

Tesis de Posgrado

La reacción del amoníaco con algunos disacáridos acetilados : Derivados de la celobiosa, lactosa y maltosa

Cadenas, Raúl Alberto

1959

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. 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:

Cadenas, Raúl Alberto. (1959). La reacción del amoníaco con algunos disacáridos acetilados : Derivados de la celobiosa, lactosa y maltosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1021_Cadenas.pdf

Cita tipo Chicago:

Cadenas, Raúl Alberto. "La reacción del amoníaco con algunos disacáridos acetilados : Derivados de la celobiosa, lactosa y maltosa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1021_Cadenas.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Resumen de la tesis para optar al título de Doctor en Química presentada por Raúl Alberto Cadenas ante la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.-

1.- Se ha realizado la amonólisis de la α -octaacetilcelobiosa con amoníaco metanólico al 16 % obteniéndose la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina con un rendimiento del 3,7 %. A partir de esta sustancia se obtuvo la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina. Este acetato fué similar al obtenido por Zechmeister y Toth (L. Zechmeister y G. Toth, Ann. 525, 14 (1936)) quienes lo obtuvieron por tratamiento de octa-acetilcelobiosa con amoníaco líquido en tubo cerrado a 50°. Además se aisló la hepta-O-acetil-N-acetil- α -celobiosilamina por cromatografía en columna de Talco: Celite 503. Esta sustancia se considera anómera la aislada por Zechmeister y Toth (loc. cit.) en la reacción antes mencionada. La amonólisis de la β -octaacetilcelobiosa también condujo al aislamiento de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina con un rendimiento del 9,4 %. En esta experiencia no se obtuvo ningún N-acetilcelobiosilamina derivado.

Se hace una discusión acerca de la influencia que el disolvente tiene en esta reacción comparando nuestras experiencias con las de Zechmeister y Toth (loc. cit.) y con las de Fritz Micheel y colaboradores (F. Micheel, R. Frier, E. Plate y A. Hiller, Chem. Ber., 85, 1092 (1952)). En base a estudios cinéticos de Betts y Hammett (R.L. Betts y L.P. Hammett, J. Am. Chem. Soc. 59, 1568 (1937)) se considera que la presencia de metanol favorece la amonólisis

-Rev. de Terris. 1974

total de los acilos y su ausencia favorece la formación de aldosa amidas. La presencia de NH_4^+ favorece la formación de aldosa-amidas y su ausencia favorece la reacción de amonólisis total.

2.- Se llevó a cabo la amonólisis de la β -octaacetil-lactosa, obteniéndose la N,N° -diacetil-lactosilidendiamina con un rendimiento del 4,7 %. A partir de ella se obtuvo la octa-O-acetil- N,N° -diacetil-lactosilidendiamina cristalina. También se aisló por cromatografía en columna de carbón la N -acetil- α -lactosilamina. Esta sustancia se considera anómera de la obtenida por Richard Kuhn y G. Krüger (R. Kuhn y Gerd Krüger. Chem. Ber. 87, 1544 (1954)) por acción de la cetena sobre la lactosil-amina. La acetilación de esta sustancia dió la hepta-O-acetil- N -acetil- α -lactosilamina. Este acetato también se obtuvo por cromatografía en columna, luego de seguir una técnica de acetilación de las aguas madres de la obtención de N,N° -diacetil-lactosilidendiamina.

3.- La reacción del amoníaco metanólico con β -octaacetilmaltosa condujo al aislamiento de la octa-O-acetil- N,N° -diacetil-maltosilidendiamina, en una cantidad que corresponde a un rendimiento de N,N° -diacetilmaltosilidendiamina del 0,80 %.

La reacción de la β -octaacetilmaltosa con amoníaco acuoso permitió obtener la octa-O-acetil- N,N° -diacetil-maltosilidendiamina en una cantidad que corresponde a un rendimiento de N,N° -diacetilmaltosilidendiamina del 22,5 %. Por amonólisis de este producto se obtuvo la N,N° -diacetilmaltosilidendiamina cristalina.

Se pone de manifiesto que la imposibilidad de cristalizar directamente esta sustancia se podría deber al hecho de encontrarse asociada con maltosa.-

Al realizar una amonolisis comparativa en medio metanólico y en medio acuoso se confirman las conclusiones a que arribara al discutir la influencia del disolvente, que se resumen en 1.

4o.- Se describe el empleo de tres reactivos cromatográficos. El reactivo de nitrato de plata -metóxido de sodio es una modificación del reactivo conocido empleando nitrato de plata e hidróxido de sodio en medio acuoso o acetónico. Presentó utilidad en la detección de azúcares reductores y no reductores en frío y puede ser útil en la cromatografía de ésteres de hidratos de carbono sobre papel con fase invertida (excepto para el caso de papel-formamida).

El reactivo de ácido pícrico-metóxido de sodio detecta solamente azúcares reductores y presenta la ventaja de ser empleado en medio alcalino, con lo que se evita la posibilidad de hidrólisis de grupos sensibles a los reactivos ácidos.

El reactivo de ácido pícrico-metaperyodato de sodio es útil en la detección de algunas sustancias nitrogenadas, del grupo de los hidratos de carbono, aminoácidos y compuestos heterocíclicos.

.-

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'R. G. G. G.', written over a horizontal line.

**LA REACCION DEL AMONIACO
CON ALGUNOS DISACARIDOS ACETILADOS**

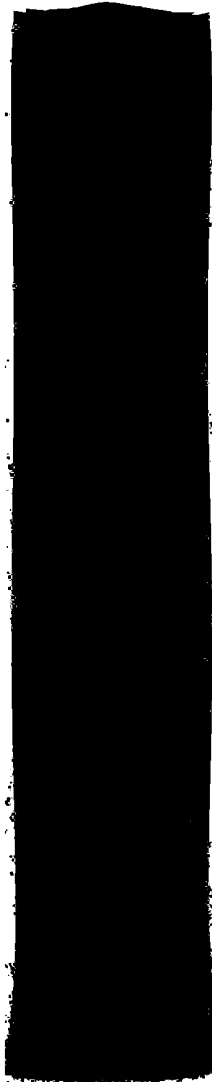
Derivados de la celobiosa, lactosa y maltosa

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
EN QUIMICA DE PAUL ALBERTO CADENAS**

-1959-

TEMS: 102i

▲ THE BANNER



Deseo expresar mi más profundo reconocimiento al Dr. Jorge O. Deferrari por el apoyo intelectual y moral que me ha prestado para la realización de este trabajo, el que en buena parte, es el resultado de su generosidad y amplitud de criterio.

Agradezco al Dr. Andrés O.M. Stoppani la posibilidad que me ha brindado para la realización de este trabajo en un ambiente de sincero interés por la investigación científica.

Agradezco al Dr. Alejandro Paladini el haberme proporcionado algunas de las sustancias empleadas en el estudio de los reactivos cromatográficos.

Finalmente deseo expresar mi agradecimiento a la Señora Blanca B. de Deferrari por los trabajos de microanálisis de nitrógeno que figuren en este estudio.

Introducción

Antecedentes en el campo de los disacáridos . .

Descripción de nuestras experiencias

Discusión

Parte experimental

**La reacción del amoníaco con la
 α -octaacetilcelobiosa**

**La reacción del amoníaco con la
 β -octaacetilcelobiosa**

**La reacción del amoníaco con la
 β -octaacetil-lactosa**

**La reacción del amoníaco con la
 β -octaacetilmaltosa**

Reactivos cromatográficos

Resumen y conclusiones

Bibliografía

LA ACCION DEL AMONIACO SOBRE DERIVADOS ACILADOS DE HIDRATOS
DE CARBONO

INTRODUCCION:

En 1891 Alfred Wohl degradó el penta-O-acetil-D-glucocitrilo empleando amoniaco acuoso conteniendo óxido de plata disuelto, e inició de esta manera las experiencias que condujeron a la obtención de derivados N-acilados en el carbono 1 de hidratos de carbono.

Wohl se proponía eliminar los acetilos y también el grupo nitrilo para obtener la aldosa libre correspondiente, con un carbono menos. Pero en su lugar obtuvo un compuesto nitrogenado que, empleando una nomenclatura moderna, podría denominarse N, N'-diacetil-D-arabinociliden diamina y al que Wohl denominó en 1893, año en que dió a publicidad sus trabajos, "arabinosa diacetamida". (1).

La aplicación de esta reacción a otros monosacáridos acilados demostró que generalmente se producían derivados N-acilados en el carbono 1 a los que se les puede asignar, en mérito a la simplicidad, la denominación general de "aldosa-amidas".

En esta reacción existen varios aspectos fundamentales a considerar. Ellos son:

- I.- La naturaleza de las sustancias de las cuales se parte.
- II.- El medio en el que se lleva a cabo la reacción.
- III.- La estructura de los productos obtenidos.
- IV.- El mecanismo probable de la reacción.

A continuación nos referiremos a cada uno de

estos aspectos, mencionando los hechos principales que a ellos se refieren.

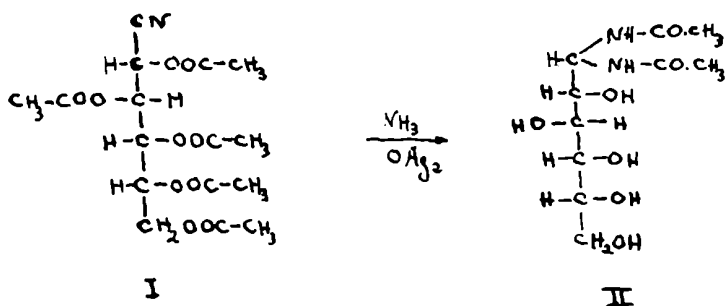
NATURALEZA DE LAS SUSTANCIAS A LAS QUE SE APLICA ESTA REACCION Y MEDIO EN EL QUE ELLA SE EFECTUA.

Las sustancias a las cuales se ha aplicado esta reacción se pueden clasificar en dos grandes grupos, considerando la transformación que sufre el compuesto original.

Un primer grupo de sustancias sufre un verdadero proceso de degradación, pues el hidrato de carbono acilado pierde un carbono y se transforma en una "aldosa-amida" con un carbono menos.

El otro grupo de sustancias no sufre una degradación sino reacciones de amonólisis que, entre otras cosas, conduce a la "aldosa amida".

Al primer grupo pertenecen los nitrilos aldónicos acetilados, benzoylados y propionilados. Este caso se puede ejemplificar mediante la reacción, ya mencionada, del amoníaco con el penta-O-acetil-D-glucosnitrilo.(1).



Esta degradación ha sido aplicada a un gran número de nitrilos de ácidos aldónicos y entre estas experiencias merecen mencionarse las de Moquette (2) y las de Hockett (3) que permitieron comprobar la posibilidad de efectuar

tuar exitosamente la reacción en ausencia de óxido de plata disuelto. Las experiencias que se refieren a los nitrilos acilados aparecen resumidas en el cuadro siguiente:

-La acción del amoníaco sobre nitrilos acilados-

Compuesto original	Aldosa-amida obtenida	Rend.	Bibl.
Tetraacetil-D-arabonitrilo	N,N'-diacetil-D-eritrosilidendiamina		(4)
Tetraacetil-L-arabonitrilo	N,N'-diacetil-L-eritrosilidendiamina	45%	(5)
Tetraacetil-D-xilonitrilo	N,N'-diacetil-D-treosilidendiamina	30%	(2)
Tetraacetil-D-xilonitrilo	N,N'-diacetil-D-treosilidendiamina	78%	(3)
Tetraacetil-L-xilonitrilo	N,N'-diacetil-L-treosilidendiamina	30%	(6)
Tetraacetil-L-xilonitrilo	N,N'-diacetil-L-treosilidendiamina	70%	(7)
Tetraacetil-D-fuconitrilo	5-desoxi-N,N'-diacetil-D-lixosiliden diamina	40%	(8)
Tetraacetil-L-ramnonitrilo	5-desoxi-N,N'-diacetil-L-arabinosiliden diamina	35%	(9)
Tetrabenzoil-L-ramnonitrilo	5-desoxi-N,N'-dibenzoil-L-arabinosiliden diamina	13%	(10)
Tetrabenzoil-L-arabonitrilo	N,N'-dibenzoil-L-eritrosilidendiamina	19%	(11)
Tetrabenzoil-D-xilonitrilo	N,N'-dibenzoil-D-treosilidendiamina	18,3%	(11)
pentaacetil-D-gluconitrilo	N,N'-diacetil-D-arabinosilidendiamina	47%	(1)
pentabenzoil-D-gluconitrilo	5-O-benzoil-N,N'-dibenzoil-D-arabinosili- dendiamina	25%	(10)
pentapropionil-D-gluconitrilo	N,N'-dipropionil-D-arabinosilidendiamina	33%	(12)
pentaacetil-D-manonitrilo	N,N'-diacetil-D-arabinosilidendiamina	32%	(4)
pentabenzoil-D-manonitrilo	5-O-benzoil-N,N'-dibenzoil-D-arabino- silidendiamina	14%	(10)
pentaacetil-D-galactonitrilo	N,N'-diacetil-D-lixosiliden-diamina	40%	(6)
pentaacetil-D-galactonitrilo	N,N'-diacetil-D-lixosiliden-diamina	72%	(7)
pentabenzoil-D-galactonitrilo	5-O-benzoil-N,N'-dibenzoil-D-lixo- silidendiamina	22%	(10)
Hexaacetil-D-glucó-D-gulo-heptono nitrilo	N-acetil-D-glucofuranosilamina	26%	(13)
Hexaacetil-D-mano-D-gala-heptono nitrilo	N,N'-diacetil-D-manosilidendiamina	34%	(14)
Hexabenzoil-D-mano-Dgala-heptono nitrilo	N,N'-dibenzoil-D-manosilidendiamina	33%	(14)
pentaacetil-7-desoxi-L-glicero-L- gala-heptonitrilo	N,N'-diacetil-L-ramnosilidendiamina	40,5%	(15)

En el cuadro que precede podrán observarse ciertos hechos interesantes: son los que se refieren a la disparidad de rendimientos obtenidos para una misma sustancia, como son los casos de la N,N'-diacetil-D-lixosilidendiamina, con rendimientos del 40% y 72 %; N,N'-diacetil-D-treosilidendiamina con 30% y 78% y la N,N'-diacetil-L-treosilidendiamina con 30% y 70%.

En estos casos, los rendimientos más bajos corresponden a degradaciones en medio de amoníaco alcohólico, mientras que los más altos se obtuvieron empleando amoníaco acuoso.

Otro hecho digno de destacarse es que, de acuerdo con el cuadro anterior, en algunos casos se han obtenido "aldehído-amidas" parcialmente aciladas, tal como ocurre con la 5-O-benzoil-N,N'-dibenzoil-D-arabinosilidendiamina y con la 5-O-benzoil-N,N'-dibenzoil-D-lixosilidendiamina.

La presencia de un resto benzilo no amonilizado se puede atribuir a que en estos casos la reacción se efectuó en un medio de etanol saturado de amoníaco y durante un período de 5 horas.

En este disolvente la concentración de amoníaco necesaria para saturarlo es de 10,5% mientras que para el metanol es de 16,6%. No obstante, ni el tiempo de reacción ni la concentración diferente de amoníaco parecen tener una importancia tan grande como la tiene el solvente empleado; así lo demuestran las experiencias sistemáticas realizadas por Recundo (16) quien llevó a cabo las degradaciones en cuestión en medio de amoníaco metanólico y manteniendo la concentración de amoníaco y tiempo de reacción similares a los de las experiencias en medio etanólico. Pudo así obtener derivados totalmen-

te libres de O-benzoylos.

Los estudios acerca de la influencia del disolvente fueron continuados por Ondetti en 1957 (11), quien estudió la acción del isopropanol con 5-6% de amoníaco, sobre el tetrabenzoyl-L-arabonitrilo y sobre las 2, 3, 5, 6 - tetra-O-benzoyl-N,N'-dibenzoyl-D-arabinosilidendiamina y 2, 3, 4, 5 - tetra-O-benzoyl-N,N'-dibenzoyl-lixosiliden-diamina.

Simultáneamente se efectuaron degradaciones comparativas en medio metanólico con 5-6% de amoníaco.

En el caso de la N,N'-dibenzoyl-D-arabinosilidendiamina tetrabenzoylada, se obtuvo en medio isopropanólico, un residuo no cristizable. Este resultado se atribuyó a la formación de mezclas de productos parcialmente amonizados. Con metanol 5 - 6 % de amoníaco se obtuvo un 60 % de N, N'-di-benzoyl-D-arabinosilidendiamina.

El tetrabenzoylo de la N,N'-dibenzoyl-D-lixosilidendiamina, en medio isopropanólico, prácticamente no se amoniza dentro de las 18 horas de efectuada la mezcla. Empleando metanol 5-6 % de amoníaco, se obtiene en el mismo lapso, la N,N'-dibenzoyl-D-lixosilidendiamina.

Como podría deducirse de estas experiencias, en medio isopropanólico no sería factible la obtención de las "libres-amidas" usuales, otras experiencias (10) realizadas con los nitrilos benzoylados de la D-glucosa, D-mannosa y D-galactosa, demostraron que en este disolvente se formaban productos mono-O-benzoylados. Sin embargo esto no tiene carácter general, pues en el caso del tetrabenzoyl-L-arabonitrilo, fue factible aislar la N,N'-dibenzoyl-L-eritrosilidendiamina, efectuando la degradación en medio de isopropanol 5-6% de amoníaco.

niaeo. (11).-

Dado lo bajo de los rendimientos y la complejidad de las reacciones secundarias, se consideró necesario una mayor acumulación de datos experimentales para poder sacar conclusiones.

-.-

Al segundo grupo de sustancias, es decir, al que sufre exclusivamente reacciones de anacolisis, pertenecen los derivados acilados de las formas aldehídicas, furanósicas y piranósicas de las monosas. Como productos de esta reacción se obtienen, generalmente con elevados rendimientos, "aldosa-amidas".

Los trabajos en este campo se iniciaron en 1931 año en que Brigl, Mulschlegel y Schmale (14) trataron la pentabenzoil-aldehído-D-glucosa, la 3, 4, 5, 6, - tetrabenzoil-aldehído-D-glucosa y la 3, 5, 6 - tribenzoil-D-glucofurana con amoníaco metanólico y obtuvieron en los tres casos la N,N'-dibenzoil-glucosilidendiamina.

En 1952, Deulofeu y Deferrari demostraron que las formas piranósicas y furanósicas totalmente aciladas de diversos azúcares también producen "aldosa-amidas".

Estudiaron así las α y β pentabenzoil-D-Glucopiranososa (17), la pentabenzoil- α -D-glucofuranososa (20); la pentaacetil- β -D-manopiranososa; la α y β - pentabenzoil-D-manopiranososa (18); y también las formas piranósicas y furanósicas pentaacetiladas de los azúcares de la D-galactosa, así como la pentabenzoil- β -D-

galactopiranososa (19).

En el caso de las manosas benzoiladas, se aisló la N,N'-dibenzoil-D-manosilidendiamina (con un rendimiento del 20%) y la N-benzoil-D-manopiranosilamina (8%). Este último compuesto también había sido obtenido por Brigi, Mischel y Schinle (14) en 1931, a partir del hexabenzoil-D-mano-D-gala-heptamonitrilo. Estos investigadores pensaron que la monobenzamida provenía de la acción hidrolítica del $\text{H}_2\text{O}_2\text{H}$ que se formaba al agregar HCl para eliminar el ión plata. El trabajo con la pentabenzoilmanosa demostró que la N-benzoil-manopiranosilamina era un producto primario de la reacción.

Otro caso en el que fue factible aislar una aldosa-monobenzamida, de estructura piranósica fue el de la reacción de la tetrabenzoil- α -L-ranopiranososa (15) con el amoníaco metanólico; se logró aislar la N,N'-dibenzoil-L-ranosilidendiamina (19%) y en menor proporción la N-benzoil-L-ranopiranosilamina (1,84%).

Resulta interesante destacar el hecho de que tanto la D-manosa como la L-ranosa, presentan la misma relación estérica en los carbonos asimétricos.

El único caso de aldosa-manooacetamida que se conoce hasta ahora en el campo de los monosacúridos, es el de la N-acetil-D-glucofuranosilamina, a la que se asignó una estructura furanósica en base a estudios que describiré más adelante.

Otros trabajos, realizados desde 1931 hasta el presente, extendieron esta reacción a diversas formas aciladas de la L-eritrosa (21), D-ribosa (22) y (11); L-rabinosa (23) y (22); D-xilosa (11) y (22); D-lixosa (24) así como a glucosos parcialmente benzoiladas (11).

En todos estos casos se obtuvo siempre la "aldosa-amida" con rendimientos variables, excepto en el caso de la tetra-acetil-D-xilosa (13), la que condujo por amonólisis a la obtención de un jarabe amorfo, del que no se obtuvieron productos cristalinos.

.-

Existen pocas experiencias que pongan de manifiesto la influencia que en la formación de las "aldosa-amidas" tiene la presencia de otros grupos sustituyentes diferentes, en la molécula del azúcar. Brigl, Mulschlegel y Schinle (14) demostraron que la presencia de un resto tíoetilo en el carbono 2 del azúcar inhibe la formación de la diamida, habiendo obtenido una N-benzoil-(2-tíoetil-D-glucopiranosil) amina por amonólisis de la 2-tíoetil-3,4,5,6-tetrabenzoil-dihido-D-glucosa, mientras que la 3,4,5,6-tetra-O-benzoil-aldehído-D-glucosa dió la N,N'-dibenzoil-D-glucosilidendiamina con rendimiento elevado.

Otra experiencia en ese sentido fué la realizada por Allerton y Overend, quienes amonolizaron la 2,3-dimetil-4,5,6-tri-O-acetil-dihido-D-glucosa obteniendo únicamente la 2,3-di-O-metil-D-glucosa.(25).

Estos autores afirman que la migración de átomos al carbono 1 solo se produce a partir de los carbonos 2 y 3.

De estas experiencias no resulta indubitable que la formación de amidas se deba a los acilos unidos a los carbonos 2 y 3, pues los grupos sustituyentes tíoetilo o me-

tilos pueden impedir de otra manera esa formación ya sea por razones de impedimento estérico o por ser esos carbonos etapas intermedias en la migración de otros acilos hacia el carbono 1.

De los estudios realizados con los derivados parcial y totalmente acilados de los monosac, surgen algunas consideraciones estructurales que ya han sido puntualizadas por Ondetti (11).

Entre estas consideraciones, se destacan las mayores rendimientos obtenidos con los derivados que no tienen esterificado el hidroxilo en el carbono 1. Los rendimientos en aldosa-amidas son también comparativamente elevados en el caso de las estructuras aciladas aldehydicas y furanósicas, en relación con los obtenidos con las formas piranósicas.

Esas experiencias han permitido establecer, además, que los grupos acetilo se amonolizan más fácilmente que los benzoylos así como que, en el curso de la reacción, la configuración anómérica del azúcar no tiene prácticamente ninguna influencia, en el caso de los monosacáridos.

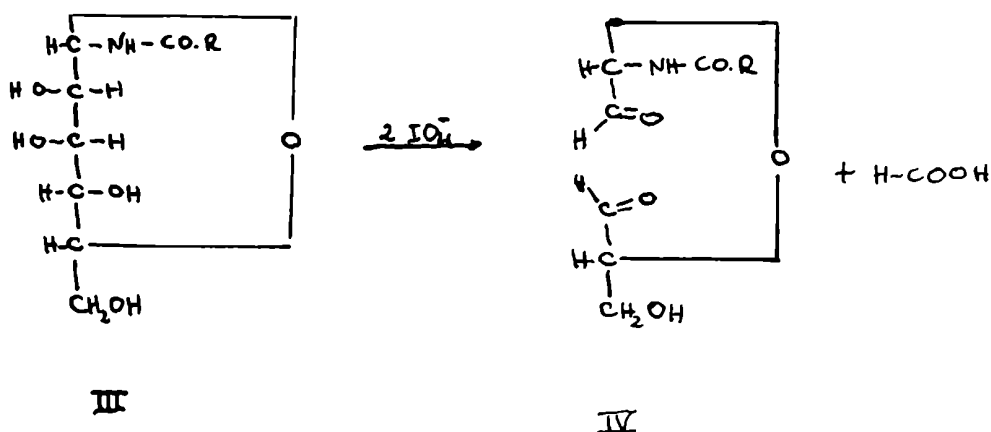
-.-

LA ESTRUCTURA DE LAS "ALDOSA-AMIDAS"

La determinación de la estructura de las "aldosa-amidas" de monosacáridos no presenta grandes dificultades pues la preparación de derivados acilados cristalinos puede indicar claramente la existencia de estructuras cíclicas o acíclicas, por el número de grupos acetilos introducidos.

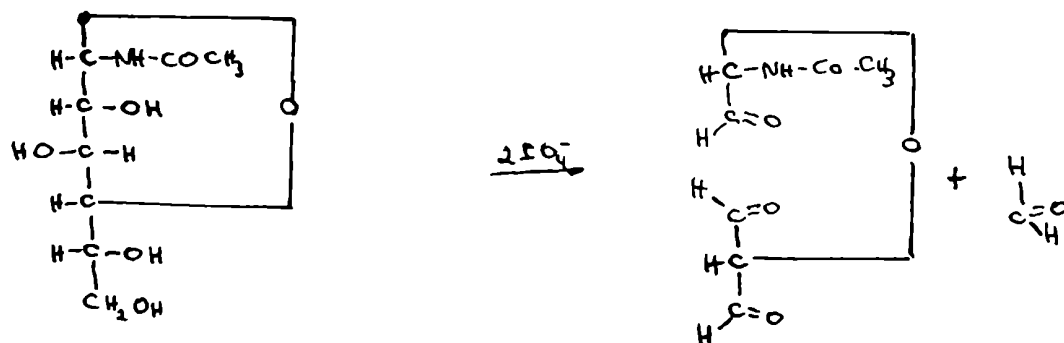
A esto pueden agregarse las oxidaciones con tetraacetato de plomo (27), o con ácido peryódico (28) y (29).

La oxidación de una "aldosa-amida" con estructura piramónica se puede formular así:



La ecuación anterior simboliza el método usado para determinar la estructura de la N-benzoyl-D-manopiranosilamina, experiencia en la que se emplearon dos moles de metaperyodato de sodio y se detectó la presencia de ácido fórmico. Un esquema parecido se podría aplicar a la determinación de la estructura piramónica de la N-benzoyl-L-ranopiranosilamina (15).

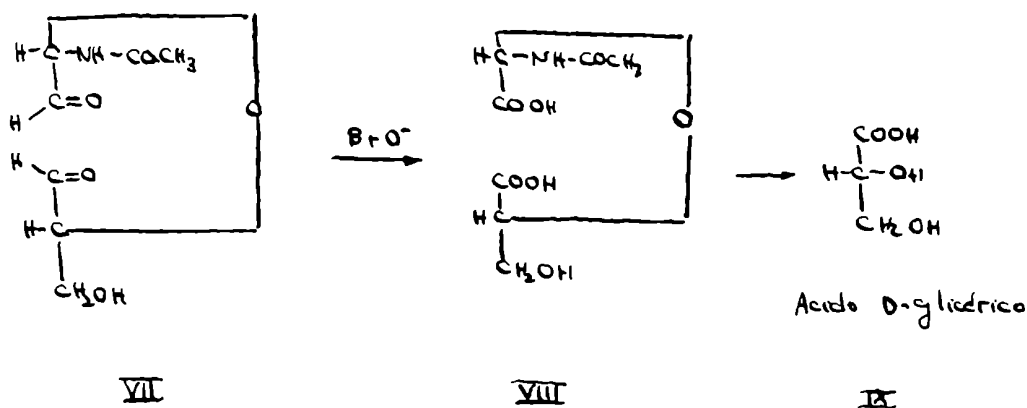
Pero si el compuesto tiene estructura furanósica, teóricamente cabría esperar que la reacción transcurriera así:



Puede observarse que en esta primera etapa el carácter distintivo entre ambos tipos de oxidaciones estriba, principalmente, en la posibilidad de aislar formaldehído en el caso de tratarse de estructuras furanósicas.

Sin embargo esta reacción no transcurre de una manera tan sencilla como la formulada anteriormente, pues se producen reacciones de "post-oxidación" que se describirán más adelante.

Estos estudios analíticos pueden encararse también en forma preparativa. El proceso oxidativo, en el caso de las formas piranósicas, puede continuarse con agua de bromo e con hipobromito de estroncio, para dar un ácido dibásico aislable como sal de bario o de estroncio. La hidrólisis de éste ácido conduce a un ácido identificable: el D-glicérico. Un ejemplo de esto lo presenta el estudio realizado por Nieman y Hays (23) con la N-acetil-D-glucopiranosilamina.

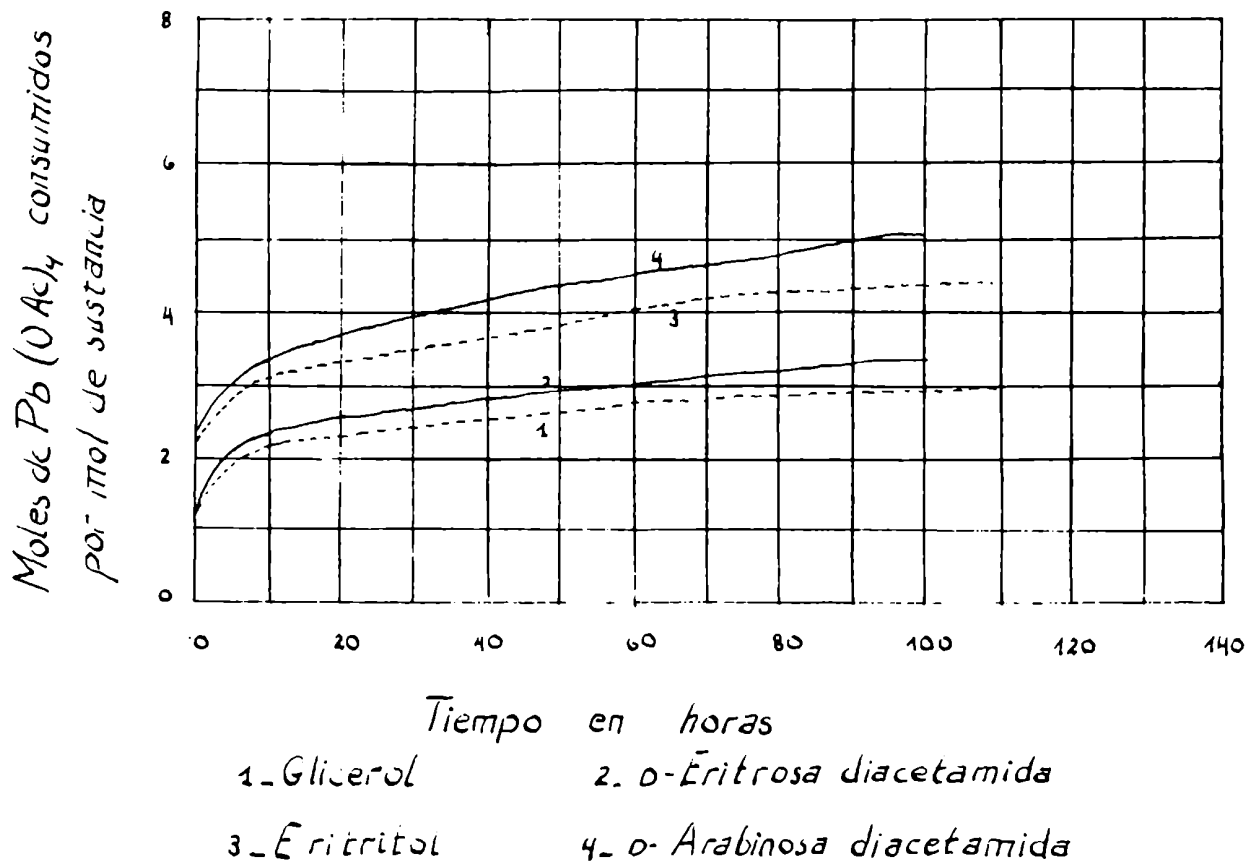


pírias entre la posición de la curva de oxidación en el gráfico y el número de grupos alcohólicos libres.

Las curvas correspondientes a una serie de "aldosa-amidas", fueron comparadas con las de los polialcoholes de igual número de grupos alcohólicos libres, observándose gran similitud. Además se evidenció que el curso de la oxidación no era afectado por la configuración de la cadena.

Algunos resultados obtenidos por esos autores se pueden apreciar sucintamente en el gráfico siguiente:

GRAFICO N° 1



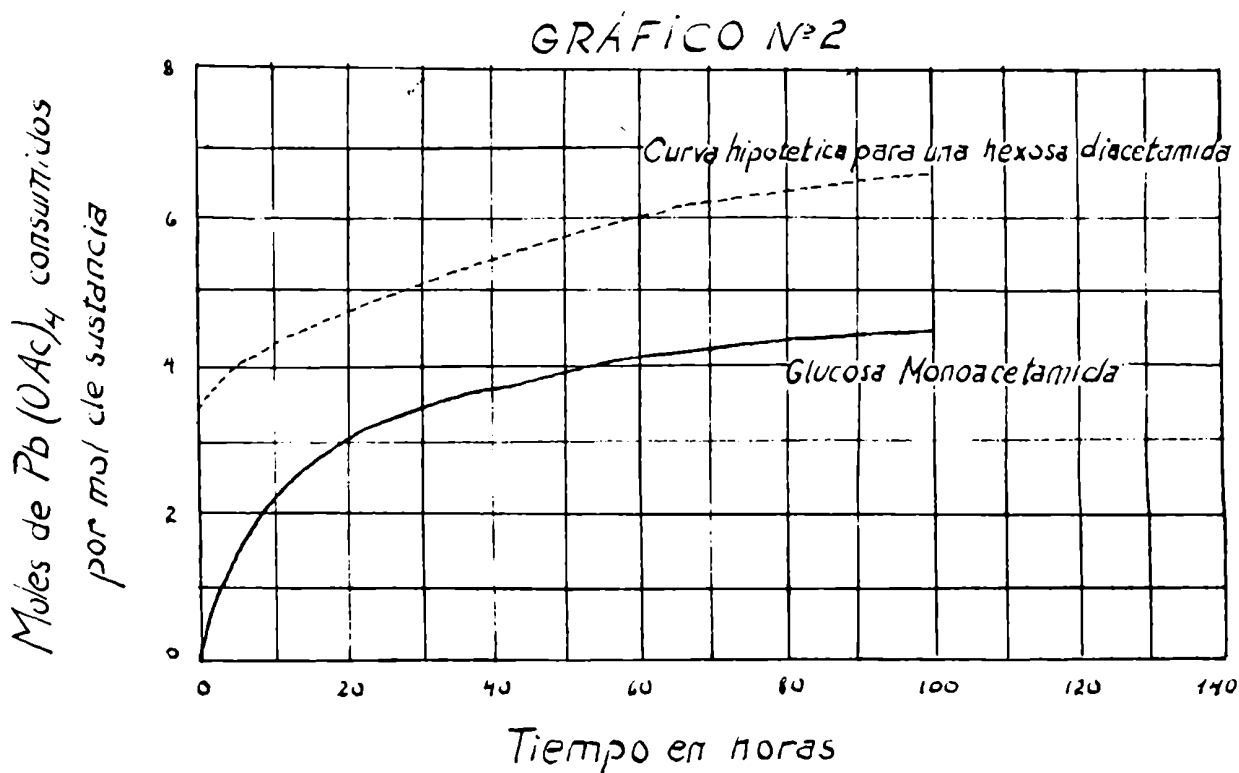
Como puede apreciarse, los datos de oxidación dan un esquema valioso para resolver problemas estructurales.

Uno de estos problemas, que merece estudiarse en detalle, es el que se refiere a la N-acetil-D-glucosilamina.

Hockett y Chandler (13) degradaron la pentaacetil-aldehído-D-glucosa y el hexaacetato del nitrilo- α -D-glucoséptico con amoníaco acuoso al 29 % y en ambos casos obtuvieron el mismo producto cristalino.

El análisis demostró que no se trataba de una "aldosa-diamida", sino más bien de una N-acetil-D-glucosilamina. Como sus constantes físicas no coincidían con la N-acetil-D-glucopiranosilamina preparada pocos años antes por acción de la cetona sobre la D-glucopiranosilamina (28), se trató de determinar su estructura mediante la oxidación con tetraacetato de plomo. De esta oxidación fué posible aislar formaldehído como su 2,4-dinitrofenilhidrazona, de lo que se dedujo la estructura furanósica de la sustancia en estudio.

Un gráfico comparativo entre el curso de esta oxidación y el que presuntamente tendría una hexosa digetamida sería el siguiente:



Como puede observarse, el consumo de oxidante fué anormalmente alto (4,4 moles) pues el teórico es de dos moles.

Estas experiencias y la obtención de un tetraacetato cristalino permitieron postular una estructura furanósica para la N-acetil-D-glucosilamina obtenida por ellos.

Este mismo isómero furanósico fué obtenido por Nieman y Nays (30), por acción del amoníaco metanólico sobre la pentaacetil- β -D-glucosa. Por oxidación con tetraacetato de plomo consumió 3,38 moles por mol de azúcar. Por oxidación con peryodato se gastaron 5 moles de oxidante.

En las oxidaciones con peryodato y con tetra-acetato de plomo suele presentarse el fenómeno de la "post-oxidación" o sobreoxidación, que es el que provoca el consumo de mayores cantidades de oxidante que las indicadas por los valores teóricos.

Hockett, Dienes, Fletcher y Ramsden (27) indican como una de las principales causas de este fenómeno, la oxidación del ácido fórmico producido, oxidación que estos autores estudiaron en condiciones comparables, observando, por ejemplo, que a las 120 horas, el ácido fórmico consume casi un mol de tetra-acetato de plomo.

Deferrari y Deulofeu (15) estudiaron nuevamente la oxidación de la N-acetil-D-glucosaminilamina con peryodato de sodio. En esta experiencia se observó que se consumía un mol de peryodato muy rápidamente, con producción de un mol de formaldehído, no detectándose la formación de ácido fórmico en la etapa inicial de la oxidación. Este comportamiento corresponde a una ruptura oxidativa entre los carbonos 5 y 6, lo que está de acuerdo con la estructura (V).

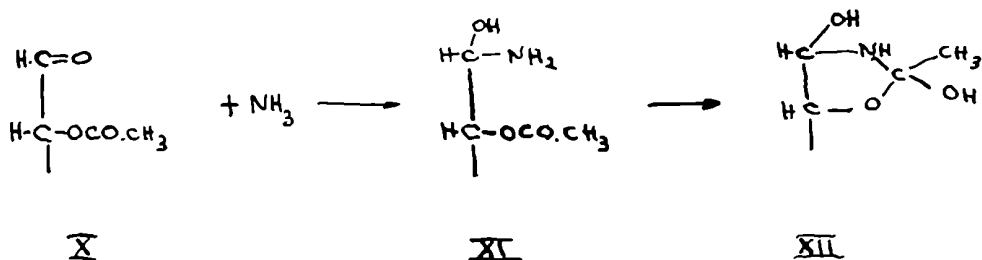
La reacción se verificó después lentamente, empezándose a observar la formación de ácido fórmico al cabo de una hora. Pasadas 28 hs. de iniciada la reacción se produjeron casi tres moles de ácido fórmico y el consumo de peryodato de sodio se elevó, a 5,23 moles. Este fenómeno de "post-oxidación" fue atribuido por Fleury (31), a la formación de aldehído tartrónico, el que después se oxida.-

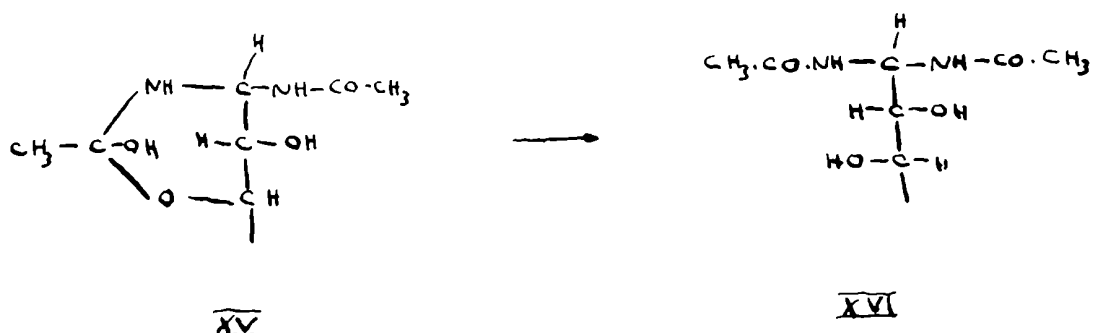
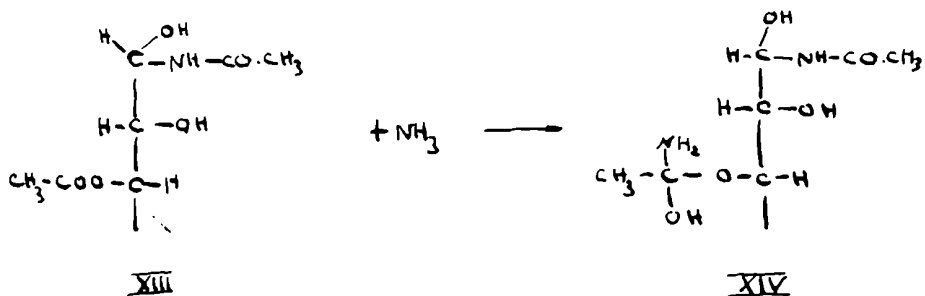
EL MECANISMO DE FORMACION DE LAS "ALDOSA-AMIDAS"

Wohl postuló un mecanismo de formación de "aldosa-amidas" según el cual se produciría la condensación directa de las moléculas de la aldosa libre, en su forma aldehídica, con la acilamida previamente producida por amonólisis del hidrato de carbono acilado.

Sin embargo, este tipo de condensaciones, en medio alcalino, no han podido efectuarse y todos los intentos realizados en el sentido de condensar amidas con monosacáridos han fracasado. Es así que Brigl y colaboradores (14) por tratamiento del D-mano-D-gala-heptonitrilo libre con amoniaco y en presencia de nitrato de plata y de benzamida, no aislaron una "aldosa-amida" sino D-manosa. También Hockett y Chandler (13) trataron de condensar la pentaacetil-aldehído-D-glucosa con acetamida sin poder lograrlo.

En 1949 Isbell y Frush (23), al estudiar la obtención de la N,N'-diacetil-L-arabinosilidina diamina, postularon un mecanismo según el cual sería necesaria la presencia de un grupo aldehídico libre (X), formado ya sea por la degradación del nitrilo o por la amonólisis del acilo en el carbono 1. Con ese grupo aldehídico libre se condensaría el NH₂(XI).





A continuación se produciría la migración de un grupo acetilo vecino, hacia el nitrógeno migración favorecida por la polarización del grupo carbonilo del acetilo, la que permitiría la donación del par electrónico libre del nitrógeno, al carbono de dicho grupo carbonilo.

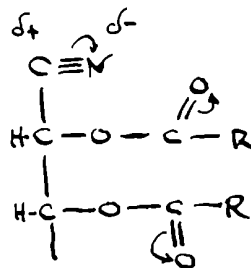
Se formaría de esta manera un ortoéster cíclico (XII) lábil, que se reordenaría dando un N-acetil derivado (XIII). En algunos casos la reacción se detiene en este punto, lo que está determinado por la posibilidad que tenga el compuesto de formar un ciclo hemiacetalico estable. Pero también puede producirse un N,N'-diacetil derivado en el carbono 1, hecho que se podría explicar según el mecanismo hipotético siguiente: el N-acetil derivado reaccionaría con otra molécula de amoníaco, la que se condensa

ría con el grupo carbonilo del O-acetilo ubicado en el carbono 3 (XIV). Se produciría así un amino grupo que reemplazaría el hidroxilo situado en el carbono 1, con inversión de la configuración del mismo, para dar un ortoéster lábil (XV) que por reordenación, daría el N, N'-diacetil derivado en el carbono 1 de la aldosa. (XVI)

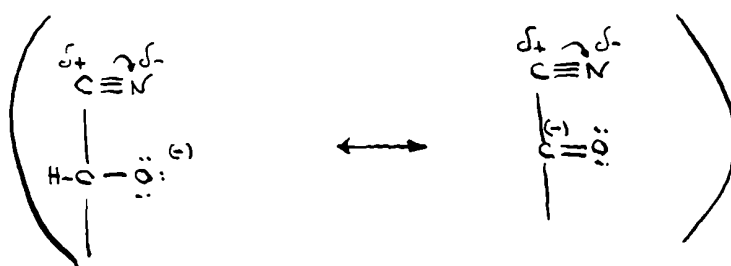
Este mecanismo se puede aplicar a las aldósas acetiladas. Pero en el caso de los nitrilos acetilados habría que suponer una etapa previa en la que se separaría el resto nitrilo como anión CN^- , quedando así la forma aldehídica del azúcar, la que posteriormente reaccionaría según el mecanismo propuesto por Isbell y Frush.

La mayor velocidad de amonolisis del acilo unido al C_2 del nitrilo con respecto a la de los demás acilos, podría explicarse en el caso de los nitrilos (II) por un efecto inductivo debido al grupo nitrilo, que disminuiría la densidad electrónica en el carbono 2.

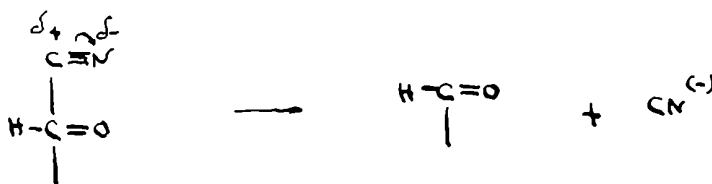
Ello provoca también una disminución en la densidad electrónica en el carbono del grupo carbonilo del acilo unido al carbono 2 del azúcar, por lo que su amonolisis se ve facilitada. (XVII). Posteriormente, según lo muestran las fórmulas (XVIII y XIX) se produciría la eliminación del nitrilo y la formación de la aldosa libre.



XVII



XVIII



XIX

De lo expuesto hasta ahora, surge que podrían postularse dos tipos de mecanismos para esta reacción: uno intermolecular (Wohl) y otro intramolecular (Isabell y Frush).

El problema que consistía en aclarar cual de las dos hipótesis era la verdadera, fué abordado por Hockett, Deulofeu y Deferrari (32) quienes efectuaron la reacción empleando una solución metanólica de amoníaco marcado con N^{15} y en presencia de acetamida con nitrógeno normal.

Degradaron en esas condiciones el tetraacetil-L-arabonitrilo y obtuvieron N,N'-diacetil-L-eritrosiliden diamina. El porcentaje de N^{15} que este compuesto contenía era muy próximo al porcentaje de N^{15} del amoníaco empleado, lo que indicaba que la mayor parte de la reacción se verificaba por medio de un mecanismo intramolecular.

En cambio, si el mecanismo hubiera sido intermolecular, es decir, si la reacción se produjera por choque entre las moléculas de aldosa y las de acetamida del medio, la N,N'-diacetil-L-eritrosiliden diamina obtenida hubiera contenido una cantidad mucho menor de N^{15} ya que las moléculas

de acetamida conteniendo N^{15} y producidas durante la amonólisis de los acetilos se diluirían con las moléculas de acetamida conteniendo nitrógeno normal, presentes en el medio y que en esa experiencia se encontraban en exceso con respecto a las de acetamida marcada que se producían.

Experiencias simultáneas de Deulefeu y Deferrari (33) confirmaron la intramolecularidad de la reacción. Estos autores investigaron la degradación del tetraacetil-L-arabonitrilo en presencia de propionamida y en otro caso, de benzamida, obteniendo únicamente la N,N' -diacetil-L-eritrosilidendiamina.

La degradación del hexaacetato del nitrilo-D- α -glucoheptónico, en presencia de propionamida y de benzamida, condujo, en ambas experiencias a la obtención de la N -acetil-D-gluco-furancilamina. Asimismo llevaron a cabo la reacción con la tetraacetil-~~glucido~~-L-arabinosa, en un caso en presencia de acetamida y en otro en presencia de propionamida, obteniendo en ambos casos la N,N' -diacetil-L-arabinosilidendiamina con un rendimiento prácticamente igual al obtenido en las experiencias realizadas en ausencia de las mencionadas amidas.

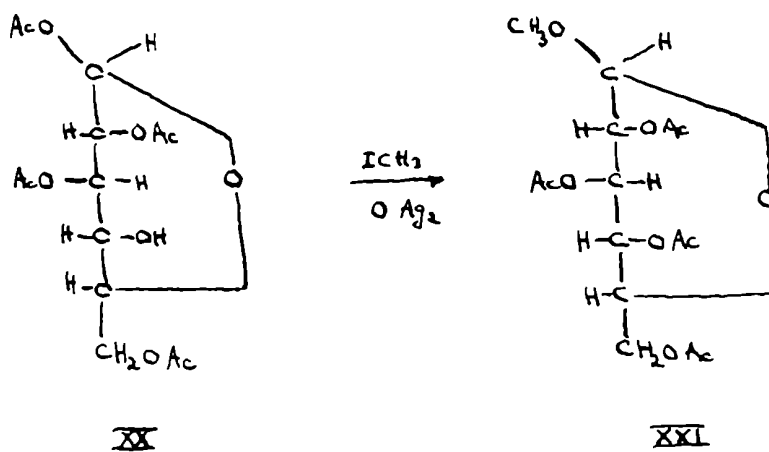
En base a estos estudios se puede afirmar sin lugar a duda la intramolecularidad del mecanismo de esta reacción. Si bien es cierto que en esta reacción no se ha logrado aislar hasta ahora ninguna estructura ortoéster intermedia postulada, en el campo de las reacciones intramoleculares existen hechos que permiten creer firmemente en la posibilidad de tales estructuras, cuya existencia fue postulada por primera vez por Emilio Fischer en 1920 (39).-

En muchas de estas experiencias, además, se

ha puesto de manifiesto la desigual reactividad que presentan los hidroxilos de las monosac.

Estas transesterificaciones se llevaron a cabo tanto en medio alcalino como ácido. Sin embargo, fueron más intensamente estudiadas las realizadas en medio alcalino, especialmente las metilaciones de azúcares parcialmente acetilados.

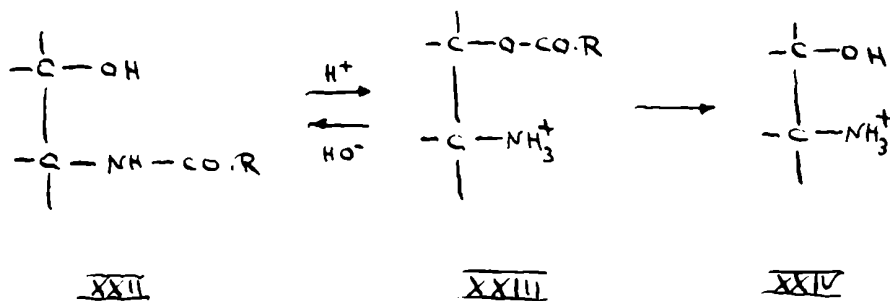
Como ejemplo puede mencionarse la metilación de la 1,2,3,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranososa, con yoduro de metilo y óxido de plata, en la que se obtiene el metil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido por migración del acetilo del carbono 1 al carbono 4. (35)



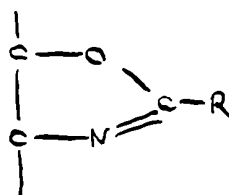
la 1,2,3,4,-tetra-O-acetil- β -D-glucosa hacia el carbono 6, para dar la 1,2,3,6 tetra-O-acetil- β -D-glucosa, migración que sería provocada por la sola acción catalítica del álcali presente en el vidrio alcalino (36).

Este tipo de migraciones indica evidentemente una diferencia en la reactividad de los hidroxilos primarios y secundarios. Esta diferente reactividad de los hidroxilos en los hidratos de carbono, ha sido puesta de manifiesto, además, en muchas experiencias de metilación de tosilación, de benzoylación y de hidrólisis, que no creemos necesario describir aquí, pero de las que resulta evidente una marcada reactividad de los hidroxilos 2 y 6.

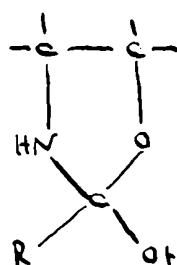
Las migraciones antes descritas son, en algunos casos, un valioso elemento de juicio en la dilucidación de estructuras. Así, se ha observado que en medio ácido se producen migraciones desde un nitrógeno acilado hacia un hidroxilo contiguo produciéndose como etapa final la eliminación del acilo:



Como estructura intermedia se postuló cualquiera de las siguientes:



XXV



XXVI

Si el proceso hidrolítico final es lento, el compuesto (XXVII) puede ser aislado. La hidrólisis final resulta favorecida por el efecto repulsivo del $-NH_2^+$ sobre los protones. Esta migración se produce con retención de configuración.

Si al medio en que se ha efectuado esta reacción se le agrega exceso de álcali, se produce una rápida migración reversible del acilo desde el oxígeno hacia el nitrógeno y siempre con retención de la configuración.

Estos hechos, conocidos en la química de los 2-amino alcoholes, fueron aplicados por No Caslandi (37) en las migraciones de las formas cis y trans de los 2-N-acetil ciclohexanoles. Si se suponía un mecanismo como el anterior, un compuesto con el H_2O^- en cis contiguo al N-acetilo reaccionaría más rápidamente que uno en trans. Por otro lado si no se produjera el ortoéster, el hecho de que el hidroxilo estuviera en cis perturbaría un mecanismo basado en la ruptura directa. Los hechos experimentales confirmaron ese mecanismo al comprobarse que la forma cis reacciona 5 a 6 veces

ces más rápidamente que la trans. Fodor y Kiss (38) verificaron que en el cis 2-N-benzoil ciclohexanol, el HCl alcohólico provoca una migración más rápida desde el nitrógeno hacia el oxígeno que el compuesto trans correspondiente. Con exceso de base, reconvirtieron cada uno de los dos alcoholatos del amina éster, en la respectiva hidroxil amida inicial.

Estas experiencias corroboran indirectamente, de una manera experimental, la hipótesis de las estructuras oxiposter intermedias en estas migraciones.

.-

ANTECEDENTES EN EL CAMPO DE LOS DISACÁRIDOS

El estudio de la acción del moníaco sobre disacáridos acetilados ha merecido cierta atención en el pasado.

El primer intento conocido de degradación de disacáridos acetilados, por medio del amoníaco, fué el de G. Zemplén en 1926 (39), quien intentó aplicar la reacción de Wohl, modificada, al nitrilo del ácido celobiónico. Obtuvo así sustancias américas que contenían nitrógeno, por lo que supuso que se trataba de "acetamido derivados." En consecuencia no intentó el aislamiento e identificación de esos productos ya que su propósito era el de demostrar la estructura de los disacáridos reductores, a través de sucesivas degradaciones de sus nitrilos, cosa que no podía realizar si el carbono 1 estaba bloqueado por un grupo acetamido. Por otra parte la eliminación del mismo por hidrólisis, no era factible, pues traería aparejada simultáneamente, la ruptura de la unión glu-

cosídica.

En 1936, Zechmeister y Tetš (40) disolvieron la octaacetil celobiosa en amoniaco líquido y mantuvieron esta mezcla a 55° durante 48h. Pudieron aislar de los productos de la reacción una N-acetil-celobiosilamina de pf. 246° y cuyo acetato fundió a 196°.

Por acilación del jarabe residual aislaron la N,N'-diacetil-celobiosiliden-diamina totalmente acetilada, que fundió a 196° (algunas muestras ablandaban a 140°). La eliminación de los O-acetilos con hidróxido de bario, les permitió obtener la N,N'-diacetil-celobiosiliden diamina libre, producto que estos investigadores no lograron cristalizar pues no dan pf. ni datos analíticos correspondientes a C y H terminaciones de carbono e hidrógeno.

Zechmeister y colaboradores describieron en ese mismo trabajo, otra técnica según la cual, después de efectuada la degradación en las condiciones mencionadas, y una vez evaporado el amoniaco, disolvieron el sólido residual en etanol y precipitaron con éter, un jarabe que fué acetilado. Al volcar la mezcla acetilante sobre agua obtuvieron un precipitado que, recristalizado fundió a 230° y que contenía 1/2 átomo de nitrógeno por mol de acetato. Los líquidos acuosos, extraídos con cloroformo, dieron el acetato de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina.

En 1952, Fritz Michael y colaboradores (41) sometieron la octaacetilcelobiosa a la acción del amoniaco metanólico al 40 % durante 120 h. a 50°. De esta mezcla aislaron la celobiosilamina y la dicelobiosilamina. Por acilación de la primera, obtuvieron un acetato cuyo punto de fusión

fué de 188°. Como ya se dijo, Mehnmeister y colaboradores dan, para este producto un punto de fusión de 196°.

Como puede verse, en los trabajos realizados hasta ahora acerca de la acción del amoníaco sobre disacáridos acetilados predomina un interés preparativo y descriptivo.

Ninguno de ellos fué realizado en condiciones comparativas con las experiencias similares efectuadas en el campo de los monosacáridos.

El estudio de la acción del amoníaco metálico sobre disacáridos acetilados y en condiciones comparativas presentaba interés por varias razones.

1o. Desde un punto de vista puramente descriptivo, permitiría extender el conocimiento acerca de las reacciones de los disacáridos, especialmente en los casos de la lactosa y de la maltosa, azúcares a los que no se había aplicado todavía esta reacción.

2o. Desde el punto de vista del mecanismo de la reacción en estudio interesaba determinar:

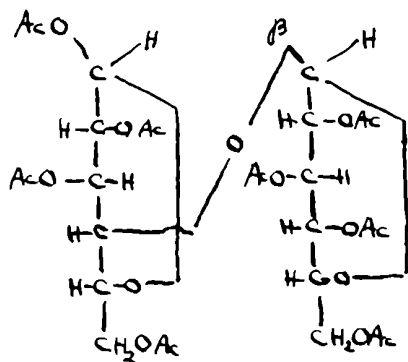
a) Qué influencia ejercería el voluminoso sustituyente en el carbono 4 de la parte reductora del disacárido.

b) Si la configuración del monosacárido fijado en el carbono 4 de la mitad reductora, podría afectar de alguna manera el curso de la reacción. Sería el caso de la celobiosa e de la maltosa acetiladas, por un lado, y el de la lactosa acetilada, por el otro.

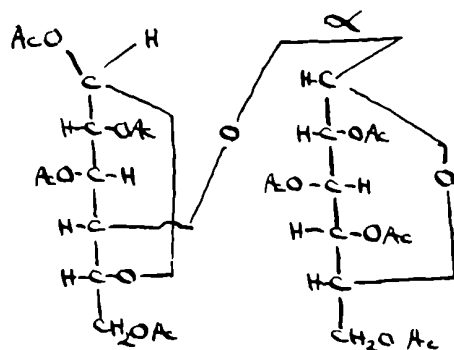
c) En el caso particular de la β -octaacetil-celobiosa (IXVII) y de la β -octaacetilmaltosa

(XVIII) determinar que influencia puede tener la configuración glucosídica α o β en la marcha de la reacción.

d) Determinar si en el campo de los disacáridos tiene importancia la configuración anómérica del disacárido del cual se parte.



XXVII



XXVIII

DESCRIPCION DE NUESTRAS EXPERIENCIAS

La reacción del amoníaco con la α -octaacetilcelobiosa

Esta reacción fué llevada a cabo por nosotros en las condiciones usuales que se emplearon en las experiencias con monosacáridos acilados, es decir, con solución saturada de amoníaco en metanol (aproximadamente al 16 %) y a temperatura ambiente. Por eliminación del amoníaco a las 24 hs. de efectuada la reacción y por concentración a pequeño volumen se aisló por cristalización directa, el azúcar libre correspondiente, es decir celobiosa. Esta cristalización no fué cuantitativa. La solución evaporada a sequedad se extrajo con acetato de etilo para eliminar la acetamida formada por la amonólisis de los acetilos. Esta eliminación nunca es exhaustiva y durante las diferentes etapas de la experiencia se hizo necesario extraerla frecuentemente. Su eliminación trajo aparejada la cristalización de nuevas cantidades del azúcar libre, por redisolución en metanol.

El factor que impidió la cristalización directa de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina fué la presencia de sustancias de naturaleza básica, que se hizo necesario eliminar. Esta eliminación se efectuó en dos etapas. La primera consistió en pasar el producto disuelto en agua, por una resina carboxílica que eliminó solo parcialmente esas sustancias básicas. Esto permitió aislar del jarabe resultante nuevas cantidades de celobiosa sin que cristalizara la N,N'-diacetil-celobiosiliden-diamina. De esta manera se pudo eliminar casi todo el azúcar libre producido en la reacción.

La segunda etapa en la eliminación de estas sustancias básicas, consistió en pasar el producto de la reac

ción por una resina sulfónica. Por elución con agua y concen -
tración se obtuvo un jarabe que, disuelto en metanol, al cabo
de varios días proporcionó la N,N'-diacetil-celobiosiliden dia-
mina cristalina, con un rendimiento de 3,7 %.

La evaporación de los alcoholes madres dió un
residuo siruposo del que no se logró cristalizar nada. La ace-
tilación de este residuo se efectuó con piridina y anhídrido
acético, siguiendo la técnica usual de volcar la mezcla sobre
agua a las 24 h. Se obtuvo así un precipitado que se denominó
fracción I de acetatos, y además, una fracción soluble en la
solución acuo-piridín-acética, que se denominó fracción II de
acetatos. De esta última fase, por extracción con cloroformo
se aisló el acetato de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiami-
na, residual que no había cristalizado anteriormente.

Este acetato, purificado por pasaje a través
de una columna de talco-celite-503 producto por anolisis
la N,N'-diacetil-celobiosiliden diamina.

La fracción I de acetatos, por recristaliza-
ción en etanol, dió un producto que fundió a alrededor de los
230° y que después de varias recristalizaciones no mejoró su
punto de fusión. Este producto lo consideramos análogo al que
aislaron Lechmeister y Toth en sus experiencias de acetila -
ción.

Por pasaje de este producto a través de una
columna de talco-celite, se aislaron dos sustancias cristali-
nas, una de las cuales demostró ser la α -octaacetilcelo-
biosa. La otra, obtenida en cantidades prácticamente equimo-
leculares con la primera, evidenció ser una N-acetil-celobio-
silamina acetilada, y de cuyo $[\alpha]_D$ elevado se deduce que

es la forma anómérica alfa de la N-acetil-celobiosilamina acetilada descrita por Zechmeister y Toth y cuyo bajo poder rotatorio parecería indicar la forma beta.

Por amonólisis de esta sustancia, no se pudo obtener un producto cristalino. Una cromatografía en papel de este amonólizado demostró la presencia de una única sustancia de carácter no reductor, lo que indica claramente la presencia del N-acetilo en el carbono 1.

Dado que la existencia de esta sustancia se evidenció por acetilación de los jarabes residuales, de los que se aisló como acetato, quedaba en pie el problema de si se trataba de un producto primario de la reacción o de si se obtenía por acetilación de cantidades residuales de celobiosilamina que eventualmente se hubieran formado por la acción del amoníaco sobre la celobiosa libre. Para asegurar la eliminación de cualquier resto de celobiosilamina, se realizó una experiencia similar a la descrita hasta ahora, pero se efectuó el pasaje del producto tres veces consecutivas través de la resina sulfónica, regenerada antes de cada pasaje. En este caso se volvió a obtener el acetato de la N-acetil-celobiosilamina con rendimiento similar.

niento calculado en N,N^o diacetilcelobiosilidendiamina se eleva a 9,4 %.

La amonólisis de esta acetato dió la diamida de la celobiosa, idéntica con la obtenida a partir de la octaacetilcelobiosa. Además se obtuvo un producto de punto de fusión 176^o. de muy bajo contenido en nitrógeno y cuya naturaleza se desconoce.

Resumen:

El estudio experimental de la reacción entre la α -octaacetilcelobiosa y el amoníaco metanólico ha conducido al aislamiento de las siguientes sustancias:

- a) Celobiosa, de pf. 234-236^o (desc.); $[\alpha]_D^{24,5} + 26,7$ (a los 30 minutos), $[\alpha]_D^{24,5} + 34,7$ (valor final) (agua). Identificada además por la preparación de su β -octaacetato y de su osazona. El rendimiento de celobiosa fué de 89,3 %.
- b) N,N^o-diacetil-celobiosiliden-diamina de pf. 113-115^o; $[\alpha]_D^{26,5} - 23,3$ (agua); este producto fué también obtenido por Zechmeister y Toth (40) en una reacción análoga empleando amoníaco líquido a la temperatura de 50^o en tubo cerrado. Estos autores indican el poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} - 20$ (agua) y análisis para el nitrógeno, no dando el punto de fusión.
- c) Octa-O-acetil-N,N^o-diacetil-celobiosiliden-diamina de p.f. 196^o (con ablandamiento a 140^o) $[\alpha]_D^{27} + 6,6$ (cloroformo). Esta sustancia la consideramos similar a la obtenida por Zechmeister y Toth (40) aunque estos autores dan

un poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} -3,5^\circ$. El punto de fusión del producto aislado por ellos coincide con el nuestro.

d) Hepta-O-acetil-N-acetil- α - celobiosilamina, de p.f. 242-243°; $[\alpha]_D^{20} + 54,09$ (cloroformo).

Esta sustancia por su elevado poder rotatorio la consideramos anónima de la obtenida por Reichmeister y Toth (40) quienes dan para la sustancia por ellos obtenida (1-amino-celobiosa peracetato) un p.f. 196° y un $[\alpha]_D^{20} -8,4^\circ$ (cloroformo).

En el estudio de la reacción de la β -octaacetilcelobiosa con el amoníaco metanólico, se obtuvieron las siguientes sustancias:

e) Octa-O-acetil-N,N'-diacetil-celobiosiliden-diamina de p.f. 198° (abl. a 1400) y $[\alpha]_D^{20} + 7,5^\circ$ (cloroformo) idéntica a la descrita en (c).

f) Por amonólisis de la sustancia obtenida en (e) se obtuvo la N,N'-diacetil-celobiosiliden diamina de p.f. 113-115° y $[\alpha]_D^{20} - 21,4^\circ$ (agua), idéntica a la descrita en (b).

g) No se demostró la presencia de N-acetil- α - celobiosilamina, aislada en el caso de la α - octaacetilcelobiosa.

h) Se encontró que la amonólisis de las formas anómeras de la octaacetilcelobiosa de rendimientos diferentes en "aldeosa-amida", siendo de 3,7 % para la forma α y de 9,4 % para la forma β .

LA REACCION DEL AMONIACO CON LA β -OCTAACETIL-LACTOSA

El estudio realizado con la β -octaacetil-lactosa siguió los lineamientos de la técnica descrita para el trabajo que describe la acción del amoníaco sobre la octaacetil-celobiosa. Análogamente se produjo un alto rendimiento del azúcar libre, se observó también la imposibilidad de cristalizar directamente la N,N'-diacetil-lactosiliden-diamina en presencia de sustancias básicas, por lo que se eliminaron por pasaje a través de resinas carboxílica y sulfónica sucesivamente.

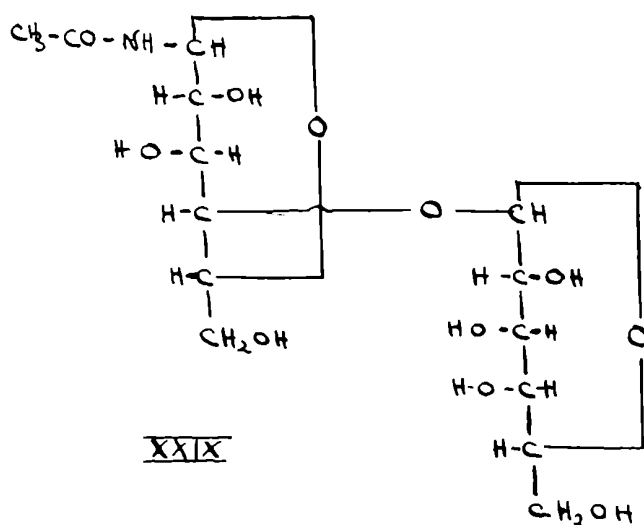
Se trató de investigar la presencia de N-acetil-lactosil-amina. En un primer estudio, se acetiló el jarabe residual obtenido después de aislar la N,N'-diacetil-lactosiliden-diamina. Esta técnica no condujo de inmediato a productos cristalinos, por lo que se trató de resolver la mezcla amorfa de acetatos en una columna de Talco: Celite 503. Se pudo aislar así como único producto cristalino el acetato de la N-acetil-lactosilamina, de pf. 181-183° ; $[\alpha]_D^{25} + 68,1^{\circ}$ (CHCl₃).

En base a este resultado se intentó obtener directamente la N-acetil-lactosilamina libre con la que se demostraría indubitablemente que dicha sustancia es un producto primario de la reacción. Para ello el jarabe residual obtenido después de cristalizar la N,N'-diacetil-lactosiliden-diamina se cromatógrafió en columna de carbón, obteniéndose la N-acetil-lactosilamina por elución con etanol al 10 %. El pf. de esta sustancia fue de 162-163° y su $[\alpha]_D^{25} + 71,5^{\circ}$ (agua).

Richard Kuhn y Gerd Krüger (43) obtuvieron

una N-acetil-lactosilamina por reacción de la l-amino-lactosa con acetona. El producto por ellos obtenido, que denominaron l-desoxi-l-acetamino- β -lactosa, funde a 243-248°; cristaliza con dos moléculas de agua y tiene un $[\alpha]_D^{25} + 1,5^\circ$ (agua).

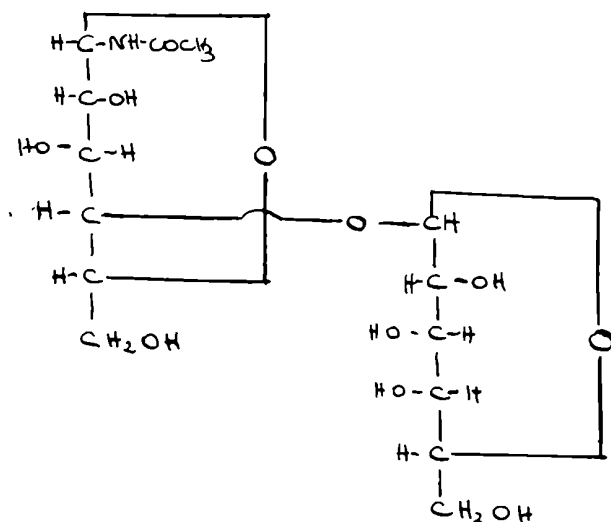
Le asigna, por lo tanto la siguiente estructura:



Dichos investigadores obtienen este mismo producto acetilando la lactosilamina y amonolizando este acetato con amoníaco metanólico.

Esta N-acetil lactosilamina da un acetato de p.f. 142-146° y de $[\alpha]_D^{25} + 2,7^\circ$ (en cloroformo).

En base a los elevados poderes rotatorios obtenidos por nosotros para la N-acetil-lactosilamina y su acetato les asignamos la configuración α (Fórmula XXX).



XXX

-.-

Resumen:

El estudio experimental de la reacción entre la β -octaacetil-lactosa y el amoníaco metabólico ha permitido obtener las siguientes sustancias:

- a) Lactosa, de p.f. 222-224°; $[\alpha]_D^{24.5} + 52,8^\circ$ (agua), identificada por medio de su β -octaacetato de su fenilosazona y por cromatografía sobre papel.
- b) N,N'-diacetil-lactosiliden-diamina de p.f. 115-117°; $[\alpha]_D^{26,5} - 14,8^\circ$ (agua), no descrita en la literatura.
- c) Octa-O-acetil-N,N'-diacetil-lactosilidendiamina: de p.f. 223-225° y $[\alpha]_D^{22} - 3,94^\circ$ (CHCl₃) sustancia no descrita en la literatura.
- d) N-acetil- α -lactosilamina de p.f. 162-163° y

$[\alpha]_D^{24} + 71,5^\circ$ (agua). Compuesto que consideramos anómero del obtenido por N. Kuhn y G. Brüger (43), el cual tiene un p.f. de $246-248^\circ$ y $[\alpha]_D^{25} + 1,5^\circ$ (agua).

e) Hepta-O-acetil-N-acetil- α -lactosilamina de p.f. $181-183^\circ$ y $[\alpha]_D^{23} + 68,1^\circ$ (cloroformo); sustancia que consideramos anómera de la obtenida por N. Kuhn y G. Krüger (43) quienes dan para esa sustancia un p.f. $142-146^\circ$ y $[\alpha]_D^{25} + 2,7^\circ$ (cloroformo).

LA REACCIÓN DEL AMONÍACO CON LA β -OCTAACETILMALTOSA

La amonólisis de la β -octaacetilmaltosa con amoníaco metanólico condujo a la formación de un jarabe del que fué imposible aislar directamente productos cristalinos. El pa-
saje de este jarabe por resina sulfónica Amberlite I R - 120, con el objeto de eliminar sustancias básicas, no resultó eficaz para aislar "aldosamidas", como lo había sido en los casos de la celobiosa y lactosa.

Se intentó aislar las "aldosa-amidas" por acetilación del jarabe previamente pasado por resina sulfónica. Al volcar la mezcla acetilada sobre agua se obtuvo un precipitado insoluble constituido en su mayor parte por acetato de maltosa. Por extracción con cloroformo del líquido sobrenadante se obtuvo un sólido amorfo nitrogenado que no cristalizó en etanol, metanol, o benceno. Una cromatografía en talco-celite 503 de este sólido, no condujo tampoco a productos cristalinos.

No obstante, la presencia de la N,N'-diacetil-maltosilidendiamina pudo ser detectado en el jarabe no acetilado, por cromatografía en papel empleando el reactivo de ácido pícrico-metaperyodato de sodio, que se describirá más adelante, que daba coloración rosada con los derivados análogos de celobiosa y lactosa.

La N,N'-diacetil-maltosilidendiamina posee casi el mismo Rf que la maltosa pura, siendo éster un factor de perturbación en las cromatografías sobre papel. Esta similitud se mantuvo a pesar de emplearse diferentes sistemas de solventes.

porción de maltosa cristalina, la aldosa-amida siempre aparecía asociada con maltosa, según lo evidenciaban las cromatografías en papel, revelando con reactivo de ácido pícrico-metaperyodato de sodio para detectar la maltosa diacetamida y con el reactivo de ácido pícrico-metóxido de sodio para evidenciar la maltosa. Una cromatografía en columna de celulosa tampoco permitió separar ambos azúcares.

Las fracciones de la cromatografía en carbon Darco G-60-Celite 503 que dieron pícrico-metaperyodato positivo se agruparon y acetilaron obteniéndose así, por un lado el acetato de maltosa cristalino, y por otro el acetato de N,N'-diacetil-maltosilidendiamina (en proporciones casi equimoleculares) que cristalizó ahora fácilmente de benceno. Este acetato solo se pudo recrystalizar de este disolvente.

Debido a la serie de operaciones que fué necesario efectuar para demostrar la formación de la N,N'-maltosilidendiamina, no se puede calcular un rendimiento exacto para la reacción de la β -octaacetilmaltosa con el amoníaco metanólico. Se puede ver sin embargo que este rendimiento es extraordinariamente bajo y del orden del 0.80 % calculado en base a la cantidad de acetato obtenida.

En base a las conclusiones que surgen del análisis de los trabajos realizados por Zechmeister y Toth, por Michael y col. y por nosotros, que se discutirán más adelante se pensó que la amonólisis de la β -octaacetilmaltosa con amoníaco acuoso (solución al 25 %) conduciría a rendimientos más elevados de N,N'-diacetilmaltosiliden diamina, lo cual se pudo confirmar siguiendo una técnica de acetilación del jarabe obtenido mediante esta amonólisis. A partir del acetato de

la maltosa diacetamida se obtuvo, por reacción con amoníaco metanólico, la N,N'-diacetilmaltosilidendiamina cristalina. El rendimiento de esta diamida (22,5 %) obtenida en medio acuoso fué marcadamente superior al obtenido con amoníaco metanólico, con lo que se confirman las conclusiones a que llegamos en la discusión que se hará más adelante.

Resumen:

El estudio experimental de la reacción entre la β -octaacetil-maltosa y el amoníaco metanólico ha permitido demostrar la formación, con muy bajo rendimiento, de la N,N'-diacetil-maltosiliden-diamina, aislada como octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosiliden-diamina de p.f. 95° (abl. 65°) y $[\alpha]_D^{23} + 47,4^\circ$ (cloroformo).

El estudio de la reacción del amoníaco acuoso al 25 % sobre la β -octaacetilmaltosa permitió obtener con un rendimiento notoriamente más elevado (22,5%) la N,N'-diacetil-maltosilidendiamina de p.f. 84-86° y $[\alpha]_D^{24.5} + 81,1^\circ$ (agua) que fué aislada como octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosilidendiamina de p.f. 95° (abl. 65°) y $[\alpha]_D^{24} + 46,6^\circ$ (cloroformo).

Ambas sustancias no figuran descritas en la literatura.

REACTIVOS CROMATOGRAFICOS

En el curso de nuestro trabajo sobre disacáridos, hemos desarrollado tres reactivos cromatográficos cuyas aplicaciones se podrán ver en la parte experimental.

10.- Reactivo para algunas sustancias nitrogenadas.

Consiste en una solución acuosa de ácido pícrico y metaperiodato de sodio. Este reactivo se proyectó pensando en la acción oxidante del metaperiodato sobre los azúcares, con producción de aldehídos por ruptura de la molécula en varios sitios. Estos aldehídos actuarían luego sobre el ácido pícrico, dando el color rosado del ácido picrámico. Sin embargo se observó que disacáridos tales como la celobiosa, lactosa, etc, no daban coloración con concentraciones locales de rango cromatográfico, lo que se atribuyó a la conocida inestabilidad de los productos de oxidación de los disacáridos por el metaperiodato. En el caso de monosacáridos tales como glucosa o fructosa, se produjo coloración, aunque la concentración local necesaria fué algo elevada comparada con la que se detecta usualmente en cromatografía sobre papel. Pero donde este reactivo demostró tener amplia utilidad fué en la detección de algunos hidratos de carbono nitrogenados.- Asimismo se comprobó su eficacia en el caso de algunos aminoácidos y sustancias con ellos relacionadas así como en la detección de algunas sustancias nitrogenadas de naturaleza heterocíclica.

En el caso de los aminoácidos se observó que un pequeño número de ellos dan color con las concentraciones usuales en cromatografía, por lo que este reactivo se puede considerar selectivo para esas sustancias. Es interesante de

tear la sensibilidad que este reactivo posee frente a la triptamina y a la serotonina (5-hidroxitriptamina) pudiéndose detectar de 2 a 4 μ g de esta última sustancia, en frío.

Ilo.- Reactivos para azúcares libres y sus ésteres.

Se trata de dos reactivos que, en cierta manera se complementan. Uno de ellos consiste en una solución de nitrato de plata metanólico en medio de metóxido de sodio; el otro es una solución de ácido pícrico y metóxido de sodio.

El primero produce coloración en frío con todos los hidratos de carbono libres, acetilados o benzoylados; el segundo, solamente con los reductores o sus ésteres.

El reactivo de nitrato de plata-metóxido de sodio permite seguir el proceso de reducción del ión plata en frío y por el aspecto que va adquiriendo el cromatograma se puede diferenciar la presencia de azúcares reductores o no reductores.

Con los azúcares reductores, se produce rápidamente una mancha que puede adquirir tonalidades pardo-verdesas o pardo-amarillentas. En presencia de azúcares no reductores suele producirse primeramente el oscurecimiento intenso del fondo, haciéndose, después de algunos minutos, francamente evidente la mancha de la sustancia no reductora como una gota amarilla.

El poder seguir la reducción en frío desde el principio hasta el final, permite detectar manchas débiles que al final podrían disimularse con el color del fondo. Otra ventaja reside en su aplicabilidad a la cromatografía de acetatos de azúcares. Los ensayos por nosotros realizados indi-

con la utilidad de este reactivo en la detección directa de acetatos y también de benzoatos, aunque la cromatografía sobre papel de estos últimos hasta el presente no ha sido encarada.

El reactivo de ácido picrico-metóxido de sodio, se basa en la conocida reacción de Brown para hidratos de carbono reductores. Decidimos ensayar esta reacción en las condiciones usuales, es decir, en medio alcalino de hidróxido de sodio, acuoso o hidroalcohólico. En estas condiciones, el reactivo presentó el inconveniente de tener que ser pulverizado en caliente, pues en frío se producía su precipitación. Decidimos reemplazar entonces el hidróxido de sodio por una solución de sodio en metanol, al 10 %. Se logra así la aparición, después de es-
lentar a 110° , de una mancha rosada sobre fondo amarillo, debida probablemente a la formación de ácido picrónico.

Se comprobó que dan reacción positiva los azúcares reductores, sus ésteres acetilados y también aquellos azúcares que poseen en el carbono 1 grupos hidrolizables en medio alcalino. No reaccionan, en cambio, los azúcares con grupos no hidrolizables en el carbono 1, ni sus ésteres.

Dado que una de las técnicas conocidas para cromatografía sobre papel de acetatos de azúcares, consiste en correr dichas sustancias sobre papel impregnado con formamida (44) se ensayó también la eficacia de estos reactivos sobre papeles así tratados, observándose que era imposible la detección de azúcares colocados sobre ellos. Este hecho ya fue puntualizado, para el caso de nitrato de plata acuoso y en papel formamida, por Wickberg (44).

Resumen:

Se estudian tres reactivos cromatográficos no descriptos previamente en la literatura:

- a) Reactivo de nitrato de plata-metóxido de sodio: que presenta utilidad en la detección en frío de azúcares reductores, no reductores y ésteres de los mismos.
- b) Reactivo de ácido píorico-metóxido de sodio: que ha presentado utilidad para la detección exclusiva de azúcares reductores y de sus ésteres.
- c) Reactivo de ácido píorico-metaperyodato de sodio: se ha empleado en la detección de algunos hidratos de carbono nitrogenados. Se describe además su utilidad para la detección de algunos aminoácidos y compuestos heterocíclicos. Dada la importancia biológica de la serotonina se destaca la especial sensibilidad de este reactivo para la detección de esta sustancia.

DISCUSION

A - La influencia del solvente.

Sobre la reacción entre el amoníaco y la octoacetil-celobiosa se han efectuado hasta ahora tres estudios experimentales cuya discusión puede presentar interés.

En las experiencias de Zechmeister y Toth se observan como hechos sobresalientes: el empleo de amoníaco líquido, de temperatura de reacción comparativamente elevada (55° durante 48 hs.) y, finalmente, la obtención de rendimientos relativamente altos de "aldosa-amidas". No se describe el aislamiento del azúcar libre ni de celobiosilamina.

Fritz Michael y colaboradores emplearon amoníaco disuelto en metanol en concentración elevada (40 %) y temperatura alta (50° durante 12 h.) Estos investigadores no describen el aislamiento de "aldosa-amidas", aislándose en cambio celobiosilamina y di-celobiosilamina por cristalización directa de la solución.

En nuestras experiencias, la reacción se llevó a cabo en amoníaco metanólico al 16 % y a temperatura ambiente, manteniéndose en esas condiciones durante 24 h. Se obtuvo de esta manera, un elevado rendimiento del azúcar libre (casi 90 %) y muy bajo rendimiento de la "aldosa-amida" (aprox. 3 %). No se evidenció la presencia de celobiosilamina.

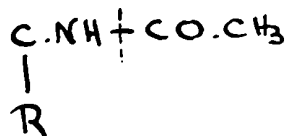
En los tres estudios mencionados vemos que se han introducido variaciones de concentración temperatura y medio reaccionante cuya influencia en la elección de las rutas simultáneas y competitivas que puede seguir esta reacción solo puede determinarse, en principio, analizando aisladamente dichos factores.

En los trabajos realizados por los dos grupos de investigadores alemanes, se puede ver gran analogía en las condiciones experimentales que se refieren a temperatura y concentración comparativamente elevada de amoníaco. Dada la disparidad de productos obtenidos en ambos casos puede inferirse que la temperatura y la alta concentración de amoníaco no son los factores determinantes en la elección de la ruta que conduce preferentemente a la formación de "aldosa-amidas".

Un factor diferencial en estas dos experiencias, en lo que a temperatura se refiere, es el prolongado tiempo de calentamiento que emplean Fritz Michael y colaboradores. Esto obliga a plantear la hipótesis de una posible hidrólisis de la "aldosa-amida" que presuntamente se formaría en una primera etapa, lo que conduciría a la formación del azúcar libre o de la celobiosilamina, según que en esta hidrólisis se siguiera la ruta^(a) o la (b)



XXXI
(a)



XXXII
(b)

añaco para dar celobiosilamina. La posibilidad de esta última reacción quedó demostrada en una experiencia en la que estos investigadores someten la celobiosa a la acción del amoníaco al 40 % durante 72 h. obteniéndose la celobiosilamina.

No obstante, la hipótesis de la formación e hidrólisis de las celobiosa-amidas como primera etapa no nos parece acertada, pues estas sustancias han demostrado notable estabilidad en medio alcalino. Así lo evidencian nuestras experiencias acerca de la cromatografía sobre papel de estas amidas y en las que se usó el reactivo de ácido pícrico-metóxido de sodio.

Estas sustancias no dieron, en ese medio fuertemente alcalino, el color rojo característico calentadas a 110° , color que dan rápidamente todos los azúcares libres.

Creemos, en consecuencia, que el producto primario es la reacción efectuada por F. Michael y colaboradores es el azúcar libre, obtenido por amonólisis directa y este azúcar en las condiciones experimentales descritas, conduce a la formación de la celobiosilamina.

En ese aspecto, tanto las experiencias de F. Michael y col. como las nuestras son coincidentes, coincidencia que nosotros atribuimos al hecho de haberse empleado medio metanólico en ambos casos.

En base a las consideraciones anteriores, se puede establecer que en la elección de las rutas competitivas, tiene un papel preponderante, más que la concentración y la temperatura, el disolvente en el que se lleva a cabo la reacción.

La presencia de metanol provocaría preferentemente

te una reacción de amonólisis total con formación principal del azúcar libre. La ausencia de metanol conduciría primordialmente a la formación de "aldosa-amidas" con buen rendimiento. Esta influencia del alcohol, hasta cierto punto, parecería ser general, pues en las experiencias ya mencionadas con el tetra-acetil-D-xilomonitrilo (3), tetracetil-L-xilomonitrilo (7), y pentaacetil-D-galactomonitrilo (7), el cambio de disolvente, de alcohol por agua, incrementa notablemente el rendimiento de "aldosa-amidas". Este sería otro ejemplo en el que se pone de manifiesto la importancia del disolvente en la elección de las rutas competitivas y simultáneas.

Es necesario aclarar, sin embargo, que obviamente existe un límite mínimo en la concentración de amoníaco por debajo del cual el proceso puede sufrir variaciones. Por otra parte una comprensión clara de la influencia de la temperatura requeriría llevar a cabo el estudio de este factor en condiciones más sistemáticas. La discusión anterior presenta un esquema en base a los pocos datos existentes.

Un análisis de los productos obtenidos en nuestras experiencias, indica que hay tres tipos de sustancias: a) el azúcar libre, b) las "aldosa-amidas" c) un grupo de sustancias básicas, de composición todavía no conocida.

En lo que respecta a este último grupo, se plantea el problema de determinar si se trata de productos primarios o secundarios de la reacción. Por estar este aspecto todavía en elaboración, nos circunscribiremos a considerar solamente las dos rutas competitivas a) y b).

La que conduce a la formación del azúcar libre es una reacción que transcurre de acuerdo con un mecanismo de amonólisis de ésteres.

La que conduce a la formación de "aldosa-amidas" es una reacción compleja que transcurre mediante un mecanismo intramolecular de ortoésteres.

El que predomine un producto u otro dependerá de las velocidades relativas de ambos tipos de reacción. Cuanto más rápido sea el mecanismo de anacolisis, menor será el rendimiento de "aldosa-amida" obtenido. De aquí surge la conveniencia de estudiar los factores que influyen en la velocidad de anacolisis.

En lo que respecta a este problema, hemos de referirnos al estudio cinético efectuado por Raymond L. Bette y Luis F. Hammett (42), sobre la anacolisis de ésteres del ácido fenilacético en solución metanólica.

Un mecanismo de hidrólisis de ésteres, en medio básico, que implique una fisión acil-oxígeno (XXIII), se considera bimolecular, simbolizándose B_{ac}2 (hidrólisis básica acilo bimolecular).



XXIII

Estos hechos son interpretados, por los autores mencionados, como debidos a la existencia de dos reacciones competitivas en el proceso de amonolisis: una reacción catalizada y otra no catalizada. El mecanismo para una catálisis básica de este tipo involucraría el ión amidógeno NH_2^- . Las interrelaciones entre los tres iones que determinan la velocidad de amonolisis surgirían del siguiente pre-equilibrio:



Las dos reacciones que tendrían lugar, ambas del tipo $\text{B}_{\text{AC}2}$, serían:



Los autores citados, consideran que la velocidad de la reacción (XXXVII) es proporcional a (éster) (NH_3) , mientras que la velocidad de ataque del ión amidógeno a la molécula de éster (XXXVIII) es proporcional a (éster) $(\text{NH}_3)^{3/2}$

Podemos ver como, según la ecuación (XXXIV), la presencia de iones amonio en exceso, disminuye la formación de NH_2^- , del que depende, en gran parte, la velocidad de amonolisis.

nolisis.

Por otra parte, según la ecuación (XXXVI) resulta evidente porqué la presencia del CH_3O^- acelera esa reacción.

Estas consideraciones podríamos extenderlas ahora a la reacción del amoníaco con los hidratos de carbono acilados para explicar la influencia del disolvente en las reacciones mencionadas anteriormente.

Es evidente que en las experiencias de Zechmeister y Toth, la ausencia de metanol impide que se cumpla la ecuación (XXXVI), con lo que disminuye apreciablemente la formación de NH_2^- , atenuándose así la reacción de amonolisis y verificándose preferentemente la de ortoésteres. Así se explicaría el mayor rendimiento en "aldosa-amidas".

Una explicación similar se podría dar en el caso de los tetraacetil-D-xilomonitrilo, tetraacetil-L-xilomonitrilo y pentaacetil-D-galactonitrilo, cuya degradación fué realizada con HONH_2 . En estos casos, la presencia del ión amonio en elevada concentración retardaría notablemente el mecanismo de amonolisis, con lo que se registra un alto rendimiento de "aldosa-amidas".

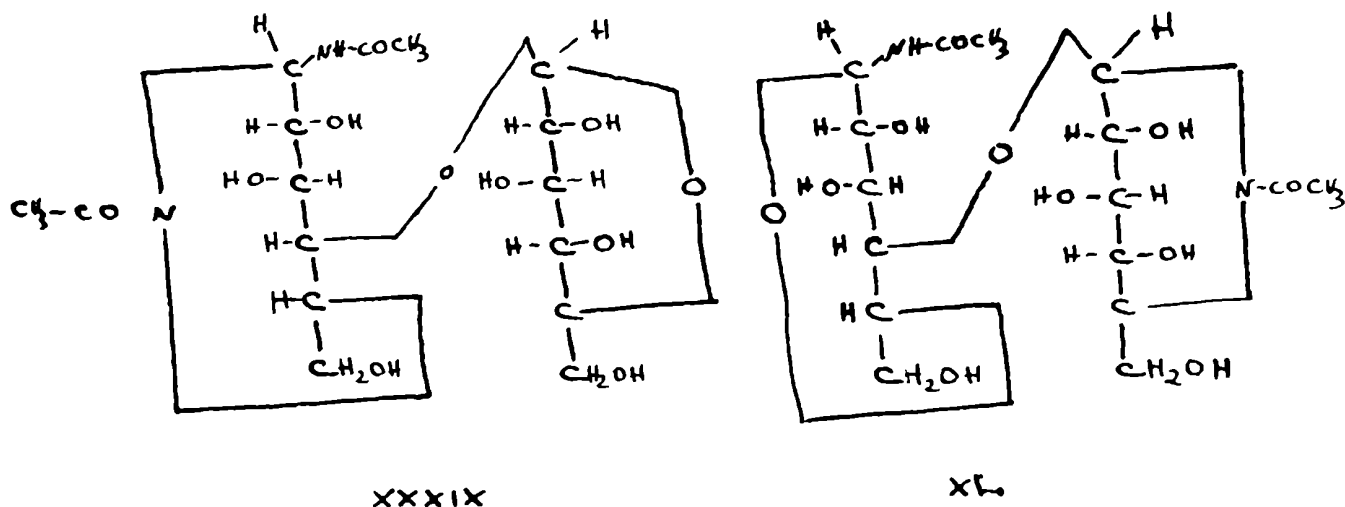
Inversamente, tanto en las experiencias de F. Michael y colaboradores como en las nuestras las ecuaciones (XXXIV), (XXXV), (XXXVI) pueden verificarse ampliamente. Especialmente en las condiciones impuestas por F. Michael y col., la elevada concentración de amoníaco en metanol, determinará un desplazamiento marcado hacia la derecha en las ecuaciones (XXXIV) y (XXXVI), es decir, una elevada concentración de NH_2^- , lo que provocaría una rápida amonolisis y un fácil ataque del amidógeno al azúcar libre así formado, produciéndose la celobiosilamina.

B.- La estructura de las diamidas de disacáridos.

En el caso de las diamidas en el carbono 1 de los disacáridos celobiosa, lactosa y maltosa se presenta un problema estructural que ya fué planteado por Zechmeister y Toth (40).

Estos investigadores obtuvieron un acetato de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina que fundió nítidamente a 196°, mientras que otras muestras sufrían ablandamiento previo a 140°.

El análisis del acetato de punto de fusión 196° dió valores altos y fué necesario postular una estructura cíclica para estas diamidas, siendo las estructuras propuestas por estos autores las siguientes:



Esta hipótesis de una estructura cíclica debe ser sometida a una discusión. De los datos analíticos para el acetato mencionado no surge de manera indubitable la existencia de un ciclo como se puede apreciar en la comparación siguiente:

	%C	%H	%N
Porcentajes teóricos para una estructura acíclica del acetato:	49,35	5,91	3,59
Porcentajes teóricos para una estructura cíclica	50,12	5,89	3,90
Hallado por Zechmeister y Toth:	49,96	6,18	4,09
	49,81	6,02	3,68
			3,62

Una determinación de acetilos hecha por Zechmeister y Toth dió los siguientes resultados:

Acilos totales (teórico para una estructura acíclica)	55,2 %
Acilos totales (teórico para una estructura cíclica)	53,9 %
Acilos totales (hallado por Zechmeister y Toth)	55,2 % y 53,3 %
O-acetilos (teórico para una estructura acíclica)	44,2 %
O-acetilos (teórico para una estructura cíclica)	41,9 %
O-acetilos (hallado por Zechmeister y Toth)	43,5 % y 43,4 %

Para el acetato de N,N'-diacetil-celobiosilidenediamina aislado por nosotros, los análisis efectuados indican dos alternativas: o una estructura acíclica sin agua de cristalización o una estructura cíclica con una molécula de agua de cristalización. El hecho de que este acetato presente un ablandamiento a 140° y funda a 196° , hace pensar en esta se-

gunda alternativa como más probable.

Los valores altos obtenidos por Zechmeister y Toth para los análisis del acetato que funde nítidamente a 198° confirman esta última alternativa. Si aceptáramos la primera alternativa esos valores serían poco probable a menos de aceptar un error en las determinaciones superior al del método.

A pesar de estos criterios orientadores, ellos no proporcionan una certeza indubitable.

Por otro lado, el análisis de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina cristalina puede interpretarse como correspondiente a una estructura cíclica con dos moléculas de agua de cristalización o a una estructura acíclica con una molécula de agua de cristalización. En este caso no es posible una comparación con los resultados de Zechmeister y Toth debido a que estos autores solo dan el dato correspondiente al nitrógeno (5,97 % y 7% en dos determinaciones).

Lo dicho anteriormente para el caso de la celobigosa puede hacerse extensivo también a los derivados de la lactosa y maltosa, como puede verse en la tabla de valores analíticos calculados para las diferentes estructuras posibles de esas "aldosa-amidas" y hallados experimentalmente por nosotros, que se indican a continuación.

N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina:

Calculado para una estructura acíclica $C_{16}H_{30}O_{12}N_2 \cdot 2H_2O$ (XLI)

C: 41,73 % N: 6,95% H: 6,08%

Calculado para una estructura cíclica $C_{16}H_{28}O_{11}N_2 \cdot 2H_2O$ (XXXIX)

C: 41,73 % N: 6,95% H: 6,08%

Mallado por nosotros:

C: 41,91% H: 6,88% N: 6,02 %

Acetato de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina:

Calculado para una estructura acíclica $C_{32}H_{46}O_{20}N_2$ (XLII)

C: 49,35 % H: 5,91% N: 3,59 %

Calculado para una estructura cíclica $C_{30}H_{42}O_{18}N_2 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (XLIII)

C: 49,04% H: 5,99% N: 3,81 %

Mallado por nosotros:

C: 48,70% H: 6,29% N: 3,69 %

N,N'-diacetil-lactosiliden-diamina:

Calculado para una estructura acíclica $C_{16}H_{20}O_{12}N_2$ (XLIV)

C: 43,43% H: 6,78% N: 6,33 %

Calculado para una estructura cíclica $C_{16}H_{28}O_{11}N_2 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (XLV)

C: 43,43% H: 6,78% N: 6,33 %

Mallado por nosotros:

C: 43,05% H: 7,04% N: 6,37 %

Acetato de la N,N'-diacetil-lactosilidendiamina:

Calculado para una estructura acíclica $C_{32}H_{46}O_{20}N_2$ (XLVI)

C: 49,35% H: 5,91% N: 3,59 %

Calculado para una estructura cíclica $C_{30}H_{42}O_{18}N_2 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (XLVII)

C: 49,04% H: 5,99% N: 3,81 %

Hallado por nosotros:

C: 49,18% H: 5,98% N: 3,71%

N,N'-diacetil-maltosiliden-diamina:

Calculado para una estructura acíclica $C_{16}H_{30}O_{12}N_2 \cdot H_2O$ (XLVIII)

C: 41,73% H: 6,95% N: 6,08%

Calculado para una estructura cíclica: $C_{16}H_{28}O_{11}N_2 \cdot H_2O$ (XLIX)

C: 41,73% H: 6,95% N: 6,08%

Hallado por nosotros:

C: 40,86% H: 7,04% N: 6,31%

El bajo porcentaje de carbono obtenido para esta sustancia se atribuye a la imposibilidad de secarla exhaustivamente a 100°, como se hizo con las anteriores, debido a su bajo punto de fusión de 84°-86°.

Acetato de N,N'-diacetil-maltosilidendiamina:

Calculado para una estructura acíclica $C_{32}H_{46}O_{20}N_2$ (L)

C: 49,35% H: 5,91% N: 3,59%

Calculado para una estructura cíclica $C_{30}H_{42}O_{18}N_2 \cdot H_2O$ (LI)

C: 49,04% H: 5,99% N: 3,81%

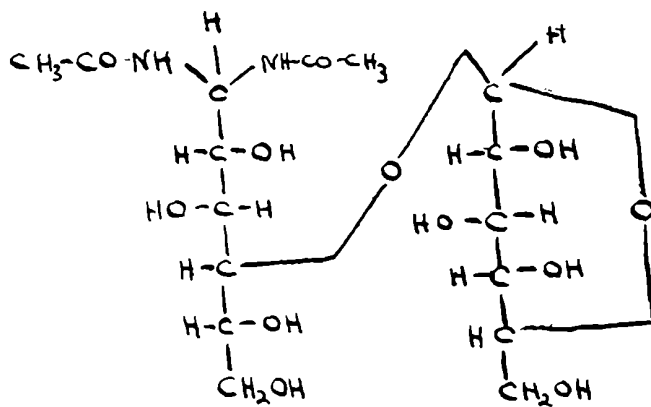
Hallado por nosotros:

C: 48,90% H: 6,00% N: 3,82%

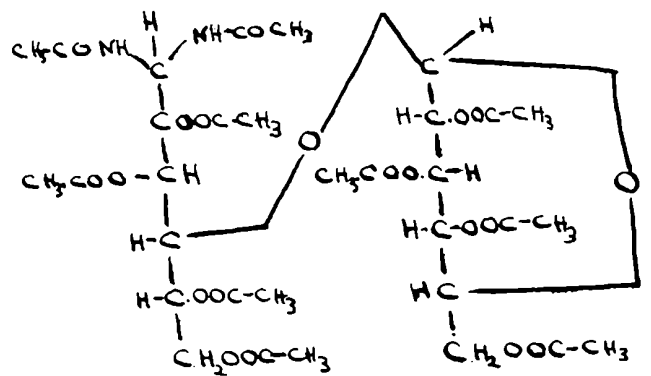
Ante las dos alternativas estructurales mencionadas, hemos preferido, para la interpretación de nuestros análisis, elegir la correspondiente a una estructura acícli-

ca, criterio que coincide con el seguido en los estudios realizados en el campo de los monosacáridos.

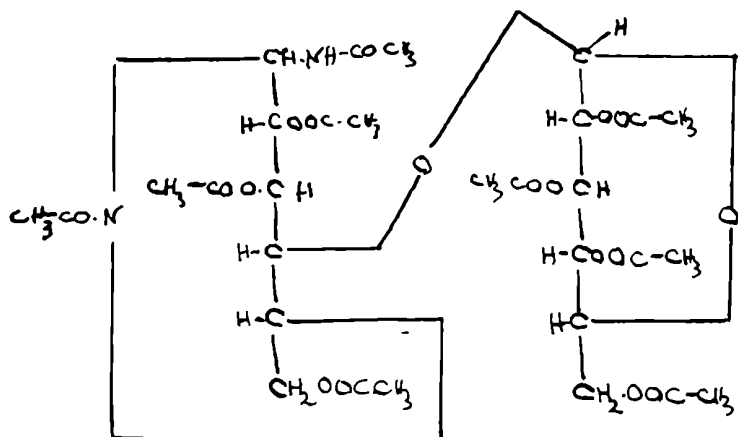
Resulta evidente la necesidad de estudios estructurales que aporten una evidencia concreta acerca de la verdadera estructura de estas sustancias. Hasta que dichos estudios se realicen adoptaremos las fórmulas previas (XLI) y (XLII) para la \hat{N},\hat{N}° -diacetil-celobiosiliden-diamina y la octa-O-acetil- \hat{N},\hat{N}° -diacetil-celobiosilidendiamina; las (XLIV) y (XLVI) para la \hat{N},\hat{N}° -diacetil,lactosiliden-diamina y la octa-O-acetil- \hat{N},\hat{N}° -diacetil-lactosiliden-diamina; las (XLVIII) y (L) para la \hat{N},\hat{N}° -maltosiliden-diamina y la octa-O-acetil- \hat{N},\hat{N}° -maltosiliden-diamina.



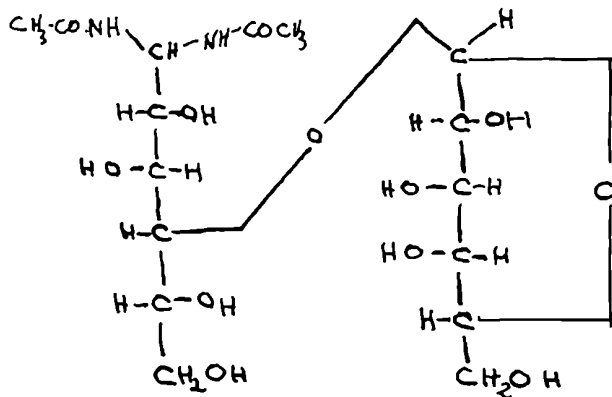
XLI



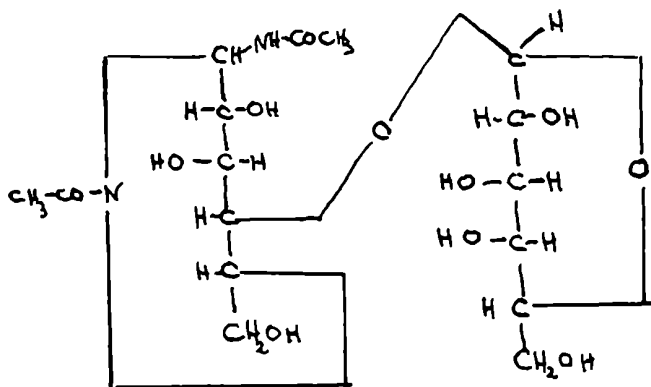
XLII



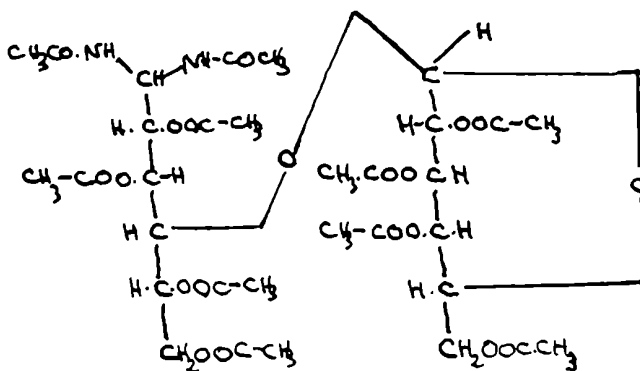
XLIII



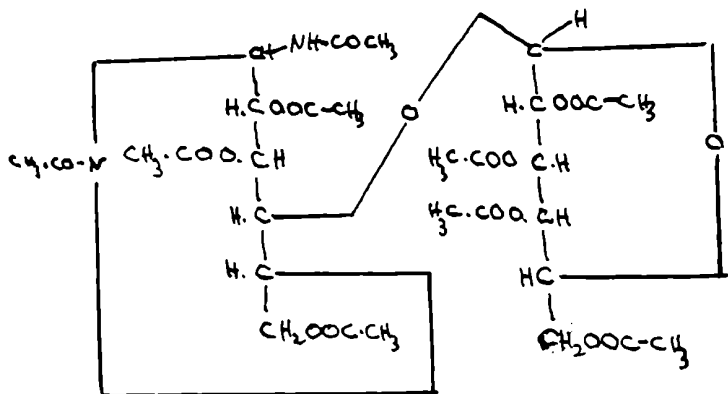
XLIV



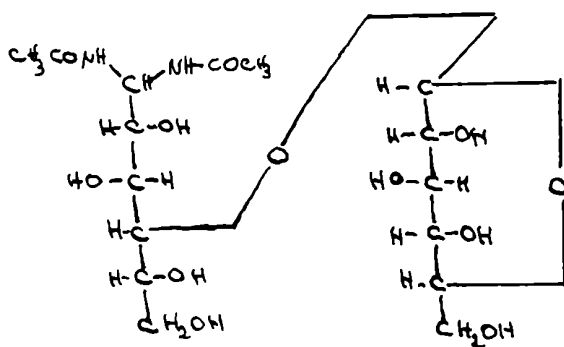
XLV



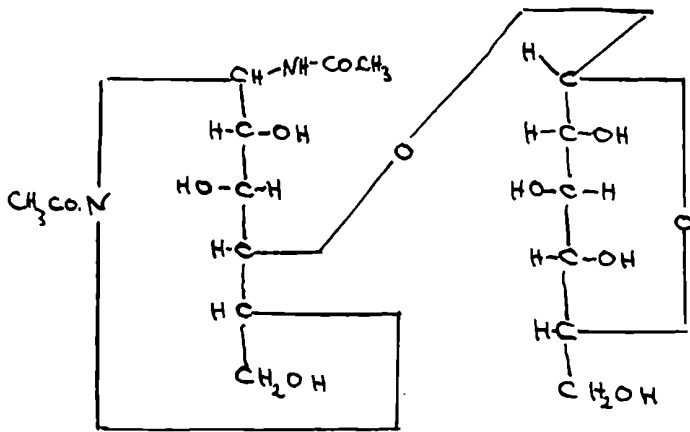
XLVI



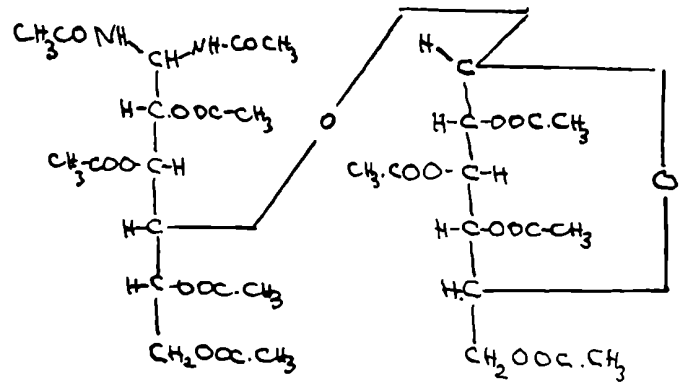
XLVII



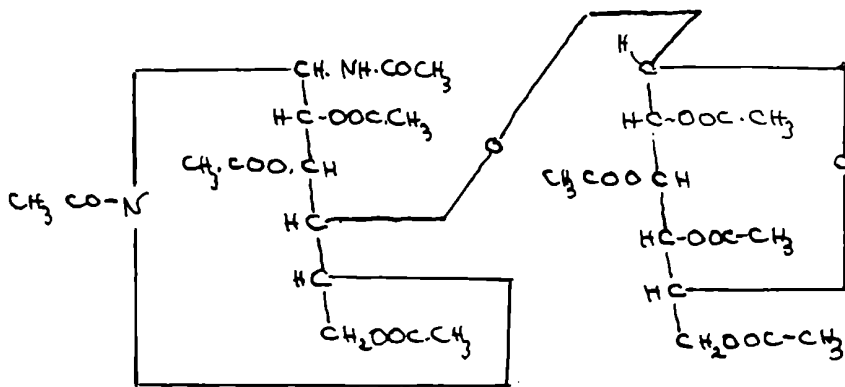
XLVIII



XLIX



L



LI

C.- Influencias estereoisoméricas.

Para finalizar esta discusión trataremos de ver en qué medida los resultados de nuestras experiencias pueden con-
testar los interrogantes planteados en la página 25.

a) Influencia del voluminoso sustituyente en el carbono 4 de la parte reductora del disacárido.

El hecho sobresaliente en lo que a este punto se refiere es el de que la glucosa sustituida por un resto glucopiranosídico en el carbono 4 de una diamida. Esto se puede atribuir:

- 1o. A que la posición 4 está bloqueada impidiendo la formación de un N-acetil-glucofuranosílderivado.
- 2o. A que la presencia de un resto de hidrato de carbono influye de una manera especial.
- 3o. A la influencia conjunta de los dos factores mencionados.

El aclarar cual de estos factores es el responsable de la formación de una diamida de la glucosa implica forzosamente la realización de nuevas experiencias. Esto significa:

- 1o. Realizar la amonólisis con una glucosa acetilada, 4-O-sustituida por un resto resistente a las condiciones experimentales impuestas.
- 2o. Realizar la amonólisis de un disacárido acetilado en el que el resto no reductor está fijado en una posi-

ción distinta de la 4.

- b) De qué manera afecta el curso de la reacción la configuración del monosacárido fijado en el carbono 4 de la mitad reductora.

Las experiencias con la β -octaacetilcelobiosa y con la β -octaacetil-lactosa indican que el cambio de un resto glucosa por un resto galactosa provoca una diferencia en el rendimiento de la reacción, que de 4,9 % pasa a 9,6 %. Si bien se ha seguido para ambos azúcares técnicas diferentes de aislamiento (para el primero se usó una técnica de acetilación y para el segundo una técnica de aislamiento directo) de la lectura de la parte experimental correspondiente a la β -octaacetil-lactosa no queda ninguna duda acerca del aislamiento prácticamente total de la N-N'-diacetil-celobiosiliden diamina, sustancia que cristaliza muy fácilmente. Además se presentan algunas diferencias que indican que el curso de la amolisis de la β -octaacetil-lactosa se asemeja más al de la α -octaacetilcelobiosa que al de la β -octaacetilcelobiosa como con la analogía de rendimientos, más estrecha y la formación de monoamidas en el carbono 1.

- c) Influencia de la configuración glucosídica:

La experiencia con la β -octaacetilcelobiosa y la β -octaacetilmaltosa, en las que se ha introducido una única variación, que es la configuración glucosídica β en el primer caso y α en el segundo indica diferencias marcadas en lo que respecta a la dificultad de cristalización y al carácter altamente higroscópico que posean los derivados de las maltosa. Este hecho obligó a

usar una técnica más elaborada lo que no permite determinar si la gran disminución del rendimiento producido en el caso de la maltosa se debe exclusivamente al factor esterequímico.

- d) Importancia de la configuración anómérica del disacárido del cual se parte:

Se realizó una experiencia comparativa entre la α -octaacetilcelobiosa y la β -octaacetilcelobiosa, empleando en ambos casos la misma técnica de acetilación. Se obtuvo así un mismo acetato de N, N'-diacetilcelobiosilidenediamina, y en base a él se calculó el rendimiento de la diamina siendo de 9,4 para la forma β y de 3,7 % para la forma α , lo que indicaría que en el caso de los disacáridos la configuración α o β tiene influencia en el rendimiento de la reacción.

Resumen:

- a) Se hace un estudio comparativo de las experiencias de Zechmeister y Toth (40) con la octaacetilcelobiosa y amoníaco líquido en tubo cerrado a 50°, de Fritz Michael y colaboradores (41) empleando amoníaco metanólico a 50° y de nuestras experiencias con amoníaco metanólico al 16 % y temperatura ambiente. De este estudio se deduce que en los rendimientos de N,N'-diacetil-celobiosilidenediamina tiene una importancia fundamental el disolvente en el que se lleva a cabo la reacción, siendo menores dichos rendimientos en medio metanólico y considerablemente mayores en ausencia de metanol. Se considera que la razón de este comportamiento puede explicarse en base a estu

dios cinéticos efectuados por Betts y Hammett (42), quienes consideran que en las amolisis en medio metanólico existen dos reacciones, una catalizada (que involucran el NH_2) y otra no catalizada (por acción directa del NH_2)

En el estudio con la β -acetilmaltosa se confirman los puntos de vista expuestos en la discusión.

- b) Se discute la hipótesis de Zechmeister y Tetl acerca de la naturaleza acíclica de la N,N' -diacetil-celobiosilidendiamina, evidenciándose que también sería factible una interpretación acíclica de las estructuras de las aldosa-amidas de disacáridos. En vista de esa posibilidad hemos preferido interpretar dichas estructuras como de carácter acíclico, según el concepto clásico que se aplica en el caso de las aldosa-amidas de monosacáridos, hasta que hechos experimentales concretos demuestren la exacta estructura de esas sustancias.
- c) Se discuten las causas posibles a que puede atribuirse la formación de una diamida en la mitad reductora "glucosa" de los disacáridos estudiados, hecho interesante ya que en la amolisis de la glucosa pentaacetilada (13) y (30) solo se produce una N -acetil- D -glucofuranosilamina.

PAGE EXPERIMENTAL

LA ACCION DEL ANONIACO SOBRE LA α -OCTAACETILCELOBIOSA

Preparación de la α -octaacetilcelobiosa.

Se siguió la técnica de G. Braun (26). La mezcla consistió en agregar un total de 100 g. de algodón, en porciones de 20 g, a una mezcla de 400 cc. de anhídrido acético y 36 cc. de ácido sulfúrico, enfriada previamente a -10° y colocada en un frasco de boca ancha, esmerilada de un litro de capacidad.

Después de cada agregado de algodón, la mezcla se empastó con una varilla gruesa llevando su temperatura hasta 45° en baño de María. Después de ser trabajada durante unos 20 minutos de esa manera, la mezcla se hace lo suficientemente liviana como para permitir el agregado de nuevas porciones de algodón, agregado que siempre se hizo a temperatura no mayor de 50° .

Después de haber agregado los 100 g. de algodón, se calentó a 50° durante una hora, obteniéndose así una solución de color castaño, que se dejó siete días en estufa a 35° . Al cabo de ese lapso se volcó la mezcla sobre 20 litros de agua fría, se dejó 24 h. en contacto agitando frecuentemente y finalmente se filtró y lavó con agua fría hasta eliminar la acidez. Rend. 93 g.

Este producto bruto se disolvió en 250 cc. de metanol hirviendo y por enfriamiento precipitaron 70 g. de α -octaacetilcelobiosa. El producto bruto así obtenido se purificó por disolución en 300 cc. de cloroformo, agregado de carbón Darco G 60 y filtrado a través de un Buchner conteniendo un lecho de filtercel humedecido con metanol. Se lavó

después el embudo con 100 cc de cloroformo y la solución se concentró hasta un volumen de aproximadamente 250 cc.

A esta solución se le agregaron 750 cc de alcohol metílico caliente y por enfriamiento a 0° se obtuvieron 66 g de α -octaacetilcelobiosa que se purificaron una vez más por este procedimiento dando un punto de fusión de 224-226°. Rendimiento 60 g.

Reacción del amoníaco con la α -octaacetilcelobiosa.

I - Aislamiento de celobiosa.

20 g. de α -octaacetilcelobiosa se suspendieron en 500 ml de amoníaco metanólico y se agitaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, hasta disolución total. Después de 24 h. se evaporó la solución a presión reducida y a temperatura menor de 50°, hasta un volumen de 200 ml. por estacionamiento a temperatura ambiente durante tres días y raspado frecuente de las paredes del recipiente se obtuvieron 6,950 g. de cristales de celobiosa de p.f. 225-226°, la que recristalizada dió un p.f. 234-236°. Penilosazona p.f. 200°. Se cromatografió en papel Whatman No. 1, usando como solvente una mezcla de acetato de etilo-piridina-agua en la proporción 10:4:3 y empleando como revelador el reactivo de nitrato de plata-metóxido de sodio que se describe en esta tesis. Se observó así una única mancha de R_f 0,89 a 25° empleando glucosa como standard. Se preparó además su β -octaacetato según una técnica que se describirá más adelante.

El alcohol madre del que cristalizó la celobiosa se evaporó a presión reducida hasta sequedad y luego en desecador hasta obtener un sólido pulverulento. Este pol-

vo amorfo e higroscópico se extrajo cinco veces con 50 ml de acetato de etilo hirviente cada vez y se volvió a secar exhaustivamente. Se disolvió luego en 20 ml de metanol y se dejó evaporar espontáneamente a temperatura ambiente durante dos semanas, efectuando periódicamente filtración del sólido que precipitaba; se obtuvo así 1 g más de celobiosa, la cual, recristalizada, dió un p.f. 234-236°.

La solución metanólica se evaporó nuevamente hasta obtener un sólido pulverulento que se trató cinco veces 20 ml. de acetato de etilo cada vez en caliente. Se secó nuevamente al vacío se disolvió en 50 ml. de agua y se pasó por una columna de resina carboxílica Amberlite IR C-50 con una velocidad aproximada de una gota cada 15 segundos.

A continuación se eluyó con 4 litros de agua destilada que se evaporaron a presión reducida hasta sequedad. Luego se completó el secado en desecador al vacío agregando poco metanol y finalmente se llevó hasta consistencia pulverulenta tratando con un ml. de acetato de etilo y secado durante 24 h. al vacío.

Este sólido se disolvió en 40 ml. de metanol y de esta solución precipitaron 938 mg. de p.f. 228-230°, que recristalizados dieron un p.f. de 234°-236°. El filtrado se secó exhaustivamente y se extrajo con 40 ml de acetato de etilo hirviente. (Rendimiento total de celobiosa 89,3%).

$[\alpha]_D^{25} + 26,7^\circ$ (H₂O; \pm los 30 min.) ($\alpha + 2,33^\circ$; L: 4 dm; p: 0,1079 g; v: 5 ml)

$[\alpha]_D^{25} + 34,7^\circ$ (H₂O; valor final) ($\alpha + 3^\circ$; L: 4 dm; p: 0,1079 g; v: 5 ml)

Feniloxazona de la celobiosa obtenida

160 mg. del producto cristalino de p.f. 234-236° se disolvieron en 1,8 ml de agua. Por otra parte se preparó una solución de 0,12 ml de fenilhidrazina y 0,18 ml de

acético glacial en 0,6 ml de agua. Se mezclaron ambas soluciones y se mantuvo la mezcla en baño de María durante 45 minutos. Se dejó en reposo 6 h. al cabo de las cuales se filtraron 100 mg. de cristales de p.f. 195-198°. Se recrystalizaron de etanol obteniéndose un p.f. de 200°. Un punto de fusión mezcla con una muestra pura de fenilosazona no dió depresión.

II.- Aislamiento de la N,N'-dicetilcolchicilosilidendiamina

El jarabe obtenido después de separar la celobiosa, se secó en desecador al vacío durante 24 h. se disolvió en 100 ml de agua destilada y se pasó esta solución a través de 750 ml de una resina sulfónica Amberlite IN-120. Se eluyó con 6 litros de agua destilada, que se evaporaron hasta sequedad completa. El residuo se disolvió en 6 ml de metanol y se dejó a temperatura ambiente raspando frecuentemente. Precipitaron así 500 mg de un producto cristalino de p.f. 105-112°. Se recrystalizaron en 12 ml de etanol y la solución límpida se dejó en reposo sin agitar durante 24 h. Se obtuvieron 392 mg de agujas finas de p.f. 112-114°, que se recrystalizaron dos veces más de 4 ml de etanol cada vez, obteniéndose finalmente 278 mg. de p.f. 113-115°. En estas recrystalizaciones de etanol que se tuvo siempre la precaución de no raspar la solución, pues de lo contrario en lugar de un producto cristalino se obtiene un polvo amorfo muy higroscópico. Rendimiento 3,7 %; $[\alpha]_D^{25}$ -23,3° (α -0,13; L: 8dm; p: 0,01g; v: 3,94ml) (H₂O)

Análisis (sobre muestra secada a 100° al vacío).

Análisis (sobre muestra secada a 100° al vacío).

Calculado para $C_{16}H_{30}O_{12}N_2 \cdot H_2O$: C: 41,73%; H: 6,95%; N: 6,08%;

Hallado : C: 41,91%; H: 6,88%; N: 6,02%;

III.- Preparación de la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-calobiosilidenciamina.

A una suspensión hirviente de anhídrido acético (1 ml) y acetato de sodio (40 mg) se añadieron 50 mg. de N,N'-diacetil-calobiosilidenciamina. Se hirvió 2 minutos y se dejó media hora en baño de agua hirviente. Se enfrió la solución límpida y se volcó sobre 20 g. de una mezcla de agua y hielo. Se agitó y dejó 24 h. en reposo. Se extrajo cinco veces con 20 ml de cloroformo y este extracto cloroformico se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua. Se evaporó el cloroformo hasta sequedad y después en desecador al vacío. Se obtuvieron 97 mg (Rend. 71%) de producto bruto que se reocrystalizaron en 1 ml de agua. Se obtuvieron así 60 mg de un producto que ablanda a 140° y funde a 195-196°.

$[\alpha]_D^{25} + 6,6^\circ$ (CHCl₃) (α : 0,025; L: 2 dm; p: 0,0074 g; v: 3,94 ml).

Análisis (sobre muestra secada a 120° al vacío)

Calculado para: $C_{32}H_{46}O_{20}N_2$: C: 49,35%; H: 5,91%; N: 3,59%;

Hallado: C: 48,70%; H: 6,29%; N: 3,69%;

IV.- Acetilación del jarabe residual de la obtención de N-N'- diacetil-celobiosilidindiamina.

La solución metanólica de la cual precipité la N-N'-diacetil-celobiosilidindiamina, se evaporó hasta sequedad completa del modo ya descrito. El residuo pulverulento pesó 450 mg y se acetiló disolviéndolo en 12 ml de una mezcla de anhídrido acético-piridina (1:1). Se disolvió todo a ebullición y se dejó 24 h. a temperatura ambiente. Después de ese lapso se mantuvo la mezcla acetilante durante 40 minutos en baño de agua hirviendo. Se enfrió y luego se volcó sobre 100 gr de una mezcla de agua-hielo. Después de dejar 24 h en reposo, se obtuvieron 285 mg de producto bruto que denominamos fracción I de acetatos. El líquido acuoso se extrajo 6 veces con 20 ml de cloroformo y se lavó este extracto con $\text{SO}_4\text{H}_2\text{EN}$, con solución saturada de bicarbonato de sodio, con agua y finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro durante 24 h, al cabo de las cuales se evaporó a presión reducida hasta sequedad y luego en desecador durante 24 h. El residuo bruto se denominó fracción II de acetatos.

V.- Estudio de la fracción I de acetatos.

Los 285 mg de producto bruto de recristalización de etanol, obteniéndose 250 mg de un producto cristalino de p.f. 230-233°.

Este producto fue cromatografiado en una columna de talco -Celite 503, en la proporción de 5:1 y cuyas dimensiones fueron de 220 mm por 30 mm. de sustancia activa. Para ello se disolvieron los 250 mg del acetato en una mezcla de 7 ml de cloroformo y 5 ml de benceno.

Este acetato es poco soluble en benceno: recri-
stalizaciones en este disolvente elevan el punto de fusión hasta
238° pero no se logra una purificación total.

La columna fué armada agregando la mezcla seca y
previamente pulverizada. Se cargó sin aplicar succión al co-
mienzo y asentando el adsorbente mediante golpes suaves en la
boca del tubo cromatográfico. Una vez lleno éste se aplicó suc-
ción, con lo que la longitud de la columna activa disminuyó,
se volvió entonces a efectuar agregados de mezcla hasta llegar
a la longitud mencionada. Finalmente se comprimió con un vásti-
go cilíndrico de diámetro adecuado mientras se aplicaba succión.
Cargada de esta manera, la columna no experimenta alteraciones
durante la experiencia.

Se mojó la parte superior de la columna con 10
ml de benceno y se agregó la solución de acetatos. La elución
se efectuó pasando primeramente una mezcla de benceno-etanol
absoluto en la relación de 100: 0,25 v/v. Se recogieron 11
fracciones de 10 ml cada una, que se evaporaron separadamente.
Las nueve primeras dieron un residuo blanco que se disolvió
en poco etanol y se reunió en una misma fracción Ia.

A continuación se pasaron 100 ml de una mezcla
de benceno-etanol absoluto 100: 1 v/v.

Separaron 10 fracciones de 10 ml cada una, cu-
ya evaporación no dejó residuo apreciable.

Se pasaron seguidamente 300 ml de benceno-eta-
nol absoluto 100: 3 v/v, que evaporados dieron un residuo Ib

Del tubo correspondiente a la fracción Ia, se
obtuvieron 115 mg. de agujas de p.f. 220°, después de tres
recristalizaciones en etanol se obtuvieron 80 mg. de p.f. de

224-225° (abl. 220°); $[\alpha]_D^{24} + 42,6^\circ$ (CHCl₃) (α $\pm 0,44^\circ$
L: 2 dm ; p: 0,015 g; v: 2,91 ml), que se identificó como
 α - octaacetilcelobiosa.

Del tubo correspondiente a la fracción Ib, se obtuvieron 100 mg de agujas de una hepta-O-acetil-N-acetil-celobiosilamina, lo que corresponde teóricamente a 56 mg. de N-acetil-celobiosilamina (rend. 0,60%). Este acetato recristalizado tres veces de 5 ml de etanol cada vez dió 72 mg. de p.f. 242-243°; $[\alpha]_D^{27} + 54,09^\circ$ (CHCl₃) (α $\pm 0,31$; L: 2 dm; p: 0,0113; v: 3,94 ml.).

Análisis:

Calculado para: C₂₈ H₃₉ O₁₈ N C: 49,61% H: 5,80%; N: 2,07%;

Hallado: C: 49,58%; H: 5,80%; N: 2,37%;

VI- Amonólisis de la hepta-O-acetil-N-acetil-celobiosilamina obtenida.

170 mg. de la hepta-O-acetil-N-acetil-celobiosilamina obtenida se disolvieron en 5 ml de amoníaco metálico por agitación durante 5 minutos. Después de dejar a temperatura ambiente durante 24 h, la solución fue evaporada hasta sequedad. El residuo fue extraído cuatro veces con tres ml. de acetato de etilo tibio cada vez y se secó nuevamente en desecador.

El residuo siruposo no se pudo cristalizar de etanol de 96°, ni de etanol absoluto ni de isopropanol. Tampoco de mezclas de los anteriores con éter etílico. Se cromatografió en papel Whatman No. 1, empleando como solvente

una mezcla de acetato de etilo; piridina; agua (10:4:3).

Por revelado con nitrato de plata-metóxido de azúcar se observó una única mancha cuyo R_f glucosa a 25° fue de 0,95. Con el reactivo de ácido pícrico-metóxido de sodio no pudo detectarse ninguna mancha, por lo que se deduce que la sustancia cromatografiada es no reductora.

VII.- Estudio de la fracción II de acetatos.

El residuo correspondiente a esta fracción, bien seco, se tomó con 3 ml de agua hirviente y por enfriamiento se obtuvieron 90 mg. de p.f. 138-140°. Después de una recristalización en agua se obtuvo un p.f. 195-196°, con ablandamiento a 140°. Un punto de fusión mezcla con la octa-O-acetil-N-N'-diacetil-celobiosilidendiamina anteriormente descrita no dió depresión.

-.-

Al comienzo de nuestros estudios sobre esta reacción, seguimos una técnica de acetilación directa que nos permitió aislar esta sustancia más rápidamente. Dicha técnica fue la siguiente:

20 g de α -octaacetil-celobiosa se disolvieron en 500 ml de amoníaco metanólico por agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. A las 24 h. se evaporó la solución hasta un volumen de 200 ml., a presión reducida y se dejó evaporar espontáneamente a temperatura ambiente durante una semana. Precipitaron así 6,600 g. de celobiosa de

p.f. 225-226°, que se identificaron en forma similar a la anteriormente descrita para esta sustancia.

La solución metanólica se evaporó hasta sequedad y se extrajo varias veces con acetato de etilo hirviendo, empleando un total de 150 ml. Se secó en desecador durante 24 h. y el producto pulverulento obtenido pesó 2,280 gr. Este se acetiló disolviéndolo en 60 ml. de una mezcla 1:1 de anhídrido acético-piridina. Se dejó 24 h. en reposo y se volcó sobre 100 g. de agua-hielo.

A las 24 h. se filtró un sólido que pesó 1,150 g. (constituído por una mezcla de α -octaacetil-celobiosa y la fracción I de acetatos antes descripta). La solución acuoso-piridina-acética se extrajo varias veces con cloroformo, empleando un total de 200 ml. Estos extractos se lavaron en la forma usual y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Se evaporó la solución clorofórmica y se obtuvo un acetato bruto que pesó 1,00 g. Por disolución en alcohol absoluto se obtuvieron 120 mg de cristales de p.f. 226-228° (que son análogos a la fracción I de acetatos ya descripta. La solución remanente se evaporó hasta sequedad y el residuo, constituído practicamente por la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina, se purificó por pasaje a través de una columna de talco-celite 503 (5:1) de 220 mm. por 30 mm. de sustancia activa.

Se disolvieron 500 mg. del producto en una mezcla de 2 ml de cloroformo y 3 ml. de benceno. La parte superior de la columna se mojó previamente con 10 ml. de benceno. Se eluyó con una mezcla de benceno: etanol absoluto 100 : 0,1 v/v. y se recogieron trece fracciones de 20 ml. cada una, que se evaporaron separadamente. Desde la tercera hag

ta la undécima se observó la aparición de un precipitado por evaporación. Estos precipitados se tomaron con poco etanol, se juntaron en un tubo y se dejaron evaporar en desecador a presión reducida. Se obtuvieron 24 mg. de p.f. 220-225°.

Posteriormente se pasó por la columna una mezcla 100: 1 v/v de benceno-etanol absoluto la que no dió residuo apreciable. Finalmente se pasó una mezcla de benceno: etanol absoluto 100: 5 v/v hasta que no se obtuvo más residuo por evaporación de la fracción correspondiente. La elución de este último acetato se puede realizar también con una proporción de benceno-etanol absoluto de 100 : 2 v/v, pero el procedimiento requiere mayor volumen de eluyente.

Los precipitados obtenidos por evaporación de cada fracción de 20 ml. correspondiente a esta última elución, se tomaron con poco etanol y se evaporaron separadamente, obteniéndose de cada fracción residuos cristalinos de puntos de fusión coincidentes. Se recrystalizaron dos veces de etanol y una vez de agua, p.f. 194-195° con ablandamiento a 140°. Punto de fusión mezcla con la sustancia obtenida en (III) no dió depresión.

Rendimiento de N,N'-diacetil-celobiosilidenediamina en base a 880 mg de acetato bruto obtenido: 373 mg (3%).

porada bajo presión reducida y después de desecador al vacío; el residuo fué extraído cinco veces con 3 ml. de acetato de etilo tibie cada vez. Una vez seco, el residuo amorfo fué disuelto en 10 ml de etanol absoluto y se dejó evaporar espontáneamente a temperatura ambiente, raspando frecuentemente.

De esta manera se obtuvieron agujas largas que se fueron separando por filtración a medida que precipitaban. Se obtuvieron así 130 mg. de p.f. 111-115°. Rendimiento 73,4%.

100 mg. de este producto se disolvieron en 3 ml. de etanol absoluto y se filtraron en caliente. El filtrado se dejó 24 h. en reposo, a temperatura ambiente, sin raspar ni agitar. Cristalizaron 62 mg. de agujas de p.f. 110-112°. Se recristalizó dos veces más de la misma manera obteniéndose finalmente 43 mg. de N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina de p.f. 113-115°. El punto de fusión mezcla con una muestra del producto obtenida en (II) no dió depresión. Una cromatografía en papel Whatman No. 1 y empleando una mezcla de butanol: etanol: agua (50:10:40) a 25 ° dió un $R_{glucosa}$: 0,46 coincidente con el de un testigo de N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina obtenido en (II).-

LA REACCIÓN DE LA β -OCTAACETILCELOBIOSA CON AMONÍACO
METANÓLICO

I.- Aislamiento de celobiosa:

6,300 g. de β -octaacetilcelobiosa se suspendieron en 160 ml. de amoníaco metanólico al 16 % y se agitó la mezcla hasta disolución total. Se dejó 24 h a temperatura ambiente y se evaporó la solución a presión reducida hasta un volumen de 80 ml. Se dejó 24 h a temperatura ambiente filtrándose después de ese lapso 2,050 g de celobiosa de p.f. 234-236°. El filtrado se evaporó hasta sequedad a presión reducida y luego en desecador al vacío. Se extrajo 5 veces con un total de 120 ml de acetato de etilo tibio, se secó nuevamente y se disolvió en metanol obteniéndose otros 156 mg. de celobiosa. Total de celobiosa obtenida: 2,206 g; rend. 71 %.

La celobiosa se identificó cromatográficamente corriendo en papel Whatman No. 1, y con una mezcla de n-butanol-etanol-agua (5:1:4) fase superior y corriendo simultáneamente con un testigo de celobiosa.

II.- Aislamiento de la N,N'-diacetil-celobiosiliden diamina como acetato.

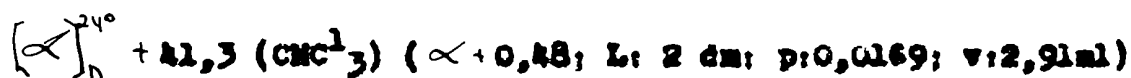
El residuo siruposo (1,7g) obtenido después de haber separado la celobiosa, se disolvió en una mezcla de 20 ml de anhídrido acético y 20 ml de piridina. Se dejó 24 h a temperatura ambiente y se volcó sobre 200 g. de agua helada. A las 24 h. se filtró un sólido amorfo (I) que pesó 650 mg.

El filtrado se extrajo siete veces con un total de 350 ml de cloroformo. El extracto cloroformico se lavó con ácido sulfúrico 2N, luego con solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua. Se secó 24 h. sobre sulfato de sodio anhidro.

Este extracto cloroformico por evaporación a presión reducida dió un jarabe que se disolvió en poco etanol. Se dejó 24 h. en la baladera, obteniéndose 440 mg de p.f. 138° El alcohol madre dió posteriormente, por evaporación a temperatura ambiente 56 mg más de este acetato, de p.f. 134-136°. El filtrado se secó exhaustivamente y se disolvió en 2 ml de benceno. Se dejó 24 h. a temperatura ambiente y se filtraron 131 mg. de p.f. 133°. El total de acetato de N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina bruto obtenido fué de 627 mg, lo que teóricamente corresponde a 370 mg. de la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina; rendimiento 9,4 %. El punto de fusión y el punto de fusión mezcla de este acetato recristalizado de esta mol fué de 139°-140°.



El sólido amorfo, (I) se recristalizó en etanol obteniéndose 160 mg. de un sólido cristalino que después de dos recristalizaciones dió un punto de fusión y un punto de fusión mezcla con la α -octaacetilcelobiosa de 224-226°.



Las aguas madres dieron 100 mg. de un producto que después de varias recristalizaciones en agua fundía a 176° y que aún no ha sido identificado.

$$[\alpha]_D^{24} + 7,3^\circ \text{ (CHCl}_3\text{)} (\alpha + 0,05; L; 2 \text{ dm}; p; 0,0099\text{g}; v; 2,9\text{ml})$$

III.- Amplificación del beta-O-acetil-N,N'-diacetil-celobiosilididiamina.

230 mg del acetato de N,N'-diacetilcelobiosilididiamina se disolvieron en 7 ml de amoníaco metálico al 18 % y se dejó 24 h. a temperatura ambiente. Se evaporó hasta sequedad a presión reducida. Se extrajo tres veces con un total de 12 ml. de acetato de etilo y se secó nuevamente. Se redisolvió en 7 ml de etanol de 95°. Esta solución por raspado frecuente de las paredes del tubo al cabo de varios días a temperatura ambiente dió 61 mg. de p.f. 113°. Se re-cristalizó varias veces del mismo disolvente obteniéndose un punto de fusión y un punto de fusión mezcla con N,N'-diacetilcelobiosilididiamina de 113-115°.

$$[\alpha]_D^{24} -21,4^\circ \text{ (H}_2\text{O)} (\alpha - 0,19; L; 2 \text{ dm}; p; 0,0129\text{g}; v; 2,9\text{ml})$$

ESTUDIO DE LA ACCION DEL AMONIACO METANOLICO SOBRE LA

β -OCTA-ACETIL-LACTOSA

Para la preparaci3n de la β - octaacetil-lactosa se sigui3 la siguiente t3cnica (modificaci3n de la de C. S. Hudson y J. Johnson J. Am. Chem. Soc. XL, 1270, (1915)). En un Erlenmeyer de 500 ml de capacidad se calent3 a ebullici3n una mezcla de 300 ml de anh3rido ac3tico y 12 g de acetato de sodio a la que se le fu3 agregando lentamente y en porciones 25 g. de lactosa seca. Despu3s de calentar 4 h en ba3o de Mar3a a 100°, se volc3 sobre 700 ml de agua helada. Se obtuvo as3 un jarabe que se dej3 bajo agua durante 24 h. Al cabo de ese lapso se decant3 el agua y se agregaron nuevas porciones de agua fr3a agitando vigorosamente con varilla y decantando. Se obtuvo as3 un s3lido pulverulento que se filtr3 y lav3 con agua. Se sec3 en desecador al v3o. El producto bruto se disolvi3 en 35 ml de etanol de 98%. y se filtr3 en caliente. Por enfriamiento cristalizaron 30 g de β - octaacetil-lactosa de p.f. 87-89°. , posteriores recriсталizaciones no elevaron sensiblemente el p.f. Rendimiento 60,6 %.

Reacci3n del amoniaco metan3lico sobre la β - octaacetil-lactosa.

I.- Aislamiento de lactosa:

20 g. de β - octaacetil-lactosa se suspendieron en 500 ml de amoniaco metan3lico (al 16 %) y se agitaron durante 5 minutos, hasta disoluci3n total. Despu3s de 24 h. a temperatura ambiente se evapor3 la soluci3n a presi3n redu

cida y a temperatura menor de 60° hasta un volumen de 150 ml. Se dejó 48 h. en la heladera y por raspado precipitaron 4,710 g. de un producto cristalino de p.f. 210-212°. Por evaporación espontánea del filtrado se obtuvieron 546 mg. de cristales de p.f. 210-212°. La recrystalización de esta sustancia de una mezcla de etanol-agua, dió un producto que fundió a 222-224°. Una cromatografía en papel y con testigo de lactosa pura de - mostró que se trataba de lactosa. Su acetato, preparado según la técnica anterior fundió a 86-89° Su fenilasazona fundió a 198-199°.

El alcohol madre del cual se aisló la lactosa se evaporó a presión reducida hasta sequedad y luego en desecador al vacío. Se eliminó la acetamida extrayendo con 20 ml cada vez de acetato de etilo hirviente, se secó nuevamente al vacío y se disolvió en 30 ml. de metanol. Precipitaron 150 mg de lactosa de p.f. 223-224°. El líquido se diluyó con 70 ml de agua destilada y se pasó por una columna conteniendo 500 ml de una resina carboxilica Amberlite IR C-50, con una velocidad de una gota cada 12 segundos. Se eluyó con tres litros de agua destilada, que se evaporaron hasta sequedad bajo la presión reducida. Finalmente el residuo se transformó en un sólido pulverulento tratándolo en tibio con 2 ml de acetato de etilo y secando al vacío durante 24 h. Este sólido amorfo, higroscópico, se disolvió en 20 ml de metanol y se filtraron 1,230 g. de lactosa de p.f. 222-224°. Se evaporó nuevamente hasta sequedad y se extrajo nuevamente con un total de 60 ml de acetato de etilo. El residuo bien seco se disolvió en 30 ml de metanol y se dejó evaporar espontáneamente durante tres días. Se filtraron nuevamente 500 mg.

de lactosa de p.f. 222-224°. El total de lactosa obtenida fue de 7,1 g (Rend. 71 %).

$[\alpha]_D^{24,5} + 52,8^\circ$ (H₂O ; valor final) ($\alpha + 292^\circ$; L : 4 dm ; ρ : 90691 g ; v : 5 ml)

Fenilosazona de la lactosa obtenida

80 mg. del producto de p.f. 222-224°, se disolvieron en 0,8 ml de agua. Por otra parte se preparó una solución de 0,08 ml de fenilhidrazina y 0,08 ml de ácido acético glacial en 0,3 ml de agua. Se mezclaron ambas soluciones y la mezcla se calentó en baño de María hirviendo durante 1 1/2 h. La solución se dejó 20 h. en heladera, el producto cristalino obtenido se lavó varias veces con agua, por decantación y finalmente se filtraron 65 mg de p. f. 198-199°. Un punto de fusión mezcla con una muestra de fenilosazona de lactosa pura no dió depresión.

II.- Aislamiento de la N,N'-diacetil-lactosilidindianina.

Las aguas madres, de las que se obtuvo la lactosa, se diluyeron con agua hasta un volumen de 200 ml y se pasó a través de un volumen de un litro de resina sulfónica Amberlite[®] 120.

Se eluyó con 6 litros de agua destilada y este eluido se evaporó hasta sequedad completa. Se secó exhaustivamente en la forma ya descrita y el residuo pulverulento así obtenido se disolvió en 8 ml de metanol. Por evaporación espontánea a temperatura ambiente y raspado de las paredes del tubo se obtuvieron 643 mg de p.f. 110-118°, que se redisolvió en 6 ml de metanol absoluto quedando un insoluble de 37 mg de lactosa. El metanol se evaporó hasta sequedad y el residuo se redisolvió en 35 ml de etanol. Se dejó 24 h. en

heladera y se obtuvieron 560 mg de agujas que fundieron a 112°. Después de dos recristalizaciones más, se obtuvieron 460 mg de p.f. 114-116°. Rendimiento 4,6 % $[\alpha]_D^{25} -14,8^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ (α -0,16; L: 4 dm; p: 0,0135 g; v: 5 ml).

Análisis (sobre muestra secada a 100° al vacío)

Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_{12}\text{N}_2$: C: 43,43%; H:6,78%; N:6,33%

Hallado: C: 43,05%; H:7,04%; N:6,37%

III.- Preparación de la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-lactosilidendiamina:

A una mezcla hirviente de 3 ml de anhídrido acético y 200 mg de acetato de sodio, se añadieron lentamente 250 mg. de la N,N'-diacetil-celobiosiliden-diamina. Al finalizar el agregado se hirvió durante 3 minutos y se dejó en baño de María durante 30 minutos. Se volvió inmediatamente sobre 80 g. de agua helada y se dejó 24 h. en reposo a temperatura ambiente. No se obtuvo precipitado. El líquido se extrajo 10 veces con 15 ml cada vez de cloroformo. Se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y después con agua. Se secó la solución cloroformica con sulfato de sodio anhidro, se destiló a presión reducida hasta sequedad y luego dos veces en presencia de poco metanol para eliminar el cloroformo. Se dejó 24 h. en desecador. El producto bruto obtenido pesó 460 mg(rend. 83,3%). Se trató con 15 ml de benceno a ebullición y por enfriamiento se obtuvieron 350 mg. de un sólido de p.f. 223-225°. Por repetidas recristalizaciones en etanol y en agua se obtuvieron prismas largos de

p.f. 223-225°.

$[\alpha]_D^{27} -3,94$ (CHCl₃) (α -0,02; L: 2 dm; p:0,010 g;
3,94 ml).

Análisis (sobre muestra secada a 120° y al vacío)

Calculado para C₃₂H₄₆O₂₀N₂ C: 49,35%; H: 5,91%; N: 3,59%;

Hallado: C: 49,18%; H: 5,98%; N: 3,71%;

IV.- Análisis de la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-lactosilidendianina.

400 mg de la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-lactosilidendianina se disolvieron en 10 ml de amoníaco metanólico y se dejó 24 h a temperatura ambiente. Se evaporó a sequedad al vacío y se extrajo con acetato de etilo. Se secó nuevamente y se disolvió el jarabe en 15 ml de etanol absoluto en tibio. Se dejó evaporar espontáneamente y a las 24 h se observaron cristales. Por raspado precipitaron 210 mg que ablandaron a 109° y escurrieron a 130° (Rend. 87,5%). Se redisolviéron en 4 ml de metanol y por enfriamiento precipitaron 182 mg de cristales hexagonales de p.f. 109-111°. Se recrystalizaron 100 mg en 11 ml de etanol de 95° y se obtuvieron 76 mg. de cristales prismáticos cortos de p.f. 115-116°. El punto de fusión mezcla con la N,N'-diacetil-lactosilidendianina obtenida en II, no dió depresión. Una cromatografía en papel Whatman No. 1, empleando un solvente constituido por acetato de etilo-piridina-agua (10:4:3) dió con el reactivo nitrato de plata-metóxido de sodio (pag.v 101)

una única mancha coincidente con una testigo de la N-N'-diacetil-lactosilidendiamina obtenida en II. Con el reactivo de ácido pícrico-metóxido de sodio no se produjo coloración, lo que confirma la naturaleza no reductora de esta sustancia.

V.- Aislamiento de la N-acetil - α - lactosilamina.

El jarabe residual obtenido después de haber aislado la N,N'-diacetil-lactosilidendiamina se disolvió en 8 ml de agua y se cromatografió por una columna conteniendo una mezcla de carbón Darco G-60 y Celite 503, en la proporción de 5 a 1, respectivamente. Las dimensiones de la columna activa fueron de 200 mm. por 30 mm.

Se eluyó con agua y con concentraciones crecientes de etanol en agua, recogién dose fracciones de 100ml, que se evaporaron separadamente y se cromatografiaron en papel. Se usó como revelador nitrato de plata - metóxido de sodio, juntándose las fracciones que dieron cromatogramas similares. Se recogieron 20 fracciones de agua (1 a 20), 20 fracciones de etanol 3 % (21-a-40) 20 fracciones de etanol al 5% (41-a-60), 20 fracciones de etanol al 10 % (61 a 80); 20 fracciones de etanol al 30 % (80 a 100) y finalmente se lavó la columna con 2 litros de etanol de 96 %.

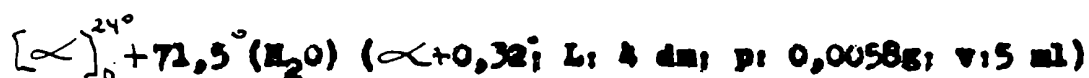
Las fracciones 1 a 41 (agua, etanol 3 %) dieron 35 mg. de un polvo amorfo e higroscópico.

Las fracciones 42 a 61 (etanol 5%) dieron un polvo amorfo e higroscópico que pesó 98 mg.

Por disolución en metanol y agregado de etanol absoluto hasta turbidez en frío se obtuvieron 50 mg. de lactosa impurificada que se reconoció por cromatografía en papel

con testigo de lactosa pura.

Las fracciones 62 a 65 dieron un polvo amorfo e higroscópico que pesó 145 mg. Se disolvió en 1 ml de metanol, se filtró y al filtrado se le agregó etanol absoluto hasta turbidez en frío. Por resgado precipitaron 85 mg de N-acetil- α -lactosilamina (rend. 0,78 %) cristalina, que fundió en un ámbito amplio. Dos recristalizaciones en etanol de 98° dieron 45 mg. de cristales prismáticos cortos y finos de p.f. 162-163°. Una cromatografía en papel Whatman No. 1 con acetato de etilo: piridina: agua (10:4:3) dió una única mancha detectable con nitrato de plata-nitrito de sodio pero no con ácido pícrico-nitrito de sodio. Su glucosa fué de 0,96.



Análisis (después de secado al vacío y a 120°)

Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_{11}\text{N} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C: 40,09%; H: 6,97% N: 3,35%

Hallado:

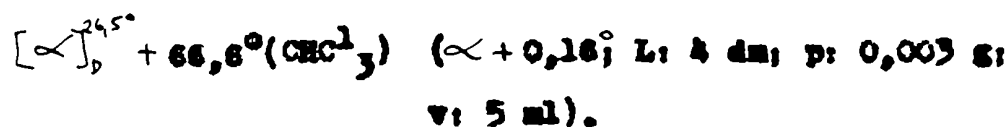
C: 40,64%; H: 6,85% N: 3,10%

Las fracciones 66 en adelante, estudiadas separadamente dieron un total de aproximadamente 100 mg. de un polvo amorfo e higroscópico que, tratado en forma similar a la descrita para las fracciones anteriores no proporcionó productos cristalinos.

VI.- Preparación de la hepta-O-acetil-N-acetil-lactosilamina.

25 mg de la N-acetil- α -lactosilamina aislada anteriormente se disolvieron en una mezcla de 0,6 ml de

piridina y 0,6 ml de anhídrido acético. Se hirvió unos minutos y se dejó 24 h a temperatura ambiente. La solución se evaporó luego en desecador al vacío, terminando su evaporación con ayuda de etanol. Se tomó con poca agua y se disolvió en caliente. Por enfriamiento se obtuvo un jarabe. Se dejó 24 h. en la heladera raspando frecuentemente. Se obtuvieron así 20 mg. de un sólido amorfo de p.f. 181-183°.



Este acetato resultó idéntico al obtenido como se describe en VII.

VII.- Aislamiento directo de la hepta-O-acetil-N-acetil- α -lactosilamina.

Los alcoholes madres de los que precipitó la N,N'-diacetil-lactosilidendiamina se evaporaron y el residuo se secó exhaustivamente. Este residuo pulverulento pesó 300 mg. los que se disolvieron en frío en 7 ml de una mezcla 1:1 de piridina: anhídrido acético.

Se dejó a temperatura ambiente 24 h., se calentó después 30 minutos en baño de agua hirviendo y se volcó sobre 50 g de una mezcla de agua-hielo. Se dejó 24 h. a temperatura ambiente. Se produjo una débil opalescencia que se filtró y el líquido se extrajo siete veces con 20 ml de cloroformo cada vez. Estos extractos cloroformicos se lavaron con ácido sulfúrico 2N, con solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua. Se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó a presión reducida y finalmente

en desecador al vacío.

El acetato amorfo obtenido se cristalizó por dilución en diversos disolventes, por lo tanto se cromatógrafió este producto en una columna de Talcó: Celito 503 (en la proporción de 5 a 1 respectivamente) de 170 mm por 30 mm. La sustancia se aplicó en la columna disuelta en una mezcla de 3 ml de benceno y 4 ml de cloroformo. Se eluyó con mezclas de benceno-etanol absoluto recogiendo fracciones en la forma en que se detalla a continuación.

Fracción	Eluyente (benceno-etanol absoluto)	Volumen
I	100: 0,1	4 fracciones de 30 ml e/u
II	100: 0,5	5 fracciones de 30 ml e/u
III	100: 1	10 fracciones de 30 ml e/u
IV	100: 1,5	5 fracciones de 30 ml e/u

Se siguió aumentando la polaridad del eluyente por aumento en 0,5 ml de etanol absoluto con respecto a la mezcla inmediata anterior, llegándose así a eluir con una mezcla final de benceno-etanol absoluto en la relación de 100 a 5 respectivamente, lavándose finalmente la columna de acetona. De todas las fracciones obtenidas solo la IV dió 120 mg de p.f. 175° que recristalizados dos veces de agua proporcionaron cristales rómbicos de hepta-O-acetil-N-acetil - α -lactosilamina de p.f. 181-183°, punto de fusión mezcla con el descripto en VI:181-183°.

Las fracciones restantes solo proporcionaron

residuos amorfos que no se pudieron cristalizar.

$$[\alpha]_D^{27} + 68,1^\circ (\text{CNC}^1_3) (\alpha \ 0,37^\circ; L: 2 \text{ dm}; p: 0,0107; v: 5 \text{ ml})$$

Análisis (después de secado al vacío y a 120°).

Calculado para C₂₈ H₃₉ O₁₈ N : C: 49,61%; H: 5,80%; N: 2,07%

Hallado: C: 49,62%; H: 5,71%; N: 2,07%

ESTUDIO DE LA ACCION DEL AMONIACO METANOLICO SOBRE LA β -OCTAACETIL-MALTOSA

I.- La reaccion del amoniaco metanolico sobre la β -Octaacetil-maltosa-aislamiento de maltosa.

20 g. de β -octaacetilmaltosa se disolvieron en 500 ml de amoniaco metanolico al 18 % por agitacion durante 3 minutos. Se dejó 24 h. a temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad completa bajo presión reducida y luego en desecador al vacío. Se extrajo 4 veces en frío con un total de 40 ml de acetato de etilo; se secó nuevamente al vacío y luego se extrajo 8 veces con un total de 200 ml de acetato de etilo caliente. Después de secar se disolvió en 30 ml de agua y se pasó esta solución por una columna conteniendo 750 ml de resina Amberlite IR-120.

Se lavó la resina con 6 litros de agua, que se vaporaron a sequedad.

Se cromatografió en papel el jarabe obtenido, en plomado papel Whatman No. 1 y como solvente un sistema constituido por acetato de etilo -piridina-agua (10;4;3) a 25° y haciendo uso de los siguientes reveladores:

- a) Nitrato de plata-metóxido de sodio: se observaron dos manchas; una de Rf 0,50 coincidente con testigo de maltosa y otra no identificada de Rf 0,64.
- b) Acido pícrico-metóxido de sodio: dos manchas de Rf 0,50 y de Rf 0,64.
- c) Acido pícrico - metaperdicato de sodio: una mancha de Rf: 0,50.

En el revelado con nitrato de plata -metóxido de sodio coincidiendo con la mancha reductora de Rf 0,50 parecería haber una no reductora superpuesta.

Se evaporó hasta sequedad completa en desecador y se extrajo con 50 ml de acetato de etilo. El jarabe residual se cromatografió en columna de carbón Darco G-60; celite 503 en la proporción 5:1, respectivamente, siendo las dimensiones de la columna activa de 270 mm por 63 mm.

Se eluyó con agua (4 lt), etanol 4 % (2 lt), etanol 8 % (2 lt) y etanol 96° (2,5 lt). Se recogieron fracciones de 100 ml que se analizaron por cromatografía sobre papel, empleando papel Whatman No. 1 y un sistema de solventes constituido por n-butanol: etanol 96°: agua en la proporción 4:1:5 respectivamente y revelando con nitrato de plata metóxido de sodio.

En las fracciones de agua y etanol 4 % pesaron un total de 250 mg de un producto siruposo que cromatografiado en papel evidenció la presencia de maltosa y no dió coloración con el reactivo de ácido pícrico - metaperiodato de sodio.

La elución con etanol 8 % y los primeros 800 ml de la elución con etanol de 96° dieron un jarabe que se disolvió en metanol. Por agregado de etanol 96° a esa solución hasta turbidez en frío, estacionamiento de 1 día en heladera y 4 días a temperatura ambiente, cristalizaron 3,4 g de sustancia que no contenía nitrógeno de p.f. 128-130°., identificada cromatográficamente sobre papel como maltosa con el reactivo de ácido pícrico -metóxido de sodio, corrido de simultáneamente con un testigo de maltosa.

$[\alpha]_D^{28} + 111,6^\circ$ (H_2O ; a los 6 minutos) ($\alpha + 1,91^\circ$; 1,4dm; $P:0,0215$; $v:5$ ml)

$[\alpha]_D^{24,5} + 129,6^\circ$ (H_2O ; valor final) ($\alpha + 2,23^\circ$; 1,4dm; $P:0,0215$; $v:5$ ml)

Los alcoholes madres de esta fracción, cromatografiados en papel dieron coloración roja con el reactivo de ácido pírico-metaperiodato de sodio, lo que evidenciaba la presencia de sustancias del tipo de las aldosa-unidades de disacáridos.

Las fracciones obtenidas por elución con el resto de etanol de 96° (1,7 lt) fueron siruposas; pesaron 800mg y no dieron reacción positiva con ácido pírico - metaperiodato de sodio al ser cromatografiadas sobre papel, lo que evidenciaba la ausencia de aldosa -unidades de disacáridos.

La fracción que dió positivo con este reactivo se volvió a cromatografiar en columna de carbón Darco G-60 celite 503 (5:1) de 200 mm por 30 mm. El jarabe agregado pesó 1,2 g. Se recogieron fracciones de 100 ml. Se pasó agua (2 lt; fracciones 1-20) etanol 3 % (2 lt; fracciones 21-40); etanol 5 % (2,5 lt; fracciones 41-60).

Las fracciones 1-22 dieron 150 mg de un jarabe que no dió coloración con pírico-metaperiodato de sodio. Las fracciones 23-52 dieron 800 mg de un jarabe que cromatografiado en papel Whatman No. 1 y empleando n-butanol-etanol-agua (4:1:5). Después de correr 72 h. a 23 empleando un estándar de glucosa, se reveló con los siguientes reactivos:

a) Nitrato de plata-nitrato de sodio: una mancha de $H_{gluc.}$:
0,5l.

b) Acido pícrico-metóxido de sodio: una mancha de Rgluc.: 0,48
coincidente con una de maltosa corrida simultaneamente.

c) Acido pícrico-metaperyodato de sodio: una mancha de Rgluc.:
0,50.

Estos cromatogramas parecen indicar una asociación maltosa-maltosa diacetanida, que impediría la cristalización de la N,N'-diacetil-maltosilidendiamina. Esta mezcla es inseparable por medio de columna de carbón y tampoco puede separarse empleando columna de celulosa. Por lo tanto se decidió acetilar este jarabe.

Las fracciones 53-60, no dieron coloración con pícrico-metaperyodato y pesaron en total 200 mg, detectándose la presencia de maltosa.

II.- Aislamiento de octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosilidendiamina.

714 mg del jarabe que dió reacción pícrico-metaperyodato positivo se disolvieron a temperatura ambiente en una mezcla de 8 ml de piridina y 8 ml de anhídrido acético. Se dejó 24 h a temperatura ambiente; se calentó 1/2 h en baño de María hirviente y después de enfriar se volcó sobre agua-hielo. Se obtuvieron 511 mg de un sólido amorfo que por recristalización dió 182 mg de β -octaacetato de maltosa p.f. 157-158°, punto de fusión mezcla con una muestra auténtica de β -octaacetilmaltosa 157-158°.

La solución acuosa-piridínica se extrajo cinco veces con un total de 250 ml de cloroformo

El extracto se lavó con ácido sulfúrico 2N,

con solución de bicarbonato de sodio y con agua. Se secó 24 h. con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó y tomó con 2 ml de benceno hirviente. Se dejó 24 h a temperatura ambiente y se filtraron 175 mg del acetato de N,N'-diacetil-maltosilidendiamina, que corresponden teóricamente a 108 mg del acetato de N,N'-diacetil-maltosilidendiamina (Rend. 0,80%).

$[\alpha]_D^{23} + 47,4^\circ (\text{CHCl}_3)$ ($\alpha + 0,71$; L: 4 dm; D: 0,0187g; v: 5ml);
D.f: 95° (abl. 65°).

Esta sustancia resultó idéntica a la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosilidendiamina aislada como se describe a continuación.

III.- La reacción de la β -octaacetilmaltosa con amoníaco a 25°C.

3,5 g de β -octaacetilmaltosa se suspendieron en 100 ml de solución acuosa de amoníaco al 25 %. Se agitó durante tres horas hasta la disolución total y se dejó a temperatura ambiente 24 h. Se evaporó hasta sequedad completa a presión reducida y en desecador al vacío. Se extrajo cinco veces con un total de 100 ml de acetato de etilo tibio y se secó nuevamente. - Por posterior disolución en metanol no se obtuvo ninguna sustancia cristalina.

Una cromatografía en papel Whatman No. 1 a 24° e y empleando n-butanol-etanol-agua (5:1:4), fase superior, dió las siguientes resultados, empleando como reveladores:

a) Nitrato de plata-nitrito de sodio: Rgluc: 0,60
Rgluc: 0,42

Rgluc: 0,20

Rgluc: testigo de maltosa: 0,41

b) Acido pícrico-metóxido de sodio: R:gluc:0,41 (coincidente con testigo de maltosa)

e) Acido pícrico-metaperiodato de sodio: Rgluc: 0,42

Estos valores indican que la maltosa corre casi superpuesta con la H,N'-maltosilidendiamina. Las manchas Rg 0,60 y Rg: 0,20 no corresponden a sustancias reductoras.

IV.- OCTA-O-acetil-H,N'-diacetil-maltosiliden-diamina a partir del producto de la amonólisis de la β -octaacetil-maltosa con amoníaco acuoso.

El jarabe finalmente obtenido pesó 2,5 g. Se disolvió en una mezcla de 25 ml de piridina y 25 ml de anhídrido acético. Se dejó 24 h a temperatura ambiente. Se filtraron 900 mg de un sólido amorfo que no cristalizó por disolución en etanol.

El filtrado se extrajo 3 veces con un total de 400 ml de cloroformo. El extracto cloroformico se lavó con ácido sulfúrico 2 N, luego con solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua. Se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad a presión reducida. Se completó la evaporación empleando pequeñas porciones de benceno.

El jarabe residual se tomó con benceno tibio, se dejó en reposo 24 h y se filtraron 875 mg de p.f. 95° con ablandamiento previo. Esto corresponde teóricamente a

535 mg de N,N'-diacetil-maltosiliden diamina lo que implica un rendimiento del 22,5 %. Los 857 mg de octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosilidendiamina obtenidos se recrystalizaron en 7 ml de benceno, obteniéndose 700 mg de cristales en forma de prismas largos que ablandaron a 63-65° y fundieron totalmente a 95°.

$$[\alpha]_D^{25} + 6,6^{\circ} (\text{CHCl}_3) (\alpha \text{ } 0,25; \text{L:4dm; p:0,0067g; v:5ml})$$

Análisis (sobre muestra secada a 80° al vacío)

Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_{20}\text{N}_2$: C: 49,35%; H: 5,91%; N: 3,59%

Hallado : C: 48,90%; H: 6,00%; N: 3,82%

V.- Análisis de la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosiliden-diamina.

300 mg. de la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosilidendiamina se disolvieron en 7,5 ml de amoníaco metanólico (al 16%) y se dejaron 24 h a temperatura ambiente. Esta solución se evaporó luego hasta sequedad, se secó durante 24 h al vacío y se extrajo tres veces con un total de 12 ml de acetato de etilo tibio; se secó y disolvió en 12 ml de etanol, por evaporación espontánea a temperatura ambiente durante una semana, se obtuvieron 160 mg (rend. 85,5%) de p.f. 84-86°. Se recrystalizó en 3 ml de etanol, obteniéndose 126mg de p.f. 85-87°. Una cromatografía en papel Whatman No. 1, mostró una sola mancha no reductora que en el sistema constituido por n-butanol-etanol-agua dió un R_f gluc: 0,40

$$[\alpha]_D^{25} + 81,1^{\circ} (\text{H}_2\text{O}) (\alpha + 0,61; \text{L:4dm; p:0,0094g; v:5ml.})$$

Análisis (sobre muestra secada a 50° al vacío)

Calculado para $C_{16}H_{30}O_{12} \cdot H_2O$ C: 41,73%; H: 6,95%; N: 6,08%

hallado C: 40,86%; H: 7,04%; N: 6,31%

Esta sustancia solo pudo ser secada a 50° para análisis debido a su bajo punto de fusión.

REACTIVOS CROMATOGRÁFICOS

PORTE EXPERIMENTAL

Los ensayos para comprobar la sensibilidad aproximada de los reactivos, se realizaron colocando gotas de una solución al 1 % de las sustancias especificadas en los cuadros respectivos sobre rectángulos de papel Whatman No. 1 y pulverizando luego el reactivo.

10.- Reactivo para algunas sustancias nitrogenadas.

Consiste en una solución que se obtiene mezclando, en la proporción de 1:1 y antes de usar, las dos soluciones siguientes:

- a) Solución acuosa de metaperiodato de sodio al 10 %.
- b) Solución acuosa de ácido pícrico al 3,5 %.

La solución de ácido pícrico se calienta previamente a 100° para mantener disuelto el ácido pícrico. El cromatograma se rocía humedeciéndolo bien y se deja secar completamente. Luego se introduce en estufa a 110° durante períodos variables entre 5 y 15 minutos. Si el papel se introduce algo húmedo, el reactivo, en algunos casos puede perder eficacia. Después de calentar, por estacionamiento a temperatura ambiente durante 5 a 15 minutos, las sustancias tabuladas a continuación desarrollan un color rojo. Las manchas suelen desaparecer al cabo de una hora, pero reaparecen mediante un nuevo calentamiento.

Este reactivo se ha mostrado eficaz hasta varios días después de preparado.

AMINOACIDOS Y SUSTANCIAS RELACIONADAS

I			II		
Sustancia	Concentra ción lo - cal.	Tiempo de ca- lentam.	Sustancia	Concentra ción lo - cal.	Tiempo de ca- lentam.
L-Cisteína	10 μ g	3,5 min.	D-L-Treonina	50 μ g	30 min; hs. a t ^o ambiente
Triptofano	5-10 μ g	3,5 min.	D-L Valina	40 μ g	30 min; hs. a t ^o ambiente
β -Indol-pru pícnico	10 μ g	5 min.	D-Arginina	30 μ g	30 min; 20 min. a t ^o ambiente
Triptamina HCl	5 μ g	en frío	D-L Aspara- gina	30 μ g	30 min; 20 min. a t ^o ambiente
Glicina	20 μ g	15 min.	D-L Isoleu- cina	40 μ g	30 min; 24 h. a t ^o ambiente
Serotonina	2-4 μ g	en frío	Fenil-alani na	20 μ g	30 min.
Creatinina	se da co- lor con 100 μ g	10 min.	α -Alanina	50 μ g	30 min.
Glutamic	15-20 μ g	10 min.	β -Alanina	50 μ g	30 min.

Algunas sustancias de la tabla I, dan tam -
bién color directamente con ácido pícrico e con concentracio -
nes mucho menores de ácido pícrico-metaperiodato de sodio. No
obstante, esas concentraciones son ineficaces en el caso de
otros aminoácidos y de algunos azúcares por lo que el reacti-
vo no es específico teniendo en cuenta esos casos también.

HIDRATOS DE CARBONO NO NITROGENADOS

Sustancia	Concentración local	Tiempo de calentam.	Sustancia	Concentración local	Tiempo de calentam.
Celobiosa	100 μ g	10 min.	Glucosa	30-40 μ g	10 min.

HIDRATOS DE CARBONO-NITROGENADOS

Sustancia	Concentración local	Tiempo de calentam.
D-Glucosamina	10-20 μ g	10 min.
N-acetil-glucosamina	10 μ g	5 min.
N-Benzoil-glucosamina	40 μ g	20-30 min.
Oxima del ácido glucosaminico HCl	10-20 μ g	5 min.
Anisal-glucosamina	20-30 μ g	15 min.
N,N'-diacetil-D-gluc-D-galo-heptosilidendiamina (x)	20 μ g	20 min.
N,N'-dibenzoil-D-gluc-D-galo-heptosilidendiamina (x)	no da color	
N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina	10-20 μ g	10 min.
N,N'-diacetil-lactosilidendiamina	20 μ g	10 min.
Streptomicina	50 μ g	10 min; 2 hs a t ^o ambien.

(x) Muestra facilitada por el Dr. Jorge O. Deferrari.

COMPUESTOS HETEROCICLICOS

Sustancia	Concentración local	Tiempo de calentamiento
Indol	10 μ g	5 min.
Acido barbitúrico	10 μ g	5 min.
Acido tiobarbitúrico	10 μ g	5 min.
Acido parabánico	20 μ g	10 min.
Tichidantoina	10 μ g	en frío
Penicilina	30-50 μ g	5-10 min; 2 hs. a t. ambiente.

110.- Reactivos para azúcares y derivados

Reactivo de ácido pícrico-nitrato de sodio.

- a) solución de ácido pícrico en metanol al 2 %
- b) Solución al 10 % de sodio en metanol

Inmediatamente antes de usar se mezclan ambas soluciones en la proporción de dos partes de (a) y una de (b) . Se pulveriza el cromatograma y se deja secar. Se lleva a estufa a 110° y se mantiene en ella durante un lapso variable entre 5 y 15 minutos. Se observan manchas rojas sobre fondo amarillo que persisten varios días. Se ensayaron varias sustancias disponibles en nuestro laboratorio como se puede ver en el cuadro adjunto. Se observará que este reactivo es eficaz para azúcares reductores y sus ésteres acetilados y benzilados.

Reactivo de nitrato de plata-metóxido de sodio.

- a) Solución al 0,3 % de nitrato de plata en metanol.
- b) Solución saturada de amoníaco en metanol
- c) Solución al 7 % de sodio en metanol.

Los reactivos se mezclan en la siguiente proporción: cinco partes de (a), una parte de (b) y dos partes de (c) en ese orden. El papel se rocía y se observa la coloración en frío. A los diez minutos se marcan con un lápiz suavemente las manchas observadas y se deja media hora más a temperatura ambiente, con lo que el color de las mismas se intensifica. Se puede lavar después con una solución de tiosulfato de sodio al 10 %, para eliminar el color de fondo, lo que se logra a los 15-30 minutos de estacionamiento.

SUSTANCIAS ENSAYADAS CON LOS REACTIVOS DE AZUCARES

Sustancia	Sensibilidad aprox. con mi- trato de pla- ta	Sens. aprox. con ac. pi- erico.
N,N'-diacetil-lactosilidendiamina	10 μ g	negativo con 100 μ g
N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina	10 μ g	negativo con 100 μ g
N,N'-diacetil-D-gluco-D-gulohexosilidendiamina	10 μ g	negativo con 100 μ g
N,N'-dibenzoil-D-gluco-gulohexosilidendiamina	10 μ g	negativo con 100 μ g
Lactona manohexónica	10 μ g	negativo con 100 μ g
Lactona galahexónica	10 μ g	negativo con 100 μ g
Lactona galahexónica	10 μ g	negativo con 100 μ g
Manosa dietil mercaptan	mancha blanca con 10 μ g	negativo
Nitrilo del ácido D-glucosaminico	10 μ g	10 μ g
Pentacetil-D-glucosa	10 μ g	10 μ g
Pentacetil-D-glucosamina	10 μ g	10 μ g
N-benzoil-D-glucosamina	10 μ g	10 μ g
N-benzoil-tetraacetil-D-glucosamina	10 μ g	10 μ g
Pentabenzoil-D-glucosamina	20 μ g	20 μ g
2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucosa	10 μ g	10 μ g
3,5,6-tri-O-benzoil-monoacetil-D-glucosa	10 μ g	20 μ g
Hexa-O-benzoil-D-gluco-D-gulo-heptosa	30 μ g	30 μ g
Hexacetil-N,N'-diacetil-D-gluco-D-gulo-heptosilidendiamina	10 μ g	

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1- Se ha realizado la amonolisis de la α -octaacetilcelobiosa con amoníaco metanólico al 16 % obteniéndose la N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina con un rendimiento del 3,7 % A partir de esta sustancia se obtuvo la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-celobiosilidendiamina. Este acetate fué similar al obtenido por Zechmeister y Toth (40) quienes lo obtuvieron por tratamiento de octa-acetilcelobiosa con amoníaco líquido en tubo cerrado a 50°. Además se aisló la hepta-O-acetil-N-acetil- α -celobiosilamina por cromatografía en columna de Talco: Celite 503, lo que corresponde a un rendimiento de N-acetil- α -celobiosilamina de 0,60 %. Esta sustancia se considera anómera de la aislada por Zechmeister y Toth (40) en la reacción antes mencionada. La amonolisis de la β -octaacetilcelobiosa también condujo al aislamiento de la N,N'-diacetil celobiosilidendiamina con un rendimiento del 9,4%. En esta experiencia no se obtuvo ningún N-acetilcelobiosilamino derivado.

Se hace una discusión acerca de la influencia que el disolvente tiene en esta reacción comparando nuestras experiencias con las de Zechmeister y Toth (40) y con las de Fritz Michael y colaboradores (41). En base a estudios cinéticos de Betts y Hammett (42) se considera que la presencia de metanol favorece la amonolisis total de los azúcares y su ausencia favorece la formación de aldosa amidas. La presencia de NH_4^+ favorece la formación de aldosa-amidas y su ausencia favorece la reacción de amonolisis total.

2- Se llevó a cabo la amonolisis de la β -octaacetil-lactosa, obteniéndose la N,N'-diacetil-lactosiliden-diamina

con un rendimiento del 4,7 %. A partir de ella se obtuvo la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-lactosilidendiamina cristalina. También se aisló por cromatografía en columna de carbón la N-acetil - α - lactosilamina con un rendimiento del 0,76%. Esta sustancia se considera anómera de la obtenida por Richard Kühn y G. Krüger (43) por acción de la acetona sobre la lactosil-amina. La acetilación de esta sustancia dió la hepta-O-acetil-N-acetil- α -lactosilamina. Este acetato también se obtuvo por cromatografía en columna, luego de seguir una técnica de acetilación de las aguas madres de la obtención de N,N'-diacetil-lactosilidendiamina.

3.- La reacción del amoníaco metanólico con β - octaacetilmal-
tosa condujo al aislamiento de la octa-O-acetil-N,N'-diace-
til-maltosilidendiamina, en una cantidad que corresponde a
un rendimiento de N,N'-diacetilmaltosilidendiamina del 0,80%.
La reacción de la β - octaacetilmal-
tosa con amoníaco acuoso permitió obtener la octa-O-acetil-N,N'-diacetil-maltosi-
lidendiamina en una cantidad que corresponde a un rendimien-
to de N,N'-diacetilmaltosilidendiamina de 22,5 %. Por amono-
lisis de este producto se obtuvo la N,N'-diacetilmaltosiliden-
diamina cristalina.

Se pone de manifiesto que la imposibilidad de cristalizar di-
rectamente esta sustancia se podría deber al hecho de encon-
trarse asociada con maltosa.

4.- Se describe el empleo de tres reactivos cromatográficos. El
reactivo de nitrato de plata-metóxido de sodio es una mo-
dificación del reactivo conocido empleando nitrato de plata
e hidróxido de sodio en medio acuoso o acetónico. Presentó

utilidad en la detección de azúcares reductores y no reductores en frío y puede ser útil en la cromatografía de ésteres de hidratos de carbono sobre papel con fase invertida (excepto para el caso de papel-formamida).

El reactivo de ácido pícrico-metóxido de sodio detecta solamente azúcares reductores y presenta la ventaja de ser empleado en medio alcalino, con lo que se evita la posibilidad de hidrólisis de grupos sensibles a los reactivos ácidos.

El reactivo de ácido pícrico-metaperdoyate de sodio es útil en la detección de algunas sustancias nitrogenadas, del grupo de los hidratos de carbono, aminoácidos y compuestos heterocíclicos.-

- 1.- A. Vohl, Ber. 26, 730, (1893).
- 2.- L. MAQUENNE, Comp. Rend. 130, 1402, (1900)
- 3.- R.C. Hockett, J. Am. Chem. Soc. 57, 2265, (1935).
- 4.- V. Deulofeu, J. Chem. Soc. 2602 (1930)
5. A. Wohl, Ber, 32, 3668 (1899).
- 6.- V. Deulofeu, J. Chem. Soc. 2458 (1929).
- 7.- R.C. Hockett, V. Deulofeu, A.L. Sedoff y R.J. Mandive.-
J.M. Chem. Soc. 60, 278 (1938).
- 8.- E. Votocek, Ber. 50, 35 (1917)
- 9.- E. Restelli de Labriola, Tesis, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Buenos Aires (1938)
- 10.- E. Restelli de Labriola y V. Deulofeu, J. Org. Chem. 12, 726 (1947).
- 11.- M.A. Ondetti, Tesis, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Buenos Aires, 1957, J. Org. Chem. 24, 183, (1959).
- 12.- F. Simóes, Tesis, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Buenos Aires, (1947).
- 13.- R.C. Hockett y L.R. Chandler, J. Am. Chem. Soc. 66, 957 (1944).
- 14.- F. Brigi, H. Muhlischlegel y N. Schinle, Ber. 64, 2921 (1931).
- 15.- J.O. Deferrari y V. Deulofeu, J. Org. Chem. 22, 802, (1957).
- 16.- E. Recondo, Tesis, Fac. Ciencias Exactas y Naturales de Buenos Aires, (1958).
- 17.- V. Deulofeu y J.O. Deferrari, J. Org. Chem. 17, 1087 (1952).

- 18.- J.O. Deferrari y V. Deulofeu, *J. Org. Chem.* 17, 1093 (1952).
- 19.- J.O. Deferrari y V. Deulofeu, *J. Org. Chem.* 17, 1097 (1952).
- 20.- V. Deulofeu y J.O. Deferrari. *Comunicación Personal.*
- 21.- V. Deulofeu.- *J. Chem. Soc.* 2973 (1932).
- 22.- J.O. Deferrari, *Tesis de Profesorado, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales* (1954). *J. Org. Chem.* 24, 183, (1959).
- 23.- H.S. Isbell y H.L. Frush, *J. Am. Chem. Soc.* 71, 1579 (1949).
- 24.- J.O. Deferrari, V. Deulofeu y E. Recondo, *An. Asoc. Quim. Arg.* 48, 137, (1953).
- 25.- R. Allerton y W.G. Overend *J. Chem. Soc.* 35, (1952).
- 26.- G. Braum, *Organic Syntheses Coll. Vol. II*, pag. 124.
- 27.- R.C. Hockett, N. Diene, H. Fletcher y H. Hamden, *J. Am. Chem. Soc.* 66, 467 (1944).
- 28.- G. Nieman y T. Hays, *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2980 (1940).
- 29.- H.L. Frush y H.S. Isbell, *J. Research Natl. Bur. Standards*, 47, 239 (1951).
- 30.- G. Nieman y J.T. Hays, *J. Am. Chem. Soc.* 67, 1302 (1945).
- 31.- P. Fleury, *Bull. Soc. Chim. France* 1126 (1955).
- 32.- R.C. Hockett, V. Deulofeu y J.O. Deferrari, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 1840 (1950).
- 33.- V. Deulofeu y J.O. Deferrari, *An. Asoc. Quim. Arg.* 28, 241 (1950).
- 34.- E. Fischer, *Ber.* 53, 1621 (1920).
- 35.- B. Helferich y V. Klein, *Ann.* 455, 173 (1927).
- 36.- B. Helferich y W. Klein, *Ann.* 450, 219 (1926).
- 37.- G.E. No. Casland, *J. Am. Chem. Soc.* 2295 (1951).

FODER-BA.
-108-

- 38.- Foder y Kiss, Nature 164, 917 (1949); J. Am. Chem. Soc. 72, 3495 (1950).
- 39.- G. Zemplen Ber. 59, 1254 (1926).
- 40.- L. Zechmeister y G. Toth, Ann. 525, 14 (1936).
- 41.- F. Michael, R. Frier, E. Flato y A. Miller, Chem. Ber., 85, 1092 (1952).
- 42.- R.L. Betts y L.P. Hammett, J. Am. Chem. Soc. 59, 1568 (1937).
- 43.- R. Kuhn y Gerd Krüger. Chem. Ber. 87, 1544 (1954).
- 44.- B. Vickberg.- Acta Chem. Scand. 12, 615 (1958).

-.-

Go. Foder

A. Boleas

Noviembre 1959