sin mayor resultado.

El órgano utilizado para su extracción es la medula, como lo mencionan la mayor parte de los trabajos y patentes, y los métodos empleados, salvo raras excepciones, consisten en su disolución por el empleo de disolventes adecuados, saponificación del material obtenido en esa primera extracción y purificación del colesterol libre obtenido. Son ejemplos de métodos diferentes, la patente americana N° 2.191.260 presentada por Persche y Selms para Armour y C° consistente en la hidrólisis directa de la medula con hidróxido alcalino térreo y extracción del colesterol de la mezcla resultante por medio de disolventes adecuados; y el método criogénico, para extracción de colesterol de cerebro, de Remezov y Leveshova (1936). Aunque la bibliografía es escasa, se encuentra algún trabajo referente a la obtención del colesterol por medio de disolventes como primera operación. Puede citarse el trabajo de Giesy (1920) en el cual se indica la posibilidad de obtener 2 lbs de colesterol a partir de 100 lbs de medula.

Como el exacto empleo del método no representa ninguna ventaja para el trabajo, aplicamos a la medula un método similar pero no idéntico al citado, empleando disolventes y consistente en su extracción con acetona, saponificación del extracto y purificación por el método habitual. Aunque se trabajó en pequeña escala, se han obtenido rendimientos del 7 al 8% en colesterol de p.f. 140-143°U

Parte experimental

Preparación del colesterol:

Ensayo realizado según la patente N° 2.191.260

800 grs de medula fresca se empastaron con lechada de cal y la mezcla resultante se calentó durante 3 hs. en autoclave a 125 C. El producto, sin secar, se extrajo con acetona y el producto de evaporación de la acetona se trató de cristalizar de alcohol. No se obtuvo ningún rendimiento y se puede asegurar que el extracto cetónico no contenía colesterol, porque haciéndole la reacción de Lieberman Beuchard con anhídrido acético y ácido sulfúrico, no se obtuvo coloración, se empleó como testigo solución de colesterol.

Repetido el ensayo con 800 grs de medula fresca molida, igual que en el caso anterior, se procedió a la saponificación con lechada de cal. El producto resultante de la saponificación se dividió en dos partes: una de ellas se secó a baño de vapor y se extrajo en un extractor continuo con acetona, del extracto cetónico filtrado, cristalizó un producto de p.f. 130 C con un rendimiento de 6 grs.

La otra parte se trató con HCl y la mezcla se extrajo con acetona, dejando una noche en contacto. Evaporada la solución y tratado el producto con alcohol se obtuvieron cristales de p.f. 132 C con un rendimiento de 7,2 grs.

Método empleando la extracción previa con disolventes:

100 grs de medula desecada a vacío y a baja temperatura, se extrajeron con acetona, dejándola en contacto durante 24 hs. El extracto cetónico evaporado, la masa resultante se saponificó con HONa al 10%, hirviendo a reflujo durante 4 hs.

La mezcla resultante se tomó con éter, y el residuo del éter se cristalizó de alcohol etílico. Se obtuvieron 7 grs de colesterol de p.f. 140°C

Partiendo de la doble cantidad de médula desecada y procediendo exactamente en la forma indicada, se obtuvieron 15 grs de colesterol de p.f. 142°C

FOFN-BA.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Berthold A.A. Arch.f. Anat. Physiol. u wissenschaft. Med. 1849:42
- 2 Brown- Sequard C.S. Arch de Physiol. Norm et path. 21: 651,740 1889
- 3 Butenandt y Tscherning Ztschr. Physiol. Chem. 229: 167 1934
- 4 Butenandt y Dannenbaum H. S. Ztschr. Physiol. Chem. 229:192 1934
- 5 Butenandt y Schmidt Tomé Ber. 77b: 182 1939
- 6 Butenandt y Dannenbaum H.S. Ztschr. Physiol. Chem. 237:57 1935
- 7 David Act. Brev. Neerl. 4: n° 5/6 1935
- 8 Freud, de Fromery y Laqueur Pflügers Arch. 229:763 1932
- 9 Gallagher y Koch J. Biol. Chem. 84: 495 1929
- 10 Gallagher y Koch Proc. Soc. Int. Congr. for Sex. Res. 312 1930
- 11 Gallagher y Koch Proc. Am. Soc. Biol. Chem. 8: 47 1933
- 12 Glosy Science 51:350 1920
- 13 Koch, Gallagher y Moore Int. Physiol. Cong. Abst. 8148 1929
- 14 Laqueur, David, Dingemans y Freud Act. Brev. Neerl. 4:5 1935
- 15 Mc Gee Proc Inst. Med. Chicago 6:242 1927
- 16 Miescher y Fischer Helv. Chim. Acta 22:1586 1939
- 17 Pezard Comp. rend. de l'Acad. de Sc. 153:1027 1911
- 18 Ruzicka, Goldberg y Brüniger Helv. Chim. Acta.17:1389 1935
- 19 Ruzicka, Goldberg, Brüniger y Eichenberg Helv.Chim. Acta 17:1395
1934
- 20 Ruzicka y Wettstein Helv Chim Acta 18:986 1935
- 21 Ruzicka y Wettstein Helv Chim. Acta 18:1264 1935
- 22 Remesov y Levashova Z. physiol. Chem. 241:81 1936
- 23 Steinach Pflüger's Arch. 56:308 1894
- 24 Schoeller, Serini y Gährke Naturwiss. 23:337 1935

- 25 Serini, Logeman e Hildebrandt Ber. 72:b:392 1939
26 Walker Proc. Roy. Soc. med., Path. Sect. 1:153 1908
27 Windaus Ber. 1903
28 Windaus y Resau Ber. 1913
29 Wallis y Fernholz J. Amer. Chem. Soc. 57:1504 1935

FOFNA.