

## Tesis de Posgrado

# Determinación del "índice de acetilo" por el método de Kuhn y Roth : extensión del método a la determinación del grupo propionilo, aplicaciones

Gerzenstein, Dora

1943

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Gerzenstein, Dora. (1943). Determinación del "índice de acetilo" por el método de Kuhn y Roth : extensión del método a la determinación del grupo propionilo, aplicaciones. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0343\\_Gerzenstein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0343_Gerzenstein.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Gerzenstein, Dora. "Determinación del "índice de acetilo" por el método de Kuhn y Roth : extensión del método a la determinación del grupo propionilo, aplicaciones". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1943.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0343\\_Gerzenstein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0343_Gerzenstein.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

DETERMINACION DEL "INDICE DE ACETILO" POR EL METODO DE KUHN Y NOTH  
EXTENSION DEL METODO A LA DETERMINACION DEL GRUPO PROPIONILO  
APLICACIONES

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA PRESENTADA POR

DORA GERZENSTEIN

*tesis: 343*

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS , FISICAS Y NATURALES  
1943

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Doctor Rafael A. Labriola bajo cuya dirección se ha realizado este trabajo y en quien he encontrado siempre durante la realización del mismo, una amable disposición y un eficaz asesoramiento.

Hago extensivo dicho agradecimiento al Doctor Venancio Deulofeu por sus indicaciones en la parte referente a "Venenos de Sapos". Asimismo quedo reconocida a la Doctora Argela Muruzabal, quien ha efectuado los análisis de las sustancias preparadas.

Noviembre 1943.

Lora Gerzeustein

DEL REFINACION DEL "INDICE DE ACETILO". METODO DE KUHN Y ROTZ

Solo en contados casos es posible deducir el número de grupos acetilos que contiene la molécula de una sustancia basándose en los resultados del análisis centesimal. De ahí la necesidad de separar el grupo acetilo de la molécula determinando directa o indirectamente el ácido acético formado. Los distintos métodos para determinar el "índice de acetilo" difieren por la forma en que realizan la saponificación y la manera en que titulan el ácido liberado, aunque el primer factor es el que presenta más variantes, pues debe adaptarse a las propiedades de las sustancias en análisis: solubilidad, facilidad de saponificación, sensibilidad al oxígeno del aire, etc.

Algunas sustancias se saponifican ya por la acción de la humedad del aire (acetil-trifenilcarbinol, o por simple disolución en agua (acetil-dioxipiridina); la butenil-triacetina cede sus grupos acetilos por calentamiento en tubo sellado, a 160° en disolución acuosa. Pero excepción hecha de estos casos particulares en general es necesario calentar durante un tiempo en presencia de sustancias de carácter ácidoalcalino para que la saponificación sea completa. Lieberman (1884) parece haber sido el primero en aplicar el ácido sulfúrico (ácido al 70% y calentamiento a baño-maria). Posteriormente el método sufrió numerosas modificaciones tanto en lo que se refiere a la concentración del ácido como al tiempo y temperatura de calentamiento. El ácido sulfúrico comporta la posibilidad de formación de anhídrido sulfuroso, así como de productos de la carbonización parcial de la sustancia en análisis.

Se hicieron ensayos con el ácido fosfórico, pero debido a su carácter de ácido débil su acción es demasiado lenta. Por ello se pensó en la utilización de ácidos sulfónicos que presentan sobre el ácido sulfúrico la ventaja de no producir anhídrido sulfuroso y de no actuar sobre las sustancias en análisis y sobre el ácido fosfórico la de ser ácidos más enérgicos y por lo tanto de acción más rápida. Louborough y Thomas (1905) ensayaron con buen resultado los ácidos benzenosulfónico,  $\alpha$ -naftol-sulfónico y  $\beta$ -naftol-sulfónico; Freudenberg y Harder (1923) aplican el ácido p-toluenosulfónico igualmente con buen resultado. Los ácidos sulfónicos mencionados son sometidos a una purificación previa para separar todo vestigio de ácidos volátiles. Cuando la sustancia no se saponifica en medio ácido se efectúa la saponificación con reactivos alcalinos, comúnmente hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Si la sustancia no es soluble en la solución alcalina acuosa se usan otros disolventes: alcohol etílico, alcohol propílico, amílico, o bencílico (este último para acetaminas sustituidas que en general son difícilmente saponificables). El alcohol etílico presenta el inconveniente de oxidarse un poco cuando el calentamiento es prolongado. De ahí que se prefiera sustituirlo por el alcohol metílico con lo cual el error debido a esta circunstancia se reduce; además el alcohol metílico tiene menor tendencia a resinificarse que aquél.

En la saponificación alcalina pueden producirse reacciones secundarias que falsean los resultados; así Erdman y Schultz observaron que la acetilhematoxilina desprende ácido fórmico cuando se calienta con hidróxido de sodio.

Otras sustancias no atacadas en las mismas condiciones dando productos coloreados que enmascaran el viraje del indicador si la determinación es directa.

En los casos señalados se impone utilizar sustancias alcalinas de acción más débil, hidróxido de bario, hidróxido de calcio (1898) o hidróxido de magnesio (1899).

Si la sustancia es sensible al álcali libre se efectúa la saponificación con alcoholato de sodio (1901) en solución alcohólica o con acetato de sodio, también en solución alcohólica (1889).

Los diversos procedimientos señalados indican que en lo que respecta a los medios empleados para efectuar la saponificación es menester examinar detenidamente en cada caso las interferencias que puedan concurrir y seleccionar las condiciones que más se aceptan al problema en estudio. Corresponde considerar ahora los diferentes procedimientos aplicados a la titulación del ácido liberado.

La acidocalcalimetría se puede aplicar directamente sobre la mezcla en que se ha efectuado la saponificación, en cuyo caso se habrá usado una cantidad conocida de la solución valorada de ácido o de álcali. La titulación puede efectuarse usando indicador solamente cuando la mezcla no es lo suficientemente coloreada como para enmascarar el viraje del indicador. Si este fuera el caso, se efectúa una valoración electrométrica. Además, la titulación directa no será aplicable cuando habiéndose efectuado la saponificación alcalina la sustancia analizada sea de tal naturaleza que puede dar funciones ácidas distintas del

ácido acético ; es el caso de las sustancias que contienen agrupaciones lactonas, lactamas, anhídrido, etc.

Cuando por cualquiera de los motivos señalados no resulta ventajosa la titulación directa ,se separa el ácido acético del balón de reacción por destilación y se titula el destilado.

En algunas técnicas se efectúa una sola titulación ,para lo cual se agota el contenido del balón de reacción (A. Elek y R. A. Harte). En otras como la de Kuhn y Roth, se recoge varias porciones de destilado que se titulan separadamente.

La titulación por yodometría es siempre indirecta .Es utilizada por A. Elek y R. A. Harte ,que saponifican con ácido paratoluenosulfónico.

Desde el punto de vista de la cantidad de sustancia que requieren los métodos de determinación de índice de acilo pueden clasificarse en

- a) -Macrométodos
- b) -Semi-micrométodos
- c) -Micrométodos.

#### METODO DE KUHN Y ROTH

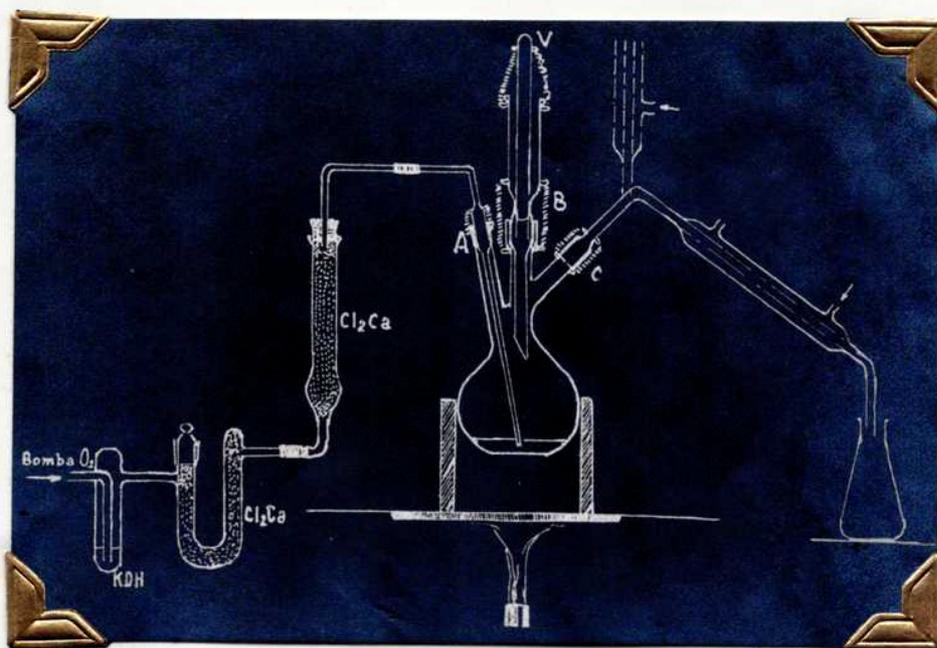
Nosotros hemos aplicado en nuestro trabajo el semi-micrométodo de Kuhn y Roth que pasamos a describir.

#### Principio

La saponificación se realiza en medio ácido o alcalino .En el primer caso

se usa ácido sulfúrico al 50% en peso. (dos volúmenes de agua y un volumen de ácido sulfúrico). En la saponificación alcalina se usa solución normal del hidróxido de sodio en alcohol metílico - agua. La titulación es indirecta, sobre varias fracciones de destilado y fenolftaleína como indicador

### Descripción del aparato



Es conveniente construir el aparato de vidrio Jena 20, o mejor aun de cuarzo. De culaquier modo, es indispensable que el refrigerante y el colector sea de este material.

El aparato consta de un Baloncito A de 50 centímetros cúbicos de capacidad, provisto de tres tubos a , b , c , cada uno con su esmeril. Al esmeril a , se adapta el tubo de entrada de gas, que burbujea durante toda la determinación , habiendo pasado previamente por dos tubos uno en U y otro recto, rellenos con cloruro de calcio; al esmeril b , se adapta un embudo, cuya abertura

se cierra herméticamente con una varilla V, cuyo extremo es empujable. Al empujarlo, va conectado el refrigerante que puede estar en posición vertical o descendente, pasando de una a otra posición por simple rotación, sin necesidad de desconectarlo. Para calentar el balón, se interpone entre éste y la llama una cámara de aire (se realiza prácticamente apoyando el baloncito sobre un cilindro de amianto cuya otra base descansa en la tela metálica).

#### Reactivos necesarios

- a)- Solución de ácido sulfúrico al 50% en peso: dos volúmenes de agua y un volumen de ácido sulfúrico.
- b)- Solución metilalcohólica-acuosa normal de hidróxido de sodio (40 gramos de hidróxido de sodio se disuelven en una mezcla de 500 centímetros cúbicos de agua e igual volumen de alcohol metílico). El alcohol metílico se hierve previamente durante dos horas a reflujo sobre hidróxido de sodio y se destila en este medio; es recomendable también destilar el agua sobre hidróxido de sodio.
- c)- Solución de hidróxido de sodio 1/50 N controlada con ácido oxálico de igual título

#### Práctica de la determinación

##### 1)- Pesada

Si la sustancia problema es sólida, se pesa en tubos cónicos de vástago largo que permite suspenderlos de los ganchos que para tal objeto tiene el platillo. La pesada se efectúa en balanza analítica que aprecia el décimo

de miligramos. En nuestro trabajo hemos utilizado una micro-balanza debido a la circunstancia de contar en el laboratorio con una Sartorius con amortiguador de aire que aprecia hasta la Y con un error de  $\pm 5\%$ . Es decir que asegura la quinta cifra decimal. Se pesa el tubito cargado con la sustancia, se descarga esta en el baloncito por el tubo lateral **g**, y vuelve a pesar el tubito. Se pesan entre 20 y 30 miligramos de sustancia.

Para pesar sustancias líquidas (algunos éteres) se efectúa la pesada en pesafiltros de Mayer, apoyados en un pequeño vasito. Para cargar el pesafiltros se usan micropipetas (hechas en el laboratorio). Debe ajustarse el taponcito del pesafiltros lo suficiente como para evitar la evaporación de la sustancia durante la pesada, pero no tanto como para que no se desprenda una vez que comienza a hervir el líquido del baloncito de reacción. Se pesa el pesafiltros vacío, se carga con la sustancia y se vuelve a pesar. Finalmente se introduce por la rama **g** del baloncito.

## 2, -Reactivación

El aparato se lava primero con mezcla sulfocrómica, después con agua destilada y finalmente se seca. Por el tubo lateral **g** se introduce la sustancia o el pesafiltros de Mayer si se trata de un líquido. En el primer caso se hace pasar aproximadamente un centímetro cúbico de agua destilada para arrastrar la sustancia que pudiera quedar adherida; se moja con una gota de agua destilada el caseril del refrigerante y se lo conecta en posición vertical. Se conectan con

sus respectivos esmeriles, lubricados con ácido metafosfórico (obtenido por hidratación de anhídrido fosfórico) el tubo abductor de gas y el embudo. Se hace pasar una corriente de gas (nitrógeno, hidrógeno, oxígeno, aire), de treinta burbujas por minuto, medidas en cuenta-burbujas cargado con ácido sulfúrico de densidad 1,8 puesto antes del tubo en U; se añaden por el embudo aproximadamente 12 centímetros cúbicos de solución metilalcohólica de hidróxido de sodio. Se tapa el embudo con la varilla cuyo extremo fué mojado con agua cubriéndose el fondo con agua. (aproximadamente un centímetro cúbico), se calienta a reflujo: tres horas si es N-acetilo y media hora si es O-acetilo.

Terminada la saponificación se deja enfriar el baloncito; se levanta la varilla V dejando caer el agua; se vuelve a colocar cubriendo nuevamente el fondo del embudo con un centímetro cúbico de agua; se lava el refrigerante con unos seis centímetros cúbicos de agua destilada, y haciéndolo girar en el esmeril se coloca en posición descendente. Se destila el metanol debiendo recogerse unos quince centímetros cúbicos de líquido. Se enfría nuevamente el baloncito, se levanta la varilla V se echan tres centímetros cúbicos de ácido sulfúrico al 50% y cinco centímetros cúbicos de agua destilada. Se tapa nuevamente el embudo cubriendo con un centímetro cúbico de agua el fondo, y se da comienzo a la destilación.

Cuando se puede efectuar la saponificación con ácido sulfúrico, el análisis se simplifica mucho, pues una vez cargado el baloncito, con la sustancia, se echan por el embudo tres centímetros cúbicos de ácido sulfúrico al 50% y cinco centímetros cúbicos de agua destilada. Finalizada la saponificación, se enfría el baloncito lavando el refrigerante con seis centímetros cubi-

cos de agua se pone en posición descendente y finalmente se inicia la destilación.

### 3)-Destilación del ácido acético

L'Orsah estudia la influencia de los distintos factores sobre la marcha de la destilación del ácido acético y llega a las siguientes conclusiones:

a)-Para recuperar una cantidad dada de ácido acético es necesario recoger un mayor volumen de destilado cuando se usa ácido fosfórico en vez de ácido sulfúrico para desplazar al ácido acético.

b)-El número de destilaciones está vinculado al volumen residual del líquido en el baloncito. Al disminuir este volumen disminuyen proporcionalmente las destilaciones hasta recuperación total del ácido acético.

Nunca se alcanza un punto final igual a cero, pues llega un momento, como puede demostrarse haciendo el ensayo en blanco, en que destila una cantidad constante de acidez, que es casi siempre la misma, y varía con el título del álcali. De ahí la necesidad de fijar normas bien precisas para la destilación.

Se procede en la siguiente forma: se destilan primero cinco centímetros cúbicos de líquido y se añaden por el esbuce cinco centímetros de agua destilada; por tres veces más se repite esta operación. Se obtienen así 20 centímetros cúbicos de destilado que se titulan con el hidróxido de sodio, valorado usando fenolftaleína como indicador. Inviament a la titulación

se comprueba la ausencia de ácido sulfúrico (con cloruro de bario al 10%) y se hierva el líquido durante breves segundos para eliminar el anhídrido carbónico y el anhídrido sulfuroso que eventualmente pudo formarse por reducción del ácido sulfúrico.

Se reúnen en otra fracción catorce centímetros cúbicos de destilado, procedentes de dos porciones de siete centímetros cúbicos cada una con reposición de la cantidad destilada. Se recogen otras dos fracciones de catorce centímetros cúbicos cada una, y después fracciones de siete centímetros cúbicos cada una hasta que el último destilado no requiera más que 0,08-0,10 centímetros cúbicos de hidróxido de sodio 0,05N o su equivalente en hidróxido de sodio 0,02N.

#### Discusión del método

Desde el punto de vista de su ejecución práctica, la única desventaja de este método consiste en que las determinaciones requieren un período de tiempo prolongado, sobre todo cuando se efectúa la saponificación en medio alcalino-alcohólico, por la necesidad de separar el alcohol previo a la destilación del ácido volátil (acético o propiónico).

El análisis se hace notablemente prolongado, cuando la sustancia en cuestión es, N-acetilo (o N-propionilo) por ser muy largo el período de saponificación (tres horas).

Salvo este inconveniente el método es de realización fácil y el aparato de manejo sencillo.

En lo que se refiere a los errores cuantitativos inherentes a esta

técnica, además de los propios de todo análisis que involucra pesada de sustancia, (error de pesada, y titulación volumétrica (error de punto final) hay las causas de error propias de la característica particulares de esta técnica:

a,-Brevemente a la titulación del destilado se lo somete a una ebullición breve para separar el anhídrido carbónico, así como el anhídrido sulfúrico que eventualmente pudo formarse por reducción del ácido sulfúrico; durante esta ebullición se puede perderse algo del ácido acético. Debido a que se efectúa la titulación, y la correspondiente ebullición previa, sobre varias fracciones de destilado, este error se multiplica.

b,-El error propio de toda titulación volumétrica, por uso de por sí, se ve multiplicado por la circunstancia de efectuarse varias titulaciones sobre las distintas fracciones de destilado.

## II, - APLICACION DEL MÉTODO DE KUHN Y HOTH A LA DETERMINACION DEL GRADO

### PROPIONICO

Aplicando el método del Kuhn y Hoth a la determinación del "índice de propionilo" de propionil-amidas y ésteres propionicos, hemos obtenido resultados tan buenos como la determinación del "índice de acetilo"

---

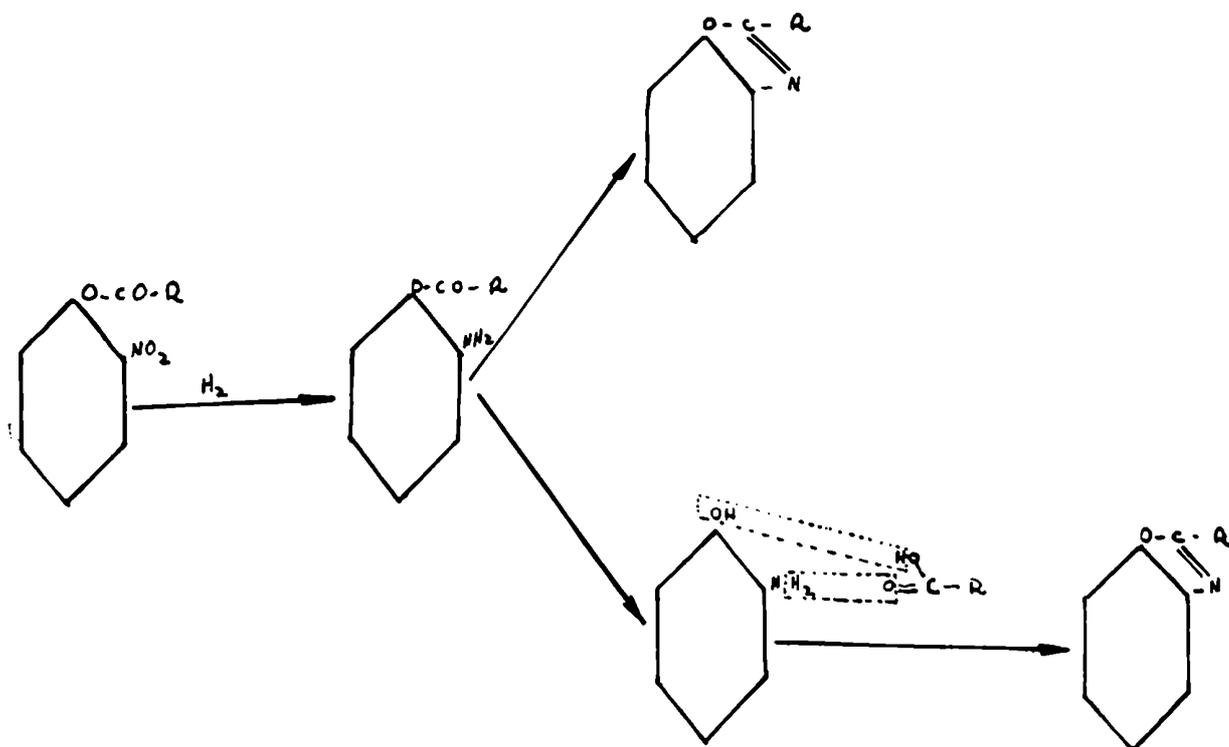
III) MODIFICACION DEL METODO DE KUHN Y ROTH PARA LA DETERMINACION DE LOS INDICES DE ACETILO Y PROPIONILO EN FUNCIONES VOLATILES

En el curso de la aplicación del método de Kuhn y Roth para la determinación del grupo propionilo se analizó el éster propiónico del p-nitrofenol. Debido a que el p-nitrofenol es arrastrable por vapor de agua, los resultados fueron altos, pues el fenol destilado consume buena parte del álcali de neutralización. Trabajando con el éster acético del mismo fenol, se presentó el mismo inconveniente. Para eliminar esta causa de error, se procedió a la reducción del nitrogrupo a grupo amino previamente a la saponificación, con lo que el cuerpo ya no es arrastrable en el medio ácido durante la destilación. Los ensayos efectuados en este sentido han dado muy buenos resultados.

Se procedió en la siguiente forma: una vez descargada la sustancia en el baloncito de reacción se añadió por el mismo tubo lateral una cantidad tal vez en polvo que asegurara un exceso de aproximadamente veinte veces la cantidad teórica de hidrógeno necesaria para la reducción completa del nitrogrupo presente. Después se añaden tres centímetros cúbicos de ácido sulfúrico al 50% y se deja reaccionar durante un tiempo en frío y luego se calienta muy suavemente, lo suficiente como para activar el ataque del zinc pero no tanto como para que se desquite en la parte superior del baloncito así como en el refrigerante en el caso del nitrofenol aún no reducido. Este calentamiento suave se mantiene hasta que desaparece la mayor parte del zinc; entonces se aviva la llama

y se mantiene la ebullición durante media hora ,para asegurar la completa sa,o-  
nificación del éster.Después se procede en la forma ya descripta anteriormen-  
te.

Debe tenerse en cuenta que en el caso de ésteres del o-nitrofenol (   
fueron ensayados el éster acético y el éster propiónico) se obtuvieron valo-  
res muy bajos del índice de acetilo (o propionilo),atribuibles,muy ,robablamen-  
te a reacciones de ciclación del aminogrupo en presencia del grupo ácido en  
posición orto o del ácido libre, reacción esta ya descripta para compuestos de  
este tipo (Richter)



IV))-ALGUNAS APLICACIONES DE LA DETERMINACION DE GRUPOS ACETILOS Y

PROPIONILOS

I)- VENENOS DE SAFOS

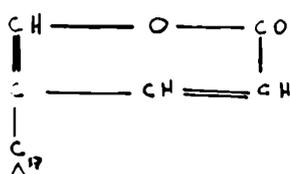
IX)-DERIVADOS DEL DIACIDO

BIFENICO

I, - VENENO DE SAPO

La secreción de las glándulas de la piel de los sapos, comunmente designada con el nombre de veneno, contiene entre otras, sustancias de naturaleza neutra que han recibido el nombre de bufaginas.

Estas sustancias, la base de cuya estructura está constituida por un núcleo perhidropentanofenantreno y una agrupación lactona del tipo



en el carbono 17 de este núcleo, poseen además la función alcohólica sobre distintos carbonos. En algunos casos estas funciones se encuentran esterificadas por grupos acetilos, pues por hidrólisis alcalina se puede caracterizar la formación de ácido acético como sal de plata.

A su vez, el tratamiento de las bufaginas con anhídridos acético en diversas condiciones conduce a la acetilación de las funciones alcohólicas libres. El método de determinación de grupos acetilos es pues útil en este caso, tanto para establecer la cantidad de esos grupos presente en el producto natural o su ausencia total, así como la cantidad de grupos hidroxilos acetilables en las condiciones que se especifican para cada caso.

PARTS EXPERIMENTAL

1) - Investigaciones sobre la bufagina del BUFO ARENARUM

Chen, Jensen y Chen (1933) aislaron del "Bufo arenarum" una sustancia de punto de fusión 220° a la que atribuyeron la fórmula C H O .  
25 34 6

Para establecer su estructura Jensen (1935) la sometió entre otras reacciones a la hidrólisis alcalina, logrando aislar un oxácido, por cuya causa admite la existencia de un grupo lactona en la molécula. Tratando el producto de la hidrólisis con óxido de plata, obtuvo un precipitado blanco que identificó como acetato de plata.

Deulofeu, Duprat y Labriola (1940), aislaron una arenobufagina de punto de fusión 231-33° y de fórmula  $C_{24}H_{32}O_6$ . Determinando acetilos por el método de Kuhn y Roth, los resultados fueron que tanto por saponificación ácida como alcalina el índice de acetilo es menor que el 1%.

Como esto no concuerda con lo afirmado por Jensen se repitió todo el proceso de obtención de la sustancia y Duprat (1941), obtiene finalmente una sustancia que recristalizada de acetona, funde a 249-50° y que analizada por el método de Kuhn y Roth da el valor 0.34% para el índice de acetilo. A su vez Deulofeu (comunicación privada) prepara nuevas partidas de arenobufagina encontrando una fracción que funde bastante neta a 205°. Como este punto de fusión está próximo al señalado por Jensen para la arenobufagina, se pensó que podría contener algún acetilo y se hicieron análisis de acetilo siempre con resultados negativos.

Como se ve, los hechos observados por Jensen no fueron confirmados tanto en lo que se refiere al punto de fusión por él registrado, como en lo relativo a la presencia de grupo acetilo en el producto neutro

#### b) Acetil-arenobufagina

Jensen sometió la fracción que según análisis contenía un acetilo a la ebullición con anhídrido acético. Obtuvo un producto de punto de fusión 162-63°.

En base a los análisis elementales atribuyó a esta sustancia un contenido de dos grupos acetilos, es decir, que la arenobufagina contiene un hidroxilo libre que se acetila fácilmente. Duprat repitió la acetilación en piruina obteniendo un derivado cuyo punto de fusión 246-48° no coincide con el señalado por Jensen.

Efectuando la determinación del grupo acetilo según el método de Kuhn y Roth, se obtuvieron los siguientes valores:

Primera determinación

Sustancia ..... 20,47mg.  
Volumen del Na(OH) de factor 2,15..... 1,73cc.  
Índice de acetilo..... 18,1.

Segunda determinación

Sustancia..... 30,52mg.  
Volumen del Na(OH) de factor 2,15..... 2,66cc.  
Índice de acetilo..... 18,7.  
Calculado para  $\begin{matrix} C & H & O & (CO.CH) \\ 24 & 32 & 6 & 3 \quad 2 \end{matrix}$  ..... 17,20% en  $\begin{matrix} (CH.CO) \\ 3 \end{matrix}$

CONCLUSIONES

1)-La arenobufagina de punto de fusión 248-50° y la de punto de fusión 205° no contienen grupos acetilos.

2)-La acetilación de la arenobufagina de punto de fusión 248-50° da un derivado diacetilado indicando la presencia de dos hidroxilos de fácil esterifi-

cación en el producto neutro.

2)-Investigaciones sobre la bufagina del BUFO MARINUS

a)-Marinobufagina

Fue aislada por primera vez del "Bufo marinus" por Abel y Macht (1911) quienes le asignaron el punto de fusión 217-18° y la fórmula  $C_{18}H_{24}O_4$ , en base a los resultados del análisis centesimal y al valor obtenido para el peso molecular.

En 1930 Jensen y Chen retomaron el estudio de esta sustancias; le asignaron el punto de fusión 212-13° y la fórmula  $C_{28}H_{36}O_6$ .

Esta fórmula fue posteriormente corregida por Jensen y Evans (1934) a  $C_{24}H_{32}O_5$  que ha permanecido sin cambio y que fue posteriormente confirmada por Deulofeu y Mendive (1938) al estudiar la bufagina del "Bufo paracnemis" que resultó ser idéntica a la del "Bufo marinus".

Una discusión alrededor de esta fórmula fue realizada por Scotta y Neisser (1937) quienes sostuvieron que la bufagina responde a la fórmula  $C_{27}H_{38}O_6$  y que contiene un grupo propionilo en la molécula. En esta forma explican la fórmula defendida por Jensen y Evans admitiendo que debido a un tratamiento demasiado enérgico durante el proceso de la preparación de la bufagina ésta pierde el grupo propionilo.

Las determinaciones de grupo acetilo en marinobufagina efectuadas por Deulofeu, Duprat y Labriola (1940), dieron resultados negativos. A la misma conclusión se llegó empleando una muestra con un mínimo de purificación para e-

Evitar en lo posible toda posible eliminación de grupos acetilos durante la misma .

Los resultados del análisis fueron los siguientes

Primera determinación

Muestra que apenas sufrió proceso.....0,99% en grupo acetilo

Segunda determinación

Muestra totalmente purificada.....0,62% en grupo acetilo

Como cada grupo acetilo contenido en la molécula equivale a 8,88% y cada grupo propionilo a una cifra algo mayor, se ve fácilmente que los datos hallados corresponden a un compuesto que no contiene grupos acetilo o propionilo

b)- Acetil-marinobufagina

Acetilando la marinobufagina con anhídrido acético hirviendo varios autores han obtenido productos de punto de fusión distinto: H. Jensen y K. K. Chen (1930) dan el punto de fusión 203-04° ; H. Jensen y E. A. Evans (1934) encuentran también el punto de fusión 203-04° ; Slotta y Neiser (1937) hallan el punto de fusión 125-30°.

Sobre un producto de esta clase, fundiendo a 225-27 se obtuvieron los siguientes valores para el contenido en grupo acetilo:

Primera determinación ..... 11.15%

Segunda determinación..... 16.71%

De acuerdo con estos valores la molécula contiene dos grupos acetilos.

Acetilando la misma sustancia con anhídrido acético en presencia de piridina se obtiene un producto que recristalizado varias veces de alcohol se presenta en forma de romboedros alargados incoloros de punto de fusión 208-10° y que en el análisis de grupo acetilo dió los siguientes valores:

Primera determinación

Sustancia .....	14,759 mg.
Na(OH) de factor 1,023 .....	1,63 cc.
Acetilo encontrado.....	11,29%.

Segunda Determinación

Sustancia .....	17,107 mg.
Na(OH) de factor 1,023.....	1.83 cc.
Acetilo encontrado.....	10,96 %.

Calculado para la monoacetil-marinobufagina de fórmula

$C_{24}H_{31}O_5(CO.CH_3)_3$  se tiene 9,72 % de radical  $-CO.CH_3$ . Es evidente que según las condiciones en que se efectúa la acetilación pueden entrar uno o dos grupos acetilos en la molécula neutra, lo que indica que hay como máximo dos hidroxilos acetilables.

CONCLUSIONES

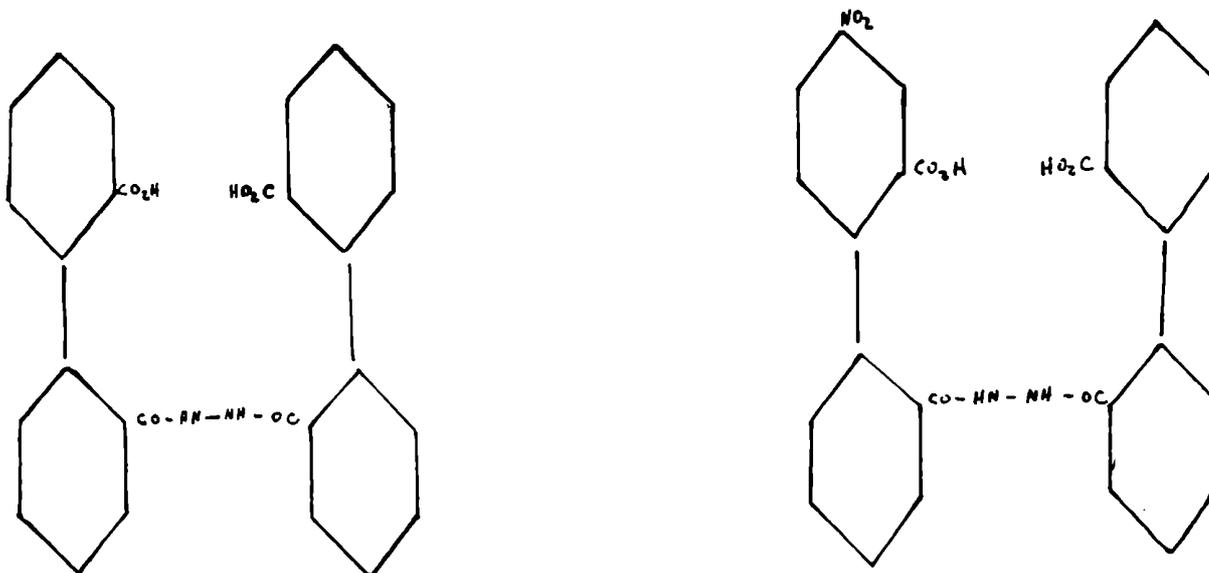
- 1)-La marinobufagina neutra no contiene grupos acetilos.
- 2)-El producto obtenido hirviendo con anhídrido acético la marinobufagina contiene dos acetilos en la molécula.
- 3)-El producto obtenido acetilando con anhídrido acético en presencia de piridina contiene un acetilo en la molécula.

Las dos últimas conclusiones podrían explicar las contradicciones ya mencionadas sobre las propiedades del derivado acetilado en la marinobufagina.

---

## II, -DERIVADOS DEL BIACIDO BIFENICO

El anhídrido acético actúa sobre los ácidos dibásicos hidracínicos



produciendo sustancias cristalinas de punto de fusión elevado.

Es sabido que el anhídrido acético puede actuar en dos formas:

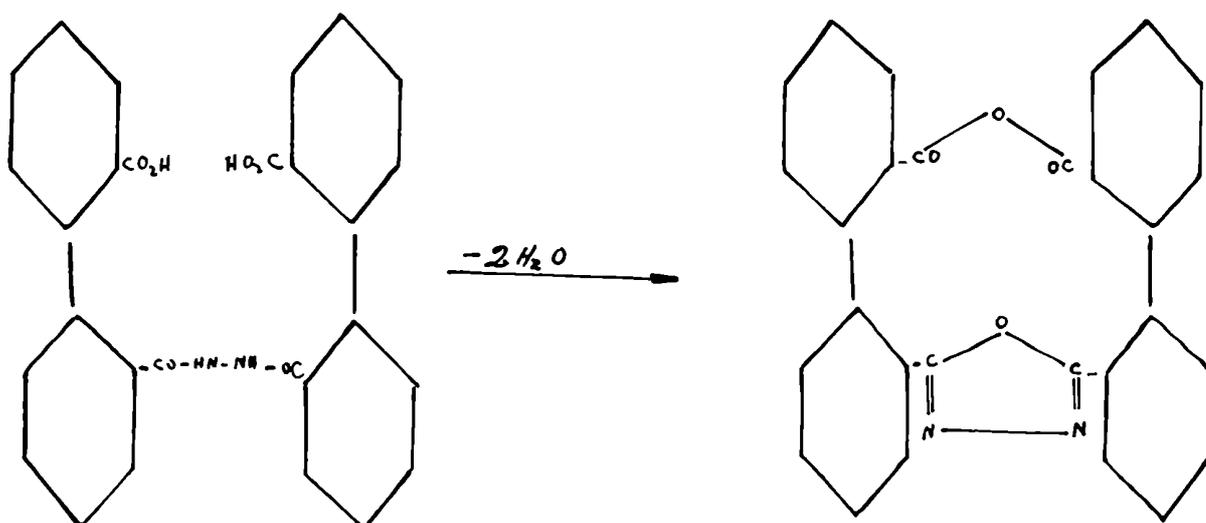
- a) -Como agente de acilación
- b) -Como agente deshidratante.

Aplicados a decidir cual de estas dos acciones desarrolló el anhídrido al actuar sobre estas sustancias, ya el análisis elemental hace desechar la primera posibilidad, porque de haberse producido una acilación debería disminuir el contenido por ciento en carbono (como puede deducirse fácilmente comparando las respectivas fórmulas,; por el contrario, como resulta del análisis, el contenido por ciento en carbono está aumentado.

Pero se tiene una prueba mucho más directa y concluyente sobre la ausencia de grupos acetilos en la molécula mediante la determinación de su in-

dico de acetilo. Si realmente se hubiera producido la acilación el índice de acetilo sería 15,24 si hubieran entrado dos grupos acetilos en la molécula y 8,23 si por el contrario fuera uno solo el grupo acetilo introducido.

Como se deduce de las determinaciones de índice de acetilo efectuadas según el método de Kuhn y Roth el índice es menor que el 15,23 con lo que queda descartada la posibilidad de la presencia de grupos acetilos en la molécula, pudiendo admitirse que hubo una acción hidratante. La deshidratación se interpreta de la siguiente forma:



queriendo limitar la acción del anhídrido acético a la función hidrazida, se operó sobre el éster metílico del diácido. Se obtuvo un producto que evidentemente contenía grupos acetilos en la molécula. Al principio se pensó que se habían introducido dos acetilos, pero la determinación del índice de acetilo sobre una muestra dió los siguientes valores:

Primera determinación

Sustancia ..... 25,64 mg

Volumen de Na (OH) de factor 0.86.....2.38 cc.

Indice de acetilo.....7.81.

Segunda determinación

Sustancia ..... 21.04 mg

Volumen de Na(OH) de factor 0.825..... 1.98 cc.

Indice de acetilo..... 7.78.

Los valores obtenidos están próximos a 7.81 que es el índice de acetilo calculado suponiendo la presencia de un solo grupo acetilo en la molécula.

Los resultados experimentales señalados parecen confirmar la hipótesis de que a los efectos de lograr el ciclo furodiazol es necesario que los dos grupos carboxilos estén libres.

---

PARTB EXPERIMENTAL.

I)-INTRODUCCION DEL RADICAL PROPIONILO EN AMINAS Y FENOLES

II)-INTRODUCCION DEL RADICAL ACETILO EN EL O Y P-NITROF NOL

III)-ACCION DEL ANHIDRIDO ACETICO SOBRE EL ESTER METILICO DE LA N-DIFENOIL,

N-DIFENOIL HIDRACINA

IV)-DETERMINACION CUANTITATIVA DEL GRUPO ACIDO (ACETILO O PROPIONILO)

APLICANDO EL METODO DE KUHN Y ROTH

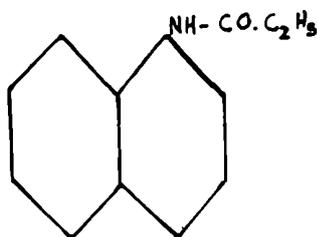
I)-INTRODUCCION DEL RADICAL PROPIONILO EN AMINAS Y FENOLES - DETERMINACION  
CUANTITATIVA DE ESTE RADICAL APLICANDO EL METODO DE KUHN Y ROTH

Para poder decidir si el método de Kuhn y Roth es aplicable al des-  
aje del radical propionilo se ensayaron los propionil derivados de algunas a-  
minas y fenoles que fueron especialmente preparados. Se obtuvieron las si-  
guientes sustancias.

A)-AMIDAS

Se prepararon las amidas a partir de las aminas que se enumeran,  
con la fórmula correspondiente a la amida obtenida al introducir en el amino  
grupo el radical propionilo:

1)- $\alpha$ -naftilamina



Se siguió el método descrito por Robertson (1908), que consiste en ca-  
lentar la  $\alpha$ -naftilamina con ácido propiónico en tubos sellados a la tempe-  
ratura de 160-80° durante 8/12 horas. El producto de la reacción se recrista-  
liza de alcohol-agua. El punto de fusión fué 129-30° que es mayor que el indi-  
cado en la literatura (punto de fusión 116°).

Análisis

Calculado para C H O N.....N: 6.92%  
13 13  
Hallado.....N: 7 %

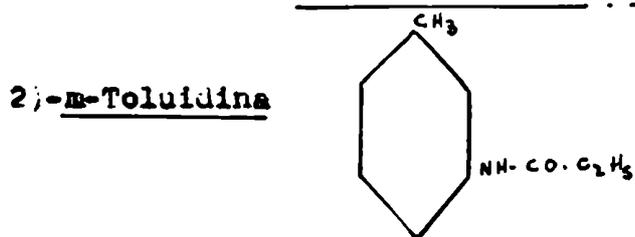
Este mismo cuerpo fué preparado además por el siguiente método:

0.5 gramos de *m*-naftilamina fueron disueltos en tres centímetros cúbicos de benzol ;se agregan tres centímetros cúbicos de anhídrido propiónico y calienta a reflujo durante 6 horas.Se destiló el exceso de disolvente a baja presión.Después se calentó con agua durante una hora a baño-maria para descomponer el exceso de anhídrido propiónico.El punto de fusión fué 129-30°.El nitrógeno hallado : 7,04 %.

Es de hacer notar que por dos caminos se logró la misma especie química,cuyo punto de fusión es 129-130° y no 116° como indica el autor en su memoria.

Indice de propionilo

Sustancia.....	19.38 mg.
Volumen de Na(OH) de factor 1.38.....	4.15cc
Indice hallado.....	29.55
Indice calculado.....	28,64



Se obtuvo el producto con muy buen rendimiento agregando piridina a la solución de la *m*-toluidina en anhídrido propiónico.Ya en frío se produjeron hermosos cristales blancos.Dejadas las aguas madres en reposo durante 24 horas,se obtuvo una nueva masa cristalina.Se recristalizó de alcohol agua.

Punto de fusión: 82°

Punto de fusión según literatura:.....81° (a)

ANÁLISIS

Calculado para C H O N..... N: 8.58 %  
10 13

Hallado..... N: 9.12%

Índice de propionilo

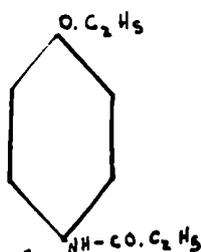
Sustancia..... 10.58 mg.

NaOH, de factor 1.259..... 4.62cc.

Índice de propionilo.....27.07

Índice de propionilo calculado.....24.96

3,-p-Aminofenetol.



A dos centímetros cúbicos de feneticina disueltos en tres centi-

metros cúbicos de benzol, se añadieron seis centímetros cúbicos de anhídri-  
do propiónico (1909). Se dejó en reposo y casi en seguida precipitaron abun-  
dantes cristales blancos. Se recristalizó de alcohol.

Punto de fusión : 122,5°

Análisis

Calculado para C H O N..... N: 7.25 %  
11 15 2

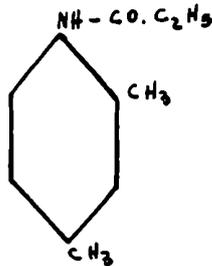
Hallado..... N 7.17 %

Indice de propionilo

Sustancia.....	31,57 mg.
Volumen de Na(OH) us factor 0,954.....	9,55 cc.
Indice de propionilo.....	28,35
Indice de propionilo calculado.....	29,54.

---

4)- De la m-xilitina



Se preparó por dos métodos diferentes or no ser muy satisfactorio el rendimiento del aplicado primero, describe por Robertson (1919):

a,-Se mezcla un gramo de ácido propiónico con algo más que la cantidad teórica de cloruro de tionilo ( $Cl_2O$ ) necesaria para transformarlo en cloruro de propionilo y se calienta a reflujo durante una hora a 170-20° en baño de ácido sulfúrico. Se añade la cantidad teórica de xilitina y calienta la mezcla a temperatura algo mayor durante media hora.

b,-Calien a reflujo de la base disuelta en anhídrido propiónico(b). Se cristalizaron juntos los productos provenientes de ambas reacciones en alcohol-agua.

Punto de fusión: 92°

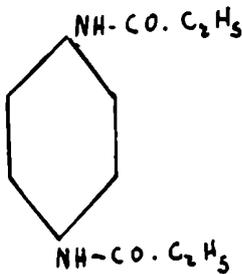
Análisis

Calculado para C H O N.....	N : 7,90%
Hallado.....	N : 8,07%

Indice de propionilo

Sustancia.....	21,96 mg.
Volumen de Na (OH) de factor 0,954.....	7,52 cc.
Indice de propionilo.....	32,65
Indice de propionilo calculado.....	32,25

---



5)-p-Fenilendiamina

2,70 gramos de base se disolvieron en frío en 12 centímetros cúbicos de anhídrido propiónico agregando un centímetro cúbico de piridina (10). La reacción se produjo rápidamente y con buen rendimiento. El recristalizado en alcohol.

Punto de fusión 139-40°.

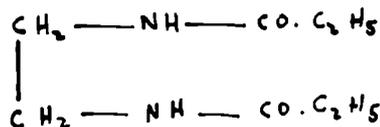
Análisis

Calculado para C H O N .....	N. 12,72%
12 16 2 2	
Hallado.....	N. 12,50%

Indice de propionilo

Sustancia.....	27,60 mg.
Volumen de Na(OH) de factor 0,954 .....	9,71 cc
Indice de propionilo.....	33,46
Indice de propionilo calculado.....	34,75

6) Etilendiamina



El método aplicado es una modificación al descrito por Chattaway (1905). La solución benéfica de la sustancia se enfría con hielo y se añade anhídrido propiónico gota a gota y agitando todo el tiempo. La reacción es muy enérgica. El precipitado cristalino fué desecado previamente entre papel de filtro y después recristalizado en alcohol.

Punto de fusión : 190,5-191°

Punto de fusión registrado en la literatura: 192 (1905)

Análisis

Calculado para C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	N: 16,56%
Hallado.....	N: 16,46%

Índice de propionilo

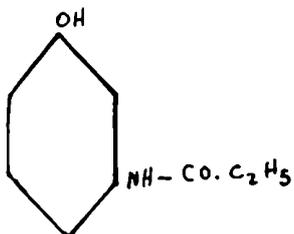
Primera determinación:

Sustancia.....	21,38mg
Volumen de Na(OH) de factor 1,012.....	14,10 cc
Índice de propionilo.....	66,74

Segunda determinación

Sustancia .....	11,69 mg.
Volumen de Na(OH).....	7,70 cc.
Índice de propionilo.....	66,64
Índice de propionilo calculado.....	66,27

7)- **m-aminofenol**



Se obtuvo calentando a reflujo la solución benecónica del **m-aminofenol** y anhídrido propiónico en exceso. Se recristalizó de alcohol agua (1900), se comprueba que el grupo oxidrilo quedó libre por que el product obtenido es insoluble en agua y soluble en hidróxido de sodio.

Punto de fusión : 182°

Análisis

Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ON..... N: 8,48 %

Hallado..... N: 8,34 %

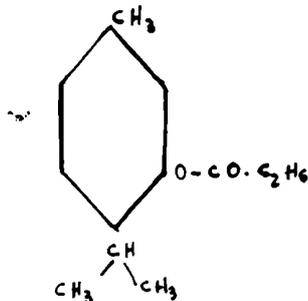
Indice de propionilo

Substancia.....	32,74 mg.
Volumen de Na(OH) de factor 0.98.....	11,58 cc.
Indice de propionilo.....	35,41
Indice de propionilo calculado.....	34,54.

B)- B C T E R I N O

Se prepararon los propionatos de los siguientes fenoles: las fórmulas corresponden a los ésteres derivados, al introducir el radical propionilo

1)- **Tymol**



Fue obtenido calentando a reflujo la solución bencénica de tyrol con exceso de anhídrido propiónico (1906). Se evapora el benceno y descompone el exceso de anhídrido propiónico, calentando a baño -maria con agua. Se separan dos capas. La inferior, se lava en frío dos o tres veces con una solución saturada de bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido propiónico formado y el tyrol que no reaccionó. Se lava varias veces con agua. Seca con sulfato de sodio anhidro y destila a baja presión.

Punto de ebullición : 88-90 °; presión : 2,5 mm.

Analisis

Calculado para C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O		
10 16 2.....	C:75,72	H:8,78
Hallado.....	C:76,35	H 9,08

Indice de propionilo

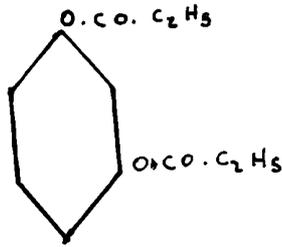
Primera determinación

Sustancia.....	41,59 mg.
Volumen de Na(OH) de factor 0,98.....	11,35 cc.
Indice de propionilo.....	26,74

Segunda determinación

Sustancia .....	25,84 mg
Volumen de Na(OH) de factor 0,98.....	7,31 cc.
Indice de propionilo.....	27,72
Indice de propionilo calculado.....	27,66.

2, -Resorcina



El éster propiónico de la resorcina se preparó siguiendo el método descrito para la obtención del éster del tyrol.

Punto de ebullición: 140° ; presión: 5mm.

Análisis

Calculado para C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> .....	C: 64.86	H: 6.30 %
Hallado.....	C: 64.03	H: 6.50 %

Índice de propionilo

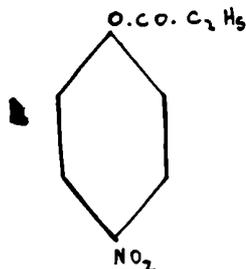
Primera determinación

Sustancia.....	33,79 mg.
Volumen de Na(OH) de factor 1,356.....	12,76 cc.
Índice de propionilo.....	51,2

Segunda determinación

Sustancia .....	34,71 mg.
Volumen de Na(OH) de factor 1,356.....	13,23 cc.
Índice de propionilo.....	51,67
Índice de propionilo calculado.....	51,35

3) - p-Nitrofenol



Este éster se obtuvo por el método ya descrito para los dos ésteres anteriores mencionados. Es un sólido blanco. Se recristalizó de alcohol.

Análisis

Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>N..... N: 7,17 %

Hallado..... N: 7,30

Índice de propionilo

Primera determinación

Sustancia..... 23,08 mg.

Volumen de Na(OH) de factor 0,954..... 6,39 cc.

Índice de propionilo..... 26,48

Segunda determinación

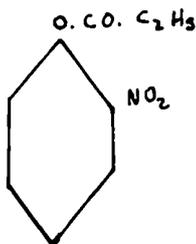
Sustancia..... 23,71 mg.

Volumen de Na(OH) de factor 0,954..... 7,07 cc.

Índice de propionilo..... 30,06

Índice de propionilo calculado..... 29,73

4, -o-Nitrofenol



Se obtuvo siguiendo el método de Robertson (1906), calentando en tubo sellado el o-nitrofenol con anhídrido pro. iónico en exceso y en presencia de piridina para facilitar la reacción. La temperatura se mantuvo a 175-80° durante cuatro horas. El producto de la reacción fué tratado en la forma ya descrita en la obtención de los ésteres anteriormente mencionados. es un líquido de color amarillo.

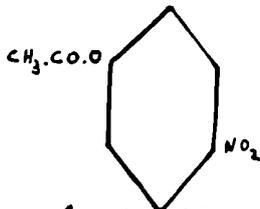
Punto de ebullición: 102-04°; presión: 2,5 mm.

Análisis

Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O..... N: 7,17 %

Hallado..... N: 7,62 %

III. - ESTEROSIS DEL GRUPO ACETILO EN EL ORTO Y PARA-NITROFENOL



1) - Acetato de p-Nitrofenol

Se obtuvo según Kauffman (1909), calentando a reflujo el

p-nitrofenol disuelto en anhídrido acético. El producto de la reacción fué sometido al mismo procedimiento que se aplico en la obtención de los ésteres del ácido propiónico. Es una sustancia cristalina blanca.

Punto de fusión: 80-81°

Punto de fusión registrado en literatura: 80-81°

Análisis

Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O..... N: 7,73 %

Hallado..... N: 8,12 %

Índice de acetilo

Primera determinación

Sustancia..... 3,96 mg.

Volumen NaOH, de factor 2,719..... 18,44 cc.

Índice de acetilo..... 24,23

Segunda determinación

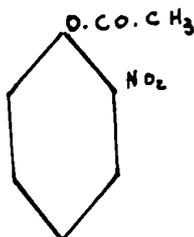
Sustancia..... 20,67 mg.

Volumen de Na(OH) de factor 0,719..... 6.72 cc.

Índice de acetilo .....23,37

Índice de acetilo calculado.....23,75.

2.- Acetato de o-nitrofenol



Se preparó calentando en tubo sellado durante cuatro horas a 160° el o-nitrofenol disuelto en anhídrido acético (1908). Es una sustancia cristalina blanca.

Punto de fusión :40-41°

Punto de fusión registrado en la literatura: 40-41° (188),

Análisis

Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>N..... N: 7,73%

Hallado..... N: 8,19%

Nota: Al determinar cuantitativamente el contenido en grupo acetilo y en grupo propionilo en el acetato y propionato de o-nitrofenol respectivamente (previo reducción del grupo nitro a amino grupo, para evitar el arrastre del nitrofenol, se obtuvieron valores bajos y no concordantes.

IV)-ACCIÓN DEL ANHÍDRIDO ACÉTICO SOBRE EL ÉSTER METÍLICO DE LA N-DIFENIL

N-DIFENIL. HILARICIN:

Los gramos del diéster metílico se hierven a reflujo con un exceso de anhídrido acético. Se evapora el exceso de anhídrido y el residuo se



INDICES DE ACETILO

<u>S U S T A N C I A</u>	<u>F O R M U L A</u>	<u>Calculado</u>	<u>Hallado</u>
Arenobufagina	C H O 24 32 6	-	0,86
Acetato de arenobufagina	C H O (CO.CH 24 30 6 3)2	17,2	18,1 18,7
Marinobufagina	C H O 24 32 5	-	0,99 0,62
Mono-acetil marinobufagina	C H O (CO.CH ) 24 31 5 3	8,88	11,29 10,96
Diacetil marinobufagina	C H O (CO.CH ) 24 30 5 3 2	18,50	21,15 18,71
Producto de acetilar el biácido hidracínico	C H O N 28 16 6 2	-	1%
Producto de acetilar el éster metílico del biácido hidracínico.	C H O N 32 26 7 2	7,81	7,78 7,99
Acetato de oxicorticosterona	C H O 23 20 4	11,56	12,01
Imidazol hidantoina	C		34,64
Colesterol acetilado	C H O (CO.CH ) 27 45 3	10,04	9,91 10,20
3-Acetilamino-4-metoxibenzóico	C H O N 10 11 4	32,82	31,90
Acetato de p-nitrofenol	C H O N 8 7 4	23,75	24,23 23,37

INDICES DE PROPIONILO

ESTER	FORMULA	INDICE	VALOR
N-propionil -naltrexona	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N	8,64	29,50
N-propionil n-xilitina	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N	3,25	3,05
N-propionil tolina	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N	34,96	35,7 34,61
N-propionil feneticina	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N	10,54	18,85
N-propionil, N'-propionil p-fenilendiamina	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N	34,75	33,24 33,46
N-propionil n-aminofenol	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N	34,54	35,41
N-propionil tyrol	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N	27,00	27,72 26,74
N-propionil racoreina	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N	51,35	51,70 51,07
N-propionil p-nitrofenol	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N	1,74	29,6 29,7 30,6

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha extendido el método de determinación de "índice de acetilo" de Kuhn y Roth a la determinación del grupo propionilo.

Se contribuyó a la aclaración del modo de actuar del anhídrido acético sobre los biácidos hidracínicos .

Se confirmó por el análisis del "índice de acetilo" de las bufaginas y acetil-bufaginas del Bufo-arenarum y del Bufo-marinum, que esas sustancias no contienen grupos acetilos en su estado natural. Los derivados que se obtienen haciendo actuar el anhídrido acético sobre las bufaginas neutras, contienen grupos acetilos en la molécula, en número variable según el método de preparación empleado.

Durante la realización de este trabajo se han obtenido las siguientes nuevas especies químicas cuyas propiedades se han descrito:

- 1)-N-propionil m-xilidina
- 2)-N-propionil m-toluidina.
- 3)-N-propionil fenetidina.
- 4)-N-Propionil, N'-propionil p-fenilendiamina.
- 5)-N-Propionil m-aminofenol.
- 6)-O-propionil tymol.
- 7)-O-propionil resorcina.
- 8,-O-propionil p-nitrofenol
- 9,-O-propionil o-nitrofenol

BIBLIOGRAFIA

- I) PARTE GENERAL
- II) VENENOS DE SAPOS
- III) PARTE EXPERIMENTAL

P A M P L E G E N E R A L

- (1933) - Kuhn y Koth: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 66, 1274, 1933
- (1905) - J. J. Audborough, W. Thomas: Journal Chem. Soc. of Lond. 87, II, 1752, 1905
- (1923) - K. Freudenberg, M. Harder: Liebigs Ann. 433, 230, 1923.
- (1882) - Erdman, Schultz: Liebigs Ann. 216, 2341, 1882
- (1898) - Brauchbar, Kohn: Monats. Chem. 19, 42, 1898.
- (1879) - H. Schiff: Ber. Dtsch. Chem. Ges: 12, 1531, 1879
- (1901) - Anwers: Ber. Dtsch. Chem. Ges: 34, 4269, 1901
- (1889) - E. Seelig: Journ. Prakt. Chem: 39, 166, 1889
- A. Fleck y H. A. Harts: Niederl and Niederl: Organic Quantitative Micro-  
analysis; pag. 210
- H. Meyer: An. and Konst. Org. Verb; pag. 422.
- (1884) - Lieberman: Ber. Dtsch. Chem. Ges: 17, 1682, 1884.
-

- (1933)-K.K.Chen,H.Jensen yL.L.Chen: J.Pharmacol.49 ,1
- (1935)-H.Jensen: J. Am Chem Soc.57, 1765
- (1912, Abel y Macht:J. Pharmacol. 3,319
- (1930;H.Jensen y K.K.Chen; J.Biol.Chem.104.307
- (1934; -H.Jensen y K.A.Evans:J.Biol.Chem.104.307
- (1937)-C.H.Slotta y C.Meisser:Mem.Inst. Butantan.11,89.
- (1938,-V.Deulofeu,y J.H.Mendive:Liebig Ann.534,288.
- (1940)-V.Deulofeu. & Duprat y R.A.Labriola:Nature;Nature,145,671
- (1941,-E.Duprat:tesis.

PART II  
EXPERIMENTAL

(1908) - P. H. Robertson: J. of Chem. Soc. of Lond: 93, 1037, 1908

(1909) - A. Kauffman: Ber. Detsch. Chem. Ges: 48, 3482, 1909

(1919) - P. H. Robertson: J. of Chem. Soc. of Lond: 115, 1211, 1919

(1905) - Chattaway: J. of Chem. of Lond: 87, 383, 1905

(1906) - C. A. Bischoff: ber. Detsch. Chem. Ges: 26, 1934 : 39, 3843, 1906

(1883) - W. Bötcher: ber. Detsch. Chem. Ges: 16, 1934, 1883.

a) - Beilstein: XII, 861

b) - Reuben: Die Methoden der Organische Chemie: IV, 382

c) - Beilstein: VI, 233.

---