

b16100840
i19948086

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS

T/988

SÍNTESIS de NUEVOS PIRROLES
DERIVADOS de
N-ALQUIL y N-GLICIL-HEXOSAMINAS

Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Ciencias
Químicas por el Licenciado

JOSÉ BELLO GUTIERREZ

U N I V E R S I D A D D E S E V I L L A

C Á T E D R A D E Q U Í M I C A O R G Á N I C A

Vº Bº

EL CATEDRÁTICO DIRECTOR Y

PADRINO DE ESTA TESIS

Franco Jover

Enero, 1.961

Mi sincero agradecimiento al Profesor Dr. D. Francisco García Gonzalez y al Dr. en Ciencias D. Juan Gasch Gomez por su ayuda y dirección en el desarrollo de esta tesis.

 Agradezco al Dr. Calderón, de la Sección de Microanálisis del C.S.I.C., los análisis elementales de este trabajo.

 Asímismo, exprese mi agradecimiento al Instituto "Alonso Barba" y al Patronato "Juan de la Cierva" del C.S.I.C. por la ayuda económica prestada.

- . I N D I C E . -

página

Introducción 1

PARTE TEORICA

I.- Antecedentes bibliográficos :

Síntesis de pirroles con cadena polialcohólica 6

Interacción entre aminoácidos y azúcares 14

La transposición de Amadori 25

Mecanismo de la transposición de Amadori 31

Aspectos biológicos comunes a hidratos de carbono y aminoácidos 37

II.- Descripción de nuevos pirroles :

Nuevos pirroles con cadena polialcohólica 43

Espectros de absorción ultravioleta 53

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de materias primas :

D-fructosilbencilamina 59

2-bencilamino-2-desoxi-D-glucosa 60

D-fructosiletilamina 61

2-etilamino-2-desoxi-D-glucosa 62

2-n-butilamino-2-desoxi-D-glucosa 63

Ester etílico de la glicocola 64

N-D-glucosilglicocola etiléster 65

1-aminogliciléster-1-desoxi-D-fructosa 66

Obtención, análisis y derivados de los nuevos productos :

1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol carboxi-
lato de etilo 67

1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol. . 72

I N T R O D U C C I O N

- . I N T R O D U C C I O N . -

En el desarrollo de los seres vivientes toman parte compuestos cuyas estructuras desempeñan funciones biológicas importantes en el mecanismo de las reacciones celulares. Durante muchos años, el intento de aclarar y establecer cada una de estas estructuras ha sido objeto de numerosos trabajos.

Dentro del campo de los hidratos de carbono se ha venido acentuando cada vez más el interés biológico de algunos derivados nitrogenados hasta el punto que, hoy día, el estudio de los aminoazúcares ha adquirido un gran relieve en razón de su importancia, no solo como elementos constitutivos de complejos moleculares, sino también desde un punto de vista dinámico.

En la mayor parte de los líquidos biológicos se puede señalar la presencia de mucopolisacáridos y glicoproteínas en los que la glucosamina ó la galactosamina desempeñan un papel primordial. Además, su existencia en antígenos de diferentes tipos, en factores de crecimiento, en antibióticos y hormonas, así como su conexión con el mecanismo de la infección por virus, la acción de pirógenos y la especificidad de los grupos sanguíneos, indica que participan de una manera activa en el metabolismo.

La facilidad de reacción de los azúcares con aminas, aminoácidos y proteínas hace posible la rápida formación de glicosilaminas, capaces de sufrir una transposición de Amadori, que da lugar a estructuras de aminoazúcares.

Las glicosilaminas, de fácil formación en las condiciones de reacción celular, tienen un gran interés biológico, ya que muchos nucleósidos y algunas coenzimas pueden incluirse en su grupo, además de una especial consideración farmacológica en cuanto que la preparación de N-glicósidos puede modificar la solubilidad y las propiedades tóxicas de muchas aminos.

La conjunción de una cadena polihidroxilada de carbonos con el grupo amino proporciona a los aminoazúcares una gran reactividad, que les permite participar en numerosas reacciones químicas. Glicosilaminas y sus productos de transformación, los aminoazúcares, participan en numerosos mecanismos de reacción, bien como punto de partida ó como paso intermedio, constituyendo la transposición de Amadori uno de los procesos de mayor importancia biológica.

Así pues, intervienen en la compleja reacción de Maillard, responsable de los cambios de solubilidad proteica y reducción del valor alimenticio en los procesos de desecación de alimentos, como una consecuencia de la interacción entre los aminoácidos y los centros glicosídicos de los azúcares.

Por otra parte, los aminoazúcares condensan fácilmente, en condiciones tan suaves como las fisiológicas, con compuestos betadicarbonílicos para dar derivados del núcleo pirrol con cadena polialcohólica, capaces de dar un cromógeno estable con el reactivo de Ehrlich. Esta reacción ha servido de base a Elson y Morgan para desarrollar un método colorimétrico para la determinación de hexosaminas.

Cuando en la valoración se hallan presentes aminoácidos, ó aminas, y azúcares reductores se producen interferencias que falsean los datos experimentales. Para explicar estas perturbaciones se han sugerido distintos mecanismos en los que toma parte la transposición de Amadori, pero sin que se aclare del todo su verdadera naturaleza.

En la presente investigación se estudian aquellos puntos que han parecido de mayor interés, en relación con estos antecedentes bibliográficos de los aminoazúcares. En primer lugar, se hace un estudio de la condensación de compuestos betadicarbonílicos con aminoaldosas N-sustituidas. Se ha trabajado con N-etil-, N-butil- y N-bencil-D-glucosamina, obtenidas a partir de D-fructosa y las aminas correspondientes mediante una transposición de Amadori "inversa" de la D-fructosilamina primeramente formada.

En cada uno de los casos se aíslan compuestos cristalinos, que dan color rojo estable, en caliente, con el reactivo de Ehrlich, cuyas estructuras se confirman mediante el análisis elemental y valoración de cadena, además de la formación de los aldehidos, semicarbazonas y derivados acetilados correspondientes.

Los mismos derivados del pirrol se han obtenido haciendo reaccionar directamente la D-fructosilaetilamina y la D-fructosilbencilamina con el éster acetilacético ó la acetilacetona. Se supone que el primer paso dado habría de ser la formación del aminoazúcar por una transposición. Con el estudio de esta reacción se hace extensible a las alquilfructosilaminas la transposición de Amadori "inversa", catalizada por los compuestos betadicarbonílicos.

También se han preparado otros compuestos con núcleo de pirrol y cadena polialcohólica en posición β cuyo nitrógeno procede del grupo amino de un derivado de la glicocola. En este caso se ha condensado el éster acetilacético y la acetilacetona con una fructosamina N-sustituida obtenida a partir de la D-glucosa y el éster etílico de la glicocola a través de una transposición de Amadori.

Los dos derivados del pirrol aislados al estado cristalino, cuyas estructuras han sido demostradas de la misma forma que las otras anteriores, dan color rojo-violeta estable con el reactivo de Ehrlich.

Con la formación de estos compuestos se presenta una posible explicación del mecanismo de las interferencias en la reacción de Elson-Morgan.

Por otra parte, puede verse en ellos el origen de ciertos resultados experimentales descritos en la bibliografía. Estudios realizados con isótopos han puesto en evidencia cómo el N de la glucosamina puede venir de la glutamina o de la glicocola, en tanto que su cadena carbonada procede de la D-glucosa ó D-fructosa, pero nunca de los carbonos del aminoácido. Además, el N procedente del grupo amino de la glicocola puede ser detectado formando parte de los núcleos pirrólicos de las porfirinas.

Con los dos últimos compuestos estudiados en el presente trabajo se señala la importancia de que el nitrógeno del núcleo pirrol procede de un aminoácido y el aminoazúcar reaccionante se ha obtenido a partir de una ósa, que a

porta su cadena carbonada, y un aminoácido, del que toma su grupo amino, por medio de una transposición de Amadori.

Esta reacción puede tener un gran interés, al menos desde un punto de vista teórico, en cuanto puede constituir un punto de contacto entre el metabolismo de los hidratos de carbono, a través de la osa, el metabolismo de los lípidos, que aporta el compuesto betadicarbonílico y el metabolismo proteico, que suministra el aminoácido portador del grupo amino.

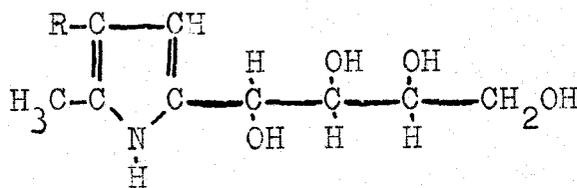
Por último, se han llevado a cabo los espectros de absorción ultravioleta de cada uno de los derivados pirrólicos N-sustituídos, de los que ^{hay} pocos antecedentes bibliográficos. Se hace un estudio comparativo con los espectros obtenidos para derivados de estructura idéntica sin sustituyente en el nitrógeno.

P A R T E T E Ó R I C A

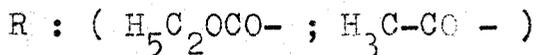
I.- Antecedentes bibliográficos.

- . SINTESIS de PIRROLES con CADENA POLIALCOHOLICA . -

En 1.922, Pauli y Ludwig (1), con el objeto de encontrar una posible intervención de los aminoazúcares en la génesis de los heterociclos naturales, obtienen por primera vez derivados del núcleo de pirrol al condensar la 2-amino-desoxi-D-glucosa (D-glucosamina) con compuestos betadicarbonílicos. Calentando directamente en baño maría el aminoazúcar con el éster acetilacético o la acetilacetona separan un compuesto cristalino cuya estructura no aclaran, pero su composición centesimal y el olor a pirrol que produce cuando se destila con polvo de cinc les induce a establecer la estructura siguiente:



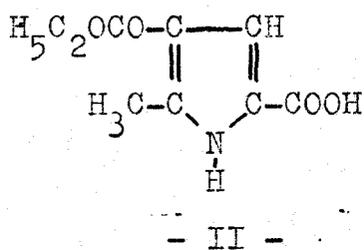
- I -



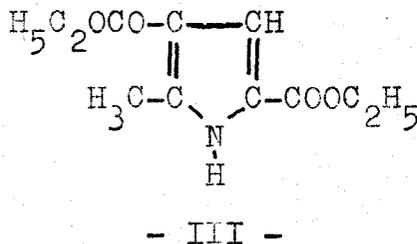
Por otro lado, García Gonzalez (2), que había estudiado desde un punto de vista químico la acción anticetogénica de la glucosa, que forma derivados furánicos al condensar con el éster acetilacético(3), investiga la reacción de la glucosamina con los compuestos betadicarbonílicos en

condiciones distintas a las desarrolladas por Pauli y Ludwig: En vez de la base libre emplea el clorhidrato, con la cantidad de carbonato sódico equivalente, y la reacción se lleva a cabo en solución acuoso-acétónica a la temperatura ordinaria. Bajo estas condiciones, la reacción tiene idéntico desarrollo aunque resulta un producto cristalino que, no obstante presentar distinto punto de fusión y rotación óptica, se le asigna la misma fórmula (I):

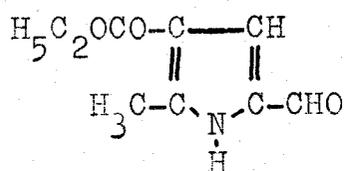
Para probar la estructura del nuevo compuesto se oxidó con permanganato potásico en solución alcalina a baja temperatura(4), resultando un ácido cuya composición centesimal responde a la fórmula (II):



Este ácido se convierte por tratamiento de su sal de plata con yoduro de etilo en su dietiléster (III), cuyo punto de fusión y otras propiedades coinciden con el compuesto sintetizado por Fischer y Hussong (5):



La estructura del nuevo compuesto de la D-glucosa mina ha sido confirmada posteriormente por Müller y Varga (6) que, siguiendo a García Gonzalez, obtienen el mismo com puesto (I), con idénticas características físico-químicas . Oxidando con tetracetato de plomo se aisla un aldehído (IV) cuyo punto de fusión y otras propiedades coinciden con el descrito por Fischer y Schubert (7):

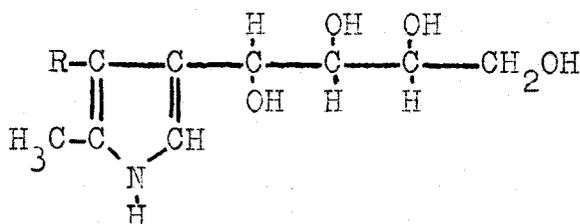


- IV -

En la oxidación-valoración de la cadena polialco- hólica de (I) con ácido periódico según Jones (8), se consi gue demostrar la presencia de cuatro hidroxilos contiguos.

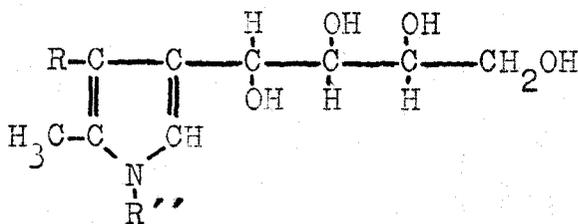
Años más tarde se repiten las experiencias en las mismas condiciones de Pauli y Ludwig (9). Cuando el produc- to (de la reacción de la base libre, sin disolvente) se cris talizaba de agua, sus propiedades eran idénticas a las del compuesto preparado por García Gonzalez en solución acuoso- acetónica. Pero si el compuesto se dejaba durante algún tiem po en desecador con ácido sulfúrico, aparecía una disminu - ción del punto de fusión que una nueva cristalización en agua le llevaba a su valor primitivo. El análisis elemental indi ca que el cambio no puede atribuirse a pérdida de agua de cristalización; más bien hay que pensar en una anhidrización

Recientemente, la reacción en solución acuosa y temperatura ambiente ha sido ensayada con otros aminoazúcares (14)(15). En primer lugar, se estudia la aminocetosa más sencilla, 1-amino-1-desoxi-D-fructosa, cuyo acetato, tratado con una cantidad equivalente de carbonato sódico, para liberar el aminoazúcar base, y éster acetilacético ó acetilacetona, origina productos cristalinos que por su composición centesimal y analogía con la reacción de la D-glucosamina se les aplica la estructura (XI):



- XI -

Tres fructosaminas N-arilsustituidas, 1-p-tolil, 1-p-anisil y 1-p-fenetil-D-fructosamina, dan lugar a compuestos de estructura (XII):



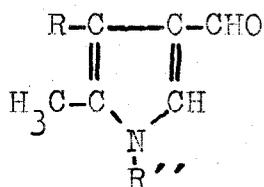
- XII -

R'' : (C₆H₄CH₃- ; C₆H₄OCH₃- ; -C₆H₄OC₂H₅)

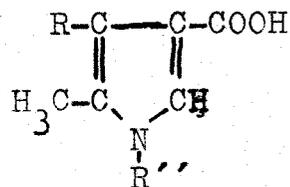
R : (H₃C-CO- ; H₅C₂O-CO-)

pero con un rendimiento de solo el 16% , cuando con los dos aminoazúcares anteriormente citados se alcanzaba el 80 % . La calefacción del áilaminoazúcar con un exceso de compuesto betadicarbonílico en ausencia de disolventes eleva el rendimiento hasta el 40 % .

La estructura de estos compuestos se ha podido de mostrar mediante la oxidación a los aldehidos (XIII) y ácidos (XIV) correspondientes:



- XIII -



- XIV -

En este caso, no existe en la literatura otras referencias de 3-pirrolaldehidos y de ácidos 3-pirrolcarboxílicos con la posición α contigua libre. Tal vez se deba a la mayor reactividad que presenta la posición α frente a la β en los compuestos con núcleo de furano y pirrol, impidiendo que el grupo funcional entre en ésta última posición.

Ya en 1.933, Elson y Morgan (16) hicieron uso de esta reacción para desarrollar un método colorimétrico de valoración de 2-aminohexosas que, en solución alcalina con acetilacetona, originan un complejo de sustancias (17) capaces de dar un color rojo-violeta estable al reaccionar con el reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehido en ácido clorhídrico). Es interesante el hecho que los azúcares, principalmente las cetosas, en presencia de amoníaco, aminas ó

aminoácidos, reaccionan con la acetilacetona, dando coloraciones similares a la obtenida con la D-glucosamina (18), con el consiguiente error en la valoración de aminoazúcares. El mecanismo de estas interferencias no estaba muy claro. Se ha pensado en una reacción del azúcar con el compuesto amino para dar una glicosilamina que, bien por catálisis de la acetilacetona ó bien por reacción con ella, se transforma en un derivado heterocíclico capaz de dar reacción positiva con el reactivo de Ehrlich (19). Ya Elson y Morgan (16) habían observado que la D-glicosilamina producía en el ensayo colorimétrico una coloración que no se distinguía de la casada por la D-glucosamina.

Gomez Sanchez y Gasch Gomez (20) demuestran que las glicosilaminas y los compuestos betadicarbonílicos reaccionan para dar derivados del pirrol. La reacción se lleva a cabo en medio alcohólico, en caliente ó a la temperatura ambiente, y adicionando cantidades catalíticas de piperidina. Por separación a través de columna de celulosa en polvo aislaron un producto cristalino, idéntico en sus propiedades al obtenido a partir de l-amino-l-desoxi-D-fructosa (14). De manera similar se comportan las N-aril-D-glicosilaminas.

La D-manosilamina origina el mismo compuesto que la D-glicosilamina, pues la diferencia de configuración en el C-2 se pierde al formarse el núcleo de pirrol.

De la D-fructosilamina obtuvieron el mismo derivado pirrólico que se origina a partir de la D-glucosamina.

- . INTERACCION entre AMINOACIDOS y AZUCARES . -

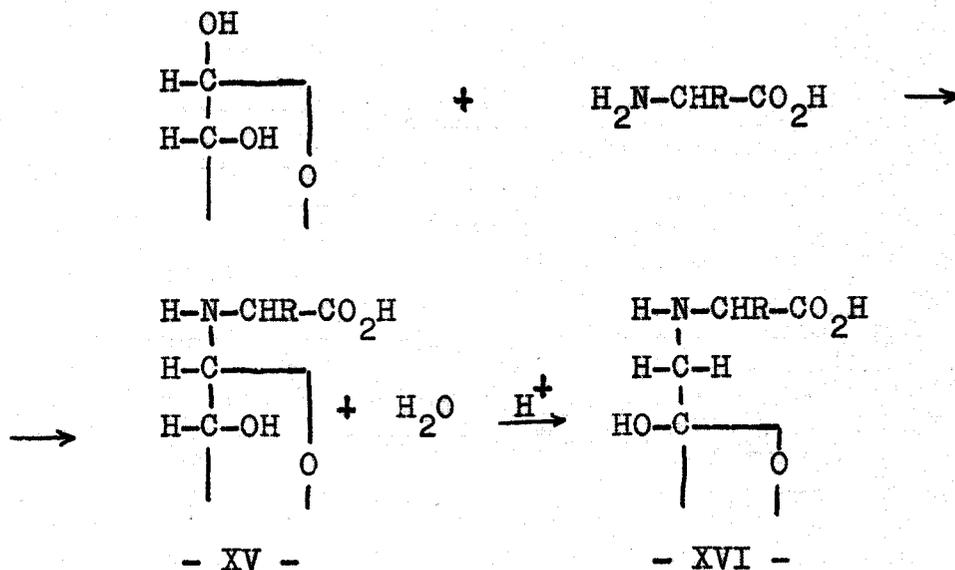
Un hecho que por su importancia y trascendencia ha sido objeto de la atención de numerosos trabajos (21 - 31) y revisiones (32) es el estudio de la interacción entre aminoácidos y los centros glicosídicos de los azúcares, interacción que se hace extensible a otros puntos de ambas moléculas.

Mezclas sólidas, ó soluciones, de aminoácidos con azúcares forman, espontáneamente, productos olorosos y oscuros cuando se les deja estar. Algunas experiencias (33) han confirmado las primeras conclusiones que, en soluciones neutras, los aminoácidos se combinan con D-glucosa, aunque el equilibrio esté desplazado en favor de la hidrólisis(34)(35).

A este tipo de reacción se le conoce genéricamente con el nombre de "reacción de empardecimiento" ó "emparedamiento no enzimático" y de una forma general como "reacción de Maillard", por ser este investigador el primero que emprendió el estudio sistemático de tales reacciones y sus relaciones con la química de los productos naturales(36). Recientemente se aplica el nombre de "reacción de Maillard" a la reacción de los grupos aminos de aminoácidos, péptidos o proteínas con los grupos hidroxilos "glicosídicos" de los azúcares (32).

La interacción de aminoácidos y azúcares puede desarrollarse, en general, siguiendo dos cauces distintos, determinados por las condiciones experimentales, para dar lugar

a la formación de compuestos identificables como glicosilaminas N-sustituidas, ó sus productos de transposición de Amadori, o bien originar - reacción típica de Maillard - una mezcla de productos de gran complejidad.



Las condiciones de trabajo en las cuales se ha estudiado la reacción han sido muy diversas, teniendo como consecuencia resultados distintos y a veces contradictorios. En un principio, las investigaciones se realizaron en soluciones acuosas y temperaturas elevadas, similares a las de Maillard. Después, se aplicaron métodos polarimétricos (37)(38), potenciométricos (39)(40), ó técnicas basadas en la medida de solubilidades de los productos (41). Se cambian las condiciones de trabajo(21)(42), e incluso se estudia el efecto de radiaciones γ sobre cristales y soluciones (43), resultando espectros ultravioleta característicos de enoles o enediones.

En las condiciones experimentadas por Maillard se forman numerosos compuestos, unos veinticuatro, siendo muy difícil establecer el camino seguido por las reacciones (23). Entre los productos aislados, algunos presentan estructura de furfural, de gran interés, porque se ha visto que compuestos de este tipo desempeñan un papel importante como intermedios de la reacción de empardecimiento (44)(45)(46) .

Otro de los productos, al que se le asigna la estructura (XVIII), era similar en sus propiedades a los obtenidos por Gottschalk (21) trabajando en condiciones semejantes a las de las conservas, en las que se consiguen mezclas más simples de compuestos.

En primer lugar, aparecería (24) la forma l-amino -l-desoxi-D-cetosa (XVI) originada por transposición de Amdori de una glicosilamina N-sustituida (XVII) inicial. Ahora bien, el espectro infrarrojo de su sal sódica (47) habla en favor de la forma enólica con el equilibrio tautomérico completamente desplazado hacia ella. Pero cualquiera que sea su estructura, se comprueba que es intermedio en las reacciones de empardecimiento.

Klemen y Seits (48) han cromatografiado extractos etéreos de mezclas, tratadas por el calor, de glicocola-glu cosa y sus resultados solo coinciden con los obtenidos por Chichester (23) en el hidroximetilfurfural (XXI). Detectan un compuesto (XIX) que suponen originado por condensación de furfural con glicocola, pero cuyo mecanismo de reacción no queda claro.

Las reacciones pueden transcurrir según el esquema siguiente:

Las reacciones químicas responsables del empardecimiento no enzimático son muy complejas y los sistemas modelos parcialmente explicados. Las reacciones de la glucosa con la valina, lisina y ácido glutámico fueron ya señaladas por Ågren (49) y Kubota (50), pero sin que investigaran su mecanismo. Estudios realizados sobre el cálculo de la constante de equilibrio (51) indican que la reacción es molécula a molécula, aunque al variar las condiciones de trabajo: pH, concentración y temperatura (52)(53), se presentan indicios de coexistencia de monoglucosa y diglucosa en interacción reversible con la molécula de aminoácido.

En algunos casos solo intervienen aldosas y compuestos aminados, pero en otros lo hacen también la fructosa y los ácidos orgánicos (54), obteniéndose en uno u otro caso productos básicos débiles, que dan reacción positiva con la ninhidrina, pero que se diferencian de los aminoácidos puros porque dan reacción con el nitrato de plata alcalino. Esto hace pensar en productos de transposición de Amadori de azúcares y aminoácidos, como se ha podido identificar por comparación de sus propiedades con los compuestos obtenidos a partir de constituyentes puros (22)(26)(27)(28). Muchos de estos productos aislados (21)(23)(47)(55) son semejantes a los aislados por Borsook (56) del hígado de mamíferos, que identifica como 1-amino-1-desoxi-2-cetohexosa N-sustituida.

La facilidad para que se desarrolle la reacción depende tanto de la naturaleza del azúcar como del aminoácido, y la reactividad relativa de cada uno de ellos está en función de las condiciones en que se desarrolle la experiencia.

Las aldosas han sido condensadas con algunos aminoácidos y sus ésteres para producir glicosilaminas N-sustituidas. La D-glucosa se ha hecho reaccionar con derivados de los ácidos o-, m- y p-aminobenzoico (57), p-aminosalicílico, glicocola, serina y lisina. Agren y Taylor (59) y más tarde Kubota (50) demuestran que la proximidad de un grupo carboxilo tiende a inhibir la reacción de un compuesto amino con la D-glucosa. Por eso los β -aminoácidos son más reactivos que los α -aminoácidos, y la esterificación del grupo carboxilo lleva consigo un incremento en la velocidad de reacción.

Aunque Maillard señala mayor reactividad con los aminoácidos a la D-fructosa que la D-galactosa, D-manosa y D-glucosa, de los trabajos de Shiga (60) se deducen conclusiones opuestas. Medidas de variación del pH (52) han demostrado que la D-fructosa reacciona con la L-histidina en soluciones diluidas a 20 ° C., pero no con glicocola y alanina.

Glicosilderivados de numerosos aminoácidos se estabilizan por la formación de estructuras quelatos cuando están en presencia de cloruros de algunas sales (Ca, Zn, Fe, Co, Cu) en solución metanólica (25). Cationes divalentes forman quelatos con dos moléculas de glicosilamina.

Como resultado de las numerosas investigaciones acerca del mecanismo de estas interacciones han prevalecido dos teorías principales. Una supone la formación inicial de glicosilaminas, que sufren una transposición de Amadori, ó de Heyns para el caso de las cetosas. Este derivado 1-amino-1-desoxi-cetosa (ó 2-amino-2-desoxi-aldosa) formado puede per-

der agua y ciclizarse para formar compuestos furánicos; enolizarse ó reaccionar con más aminoácido para dar productos coloreados. Una condición indispensable para que se verifique la reacción es la presencia de humedad.

La segunda teoría es más reciente (61) y mantiene que la reacción de empardecimiento y la de Maillard son separadas y distintas. La primera es efecto del pH sobre el azúcar dentro de un margen muy amplio y la segunda solo tiene lugar en medio alcalino.

A la formación de derivados de glicosilaminas, capaces de dar compuestos cromógenos con el reactivo de Ehrlich, puede atribuirse la naturaleza de algunos errores que se producen en la valoración de aminoazúcares por el método de Elson-Morgan, en presencia de aminoácidos y azúcares reductores.

Se ha comprobado que una mezcla de un azúcar reductor con lisina o glicocola (18)(62)(63) da coloración roja con el reactivo de Ehrlich, incluso calentadas simplemente con tampón de carbonato sódico y en ausencia de acetilacetona (64). La naturaleza del aminoácido y el pH existente durante la calefacción alcalina, son dos factores que influyen poderosamente en la intensidad del color. α -Aminoácidos (65), como lisina y ornitina, dan colores más intensos que la glicocola, arginina y asparragina, que lo dan muy débil. Los demás α -aminoácidos, incluido la alanina, no dan color sin la acetilacetona, como igualmente les ocurre a la acetamida y la hidroxilamina. Además, solo las aminas primarias reaccionan bajo estas condiciones.

Todo ello parece indicar que la reacción es propia de grupos aminos no sustituidos, en un estado especial de reaccionabilidad, puesto que el color es tanto más intenso cuanto más lejos se encuentra el grupo amino del grupo carboxilo ó de otros que atraigan electrones.

Por otra parte, la estructura del monosacárido, no parece ser esencial para la reacción, ya que glucosa, galactosa, manosa, fructosa, arabinosa, xilosa, fucosa y ramnosa dan todas la misma reacción.

Según Gottschalk y Partridge (21)(22)26), en el calentamiento de mezclas de aminoácidos-azúcar con álcalis, se origina una base de Schiff, cuya forma enol da lugar a un producto de condensación dihidropiperazina (XXII), responsable del grupo cromófero con el reactivo de Ehrlich.

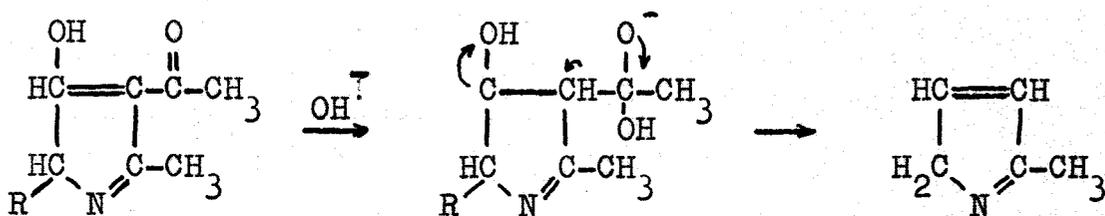
Los resultados de Immers Y Vasseur (65) indican , sin embargo, que la reacción ha de ser más compleja. La base de Schiff la forman los azúcares libres con todos los aminoácidos en condiciones alcalinas (41). En cambio el cromófero en cuestión se forma solamente con algunos aminoácidos y el grado de coloración depende de sus estructuras.

Se podría pensar en estructuras furánicas (XIX) debido a que la formación de núcleos furanos a partir de monosacáridos se favorece por la presencia de aminoácidos (46), y se sabe que ciertos derivados furánicos son capaces de dar color con el reactivo de Ehrlich.

Sin embargo, entre las sustancias formadas en la

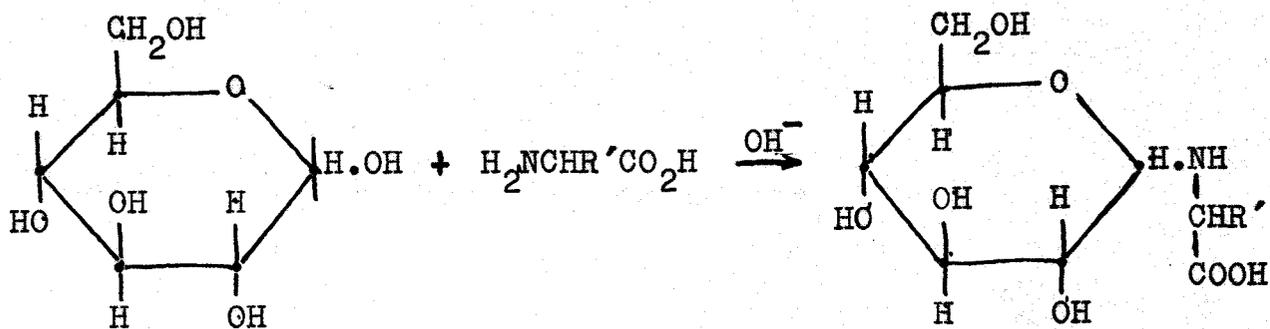
condensación alcalina de acetilacetona y D-glucosamina se ha identificado, como producto principal 2-metilpirrol, acompañado de 3-acetil-2-metilpirrol (67).

Según Cornforth la reacción transcurre de la siguiente forma:

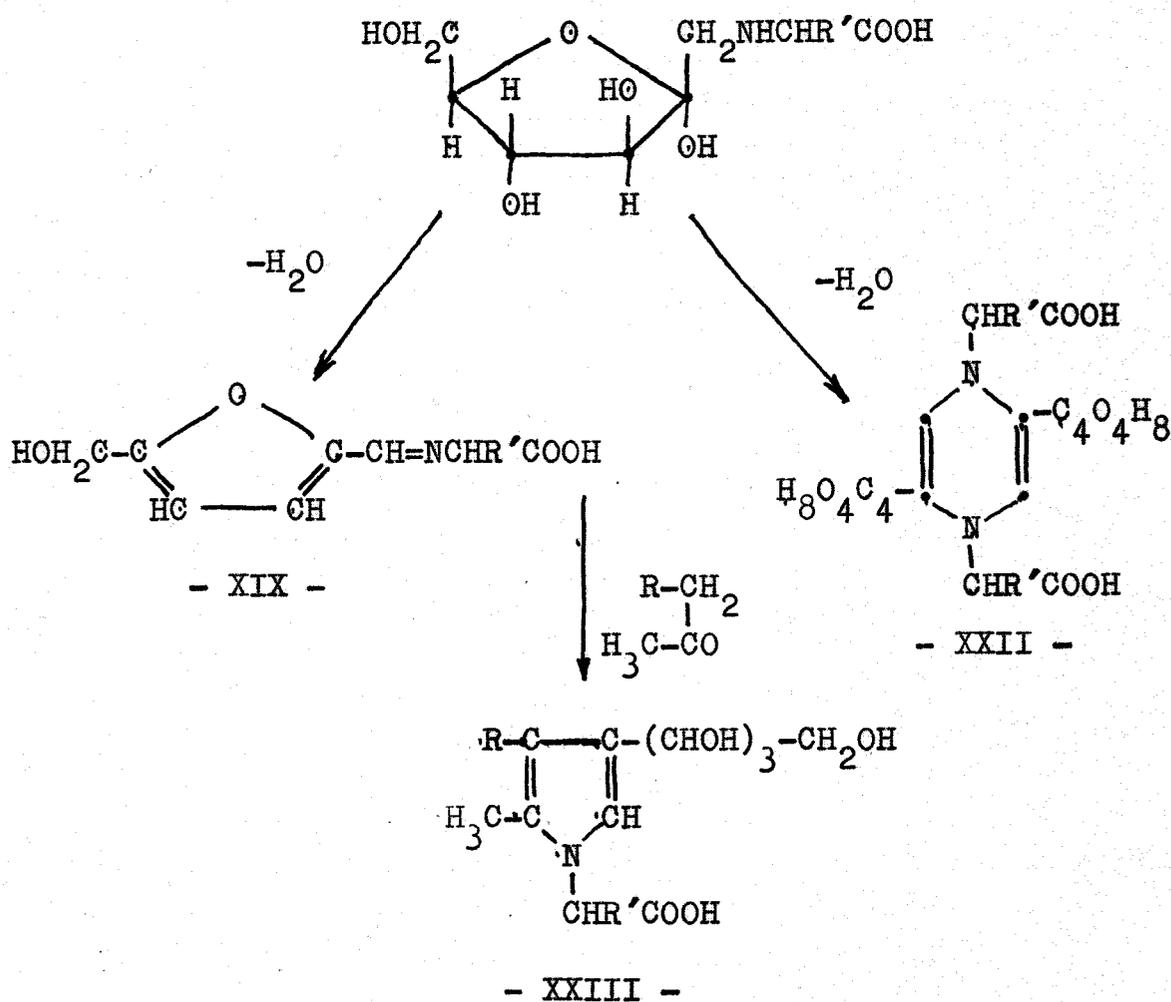


También se ha demostrado que fructosaminas y glicosilaminas originan, al condensar con acetilacetona o éster acetilacético (15)(20), derivados pirrólicos con cadena polialcohólica (XXIII), que forman cromógenos (XXIV) con el reactivo de Ehrlich.

Un esquema general de las interferencias observadas podría explicarse a través de las reacciones siguientes:

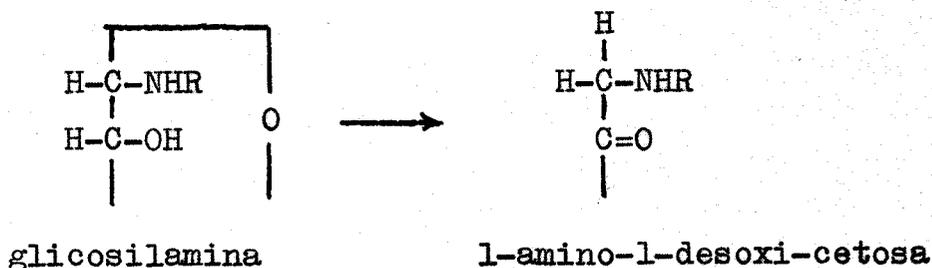


H^+
transpos.
de
Amadori



- . LA TRANSPOSICION de AMADORI . -

Hemos señalado que, tanto los supuestos mecanismos de la reacción de Maillard, como las interferencias en la reacción de Elson-Morgan, se verifican a través de compuestos intermedios, conocidos como glicosilaminas, que su fren una transposición a aminoazúcar. A esta transposición se le conoce con el nombre de " transposición de Amadori "



La primera síntesis de compuestos de este tipo fué realizada por Schiff (68), que obtuvo productos cristalinos al calentar anilina ó p-toluidina con D-glucosa anhidra. Posteriormente, Sorokin (69)(70)(71), empleando temperaturas más bajas aisló derivados de la glucosa, galactosa y fructosa con fenilamina.

Amadori hizo un estudio detenido de la reacción con aminas aromáticas, porque en ciertos casos se obtenían productos anormales (72)(73)(74)(75), con características distintas y la misma composición centesimal. Descubrió la presencia de dos isómeros, estructuralmente diferentes :

uno, más labil, que reconoció como una glicosilamina N-sustituida, y otro, estable, al que señaló erróneamente como una base de Schiff. El hecho de que esta base resistiese a la hidrólisis fué revisado por Kuhn, Dansi, Weygand y Birkofer (76)(77)(78) quienes demostraron se trataba del producto de una transposición molecular, catalizada por la presencia de ácido (79), y cuya estructura era l-amino-l-deso-xi-2-cetosa N-sustituida.

Esta transposición, llamada por Weygand transposición de Amadori, iba a ser de gran transcendencia, siendo el mismo Weygand(80) quien puso en evidencia su utilidad e importancia en química, al probar cómo se debía emplear la D-arabinosa, en vez de D-ribosa, en la preparación de riboflavina. Este tipo de reacción ha sido empleado con éxito en la preparación de osazonas (81), quinoxalinas (82) y en la síntesis del ácido fólico (83).

Al principio, solo se conocían productos cristalin^{os} de transposición de Amadori obtenidos a partir de la D-glucosa, D-manosa y 5-O-tritol-D-xilosa. Indirectamente, se conocía la existencia de los derivados de la D- y L-arabinosa, así como de la D-xilosa. De las experiencias realizadas por Strain y Spoehr(84) sobre la transposición de gliceraldehido a piruvaldehido en la presencia de aminas, y también de los trabajos de Smith (85) y Anderson (86), se deduce que las aldotriosas sufren igualmente la transposición de Amadori.

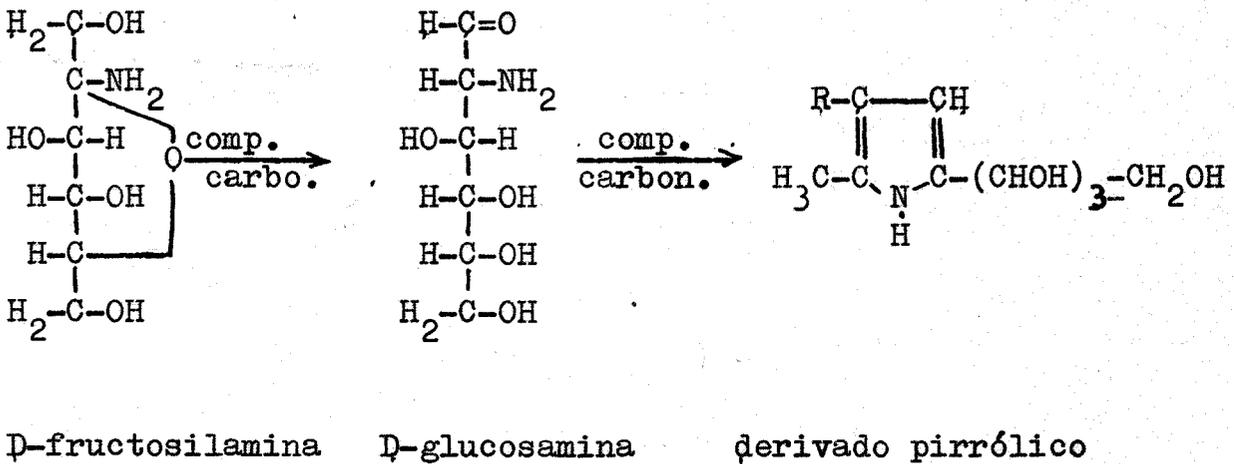
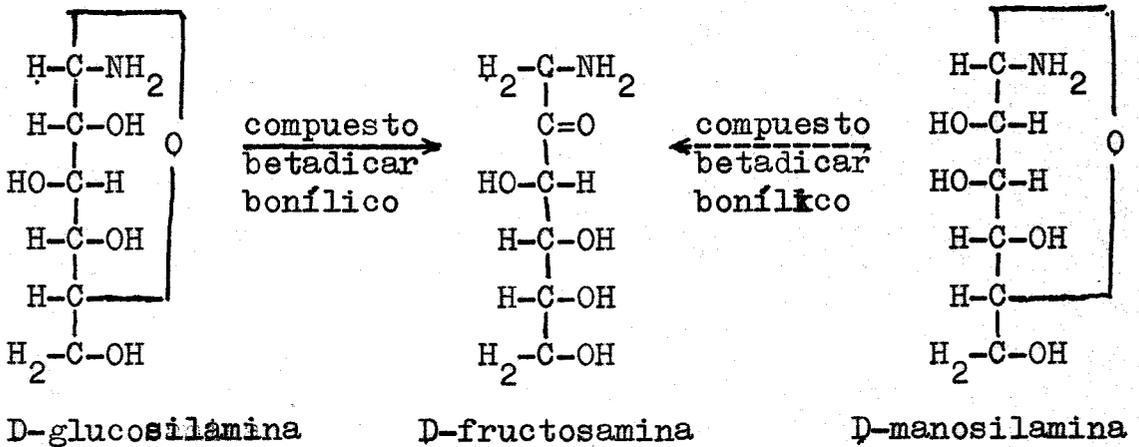
Respecto de la amina, se creyó que solo era extensible a las aromáticas. Con la fructosa solo se habían descrito derivados con amoniaco o aminas aromáticas hasta 1955 (71)(78)(87)(88)(89)(90) con rendimientos bajos y sin que se apreciara la transposición.

La reacción se hace extensiva a muchas aldósilaminas (91 - 97) y fructosilaminas (98 - 101), a raíz de los trabajos de Hodge y Rist (102)(103), que ampliaron las posibilidades de la reacción al descubrir que miembros de todo tipo de glicosilaminas N-sustituidas podían transponerse cuando se les trataba con compuestos que tuvieran un grupo metilénico reactivado, en presencia catalítica de amina secundaria.

Votoček y Valentin (104), trabajando con ramnosa y manosa en presencia de éster acetilacético, no consiguieron demostrar que estos azúcares experimentan la transposición al ser tratados con amoniaco gaseoso. Posteriormente, se ha descrito la reacción del amoniaco con aldosas para dar glicosilaminas ó diglicosilaminas, así como derivados de D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y sorbosa (100). La transposición se consigue partiendo de derivados 4,6-O-benziliden (96)(105), seguramente porque la sustitución en el C-6 estabiliza la forma carbonilo reactiva de la cetosa.

En trabajos recientes (20) se ha obtenido la transposición, por la acción catalítica de la acetilacetona ó el éster acetilacético, de N-glucósidos de aminas alifáticas,

glucosil-, manosil- y fructosilamina a los correspondientes aminoazúcares y N-arilderivados, siendo este trabajo el primer dato indirecto de la transposición de D-glucpsilamina a D-fructosamina . En la generalidad de las transposiciones , consiguen una mezcla del compuesto de Amadori y del derivado pirrólico, resultante de la condensación con el compuesto betadicarbonílico, que separan por extracciones con acetato de etilo, no recuperándose en ningun caso el glucósido de partida.



La transposición de fructosilaminas a 2-amino-2-desoxi-D-aldosas se ha llamado transposición de Amadori "inversa" ó "transposición de Heyns" , y ha sido objeto de diversos trabajos (100), especialmente en interés a la preparación de derivados de la D-glucosamina.

Aldosilaminas y fructosilaminas presentan un comportamiento distinto en relación con la transposición, debido tal vez a la distinta reactividad de los grupos aldehído y cetona. Aún no se ha encontrado el método por el cual las cetosilaminas derivadas de aminas aromáticas presentan transposición; en cambio, las aldosilaminas, cuyos derivados de aminas alifáticas primarias, presentan dificultades en condiciones normales, sufren la transposición en condiciones especiales (90)(106). Esta aparente dificultad puede ser motivada por la tendencia de estas sustancias a dar diglicosilaminas, como también le ocurre a la D-glucosamina (107). En cambio, derivados de alquilaminas secundarias sufren la transposición y no forman diglicosilaminas(108).

Cuando se hace reaccionar fructosa y amoníaco en la presencia de cloruro amónico el rendimiento es del 12%, que se eleva al doble si se emplea ácido oxálico como catalizador.

El estudio de la acción catalítica es de importancia para la elección de las condiciones de trabajo. Se ha estudiado el efecto catalítico de ácidos carboxílicos y fenoles en presencia de sus sales (109). El efecto decrece

con el aumento del pK del ácido, y para ácidos óptimos, los rendimientos se favorecen por la presencia de sus sales. Los fenoles son muy débiles para una catálisis adecuada. A veces, la presencia de bases reduce la velocidad de la reacción, probablemente por un efecto tampón sobre el ácido.

La transposición de Amadori se puede considerar, en general, como un tipo de catálisis ácido-base, con un equilibrio muy sensible entre diversas reacciones, que hace difícil la elección adecuada del sistema ácido-base.

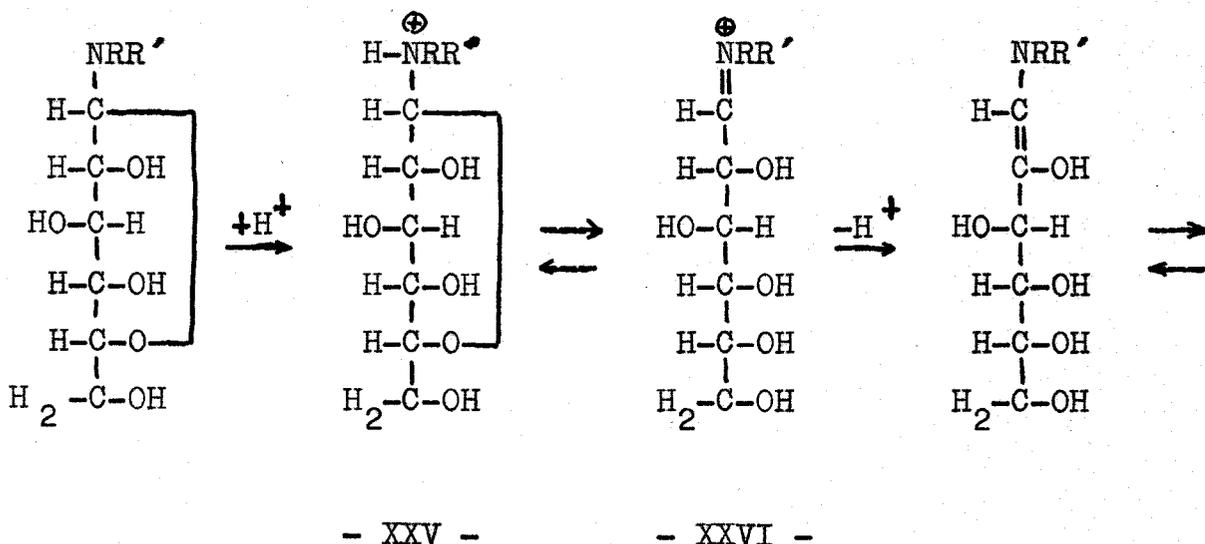
En el rendimiento de la reacción influye, no solo la naturaleza del catalizador, sino también el carácter más o menos básico de la amina reaccionante (57)(96)(110).

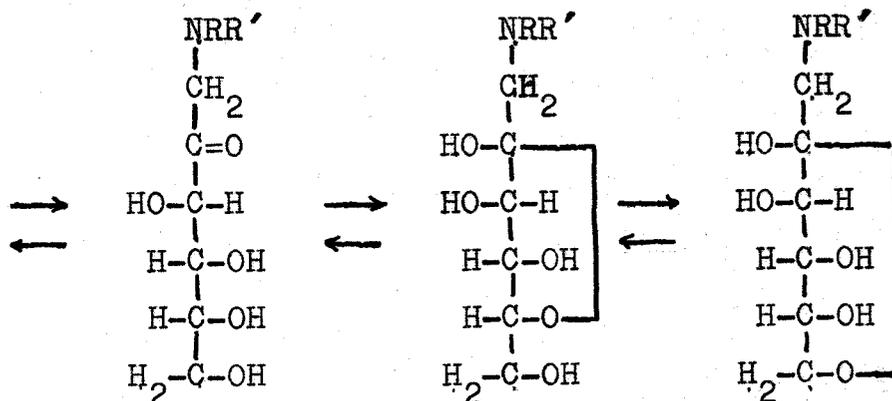
Aunque en la reacción toma parte un catalizador ácido, su pH viene determinado por el carácter básico de la amina, dependiendo el proceso de la basicidad de la glicilamina intermedia (111).

- . MECANISMO de la TRANSPOSICION de AMADORI . -

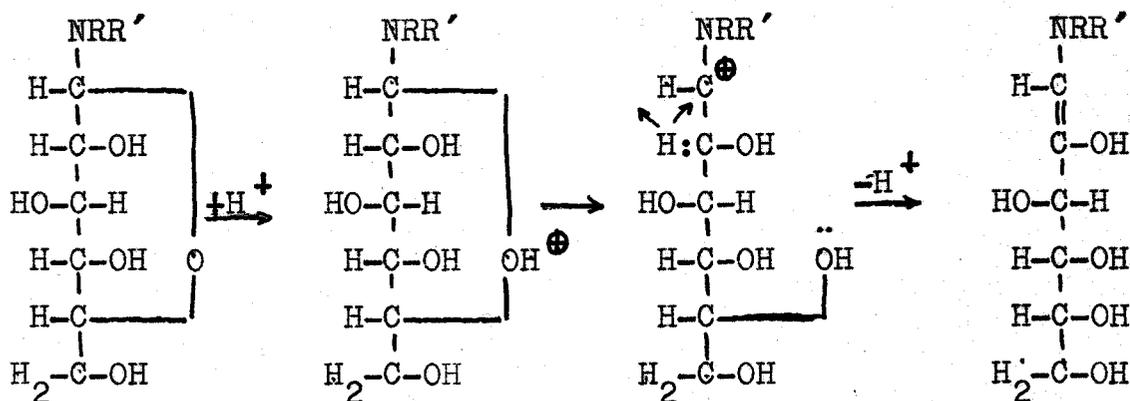
El mecanismo ha sido muy discutido y las conclusiones son todas especulativas. Resultados experimentales indican que, dejando estar azúcar y amina, el primer paso para la transposición es una condensación amina-azúcar con formación de una glicosilamina, de estructura tan lábil, que le hace posible dar origen a una gran variedad de reacciones. Esta propiedad se debe a su capacidad para facilitar electrones ó bien ayudar en su movimiento de una parte a otra de la molécula.

La interpretación de Weygand y Kuhn (77) del mecanismo de la transposición requiere la adición de un protón, del catalizador ácido, al átomo de N de la glicosilamina para formar un ión amonio (XXV) en equilibrio con el catión de una base de Schiff (XXVI):





Gottschalk (22), en cambio, establece otro mecanismo en el que el protón catalizador se adiciona al O del anillo, sin que haya formación de base de Schiff como producto intermedio:

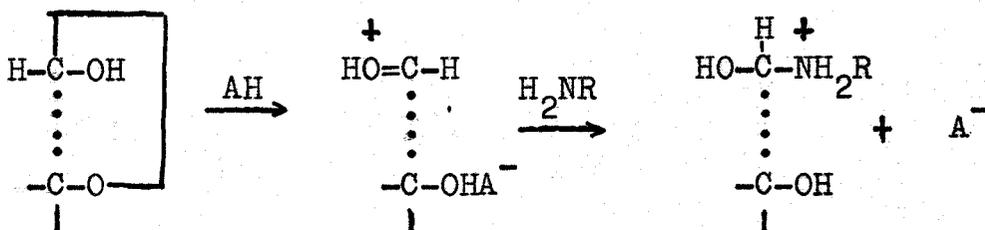


Isbell y Frush (112) sugieren también este modo de adición del protón y en un trabajo reciente (113) realizan un estudio teórico detenido de la reacción.

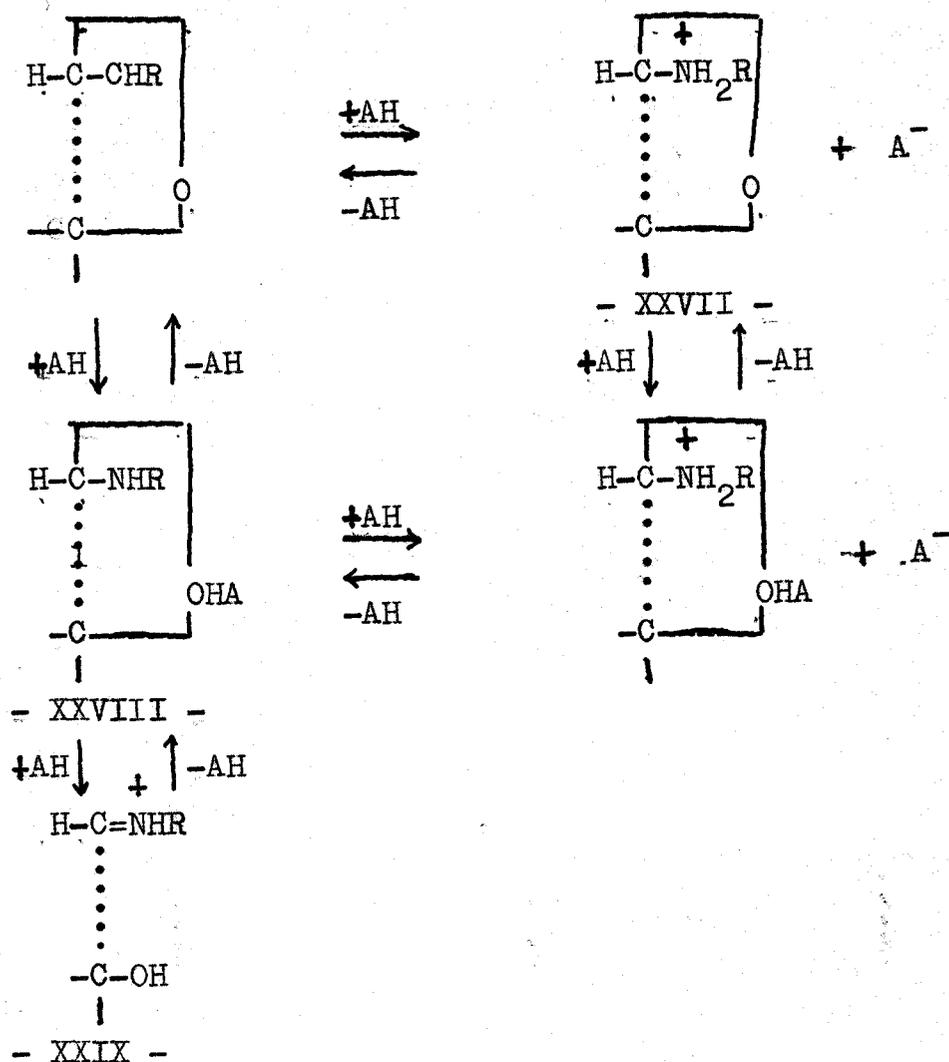
En primer lugar, demuestran que, en disolventes adecuados, las glicosilaminas, al igual que los azúcares, establecen un estado de equilibrio, en el que intervienen formas cíclicas y acíclicas, postulando que la conversión de una modificación en otra tiene lugar a través de un ión imonio, $[R-CH=NRR']^+$, formado por catálisis ácida.

El C-1 del ión tiende a adquirir electrones, haciendo posible distintos tipos de reacciones: mutarrotación, hidrólisis, transglicosilación y transposición.

La formación de glicosilamina (112) lleva consigo la adición inicial de RNH_2 a una de las formas abiertas del azúcar:



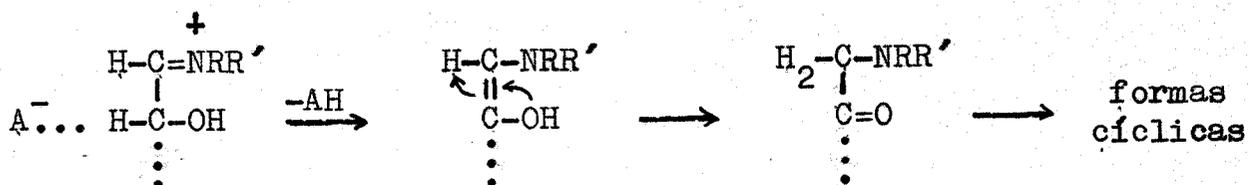
La condensación puede darse bien de una forma neutra, por modificación carbonílica del azúcar, ó bien a través del catión acíclico $[R-CH=OH]^+$, que se forma por catálisis ácida, hipótesis que explica la mayor o menor efectividad de la catálisis ácida para promover la formación de la glicosilamina. Este catión no condensa con el RNH_2 en soluciones ácidas fuertes, porque el carácter nucleofílico de la amina se satisface por combinación con H y formación de una sal amónica muy estable y poco reactiva.



Los factores que determinan la extensión de la reacción son el pH del medio y la basicidad de la glicosilamina. Cuando el componente amino es fuertemente básico, hay predominio de la sal amónica (XXVII) estable; en tanto que, para componentes debilmente básicos, la reacción predominante es la del protón hacia el átomo de O, con formación del compuesto (XXVIII). Para el paso siguiente en cambio - formación del ión imonio (XXIX) - son más favorables los componen

tes fuertemente básicos, que suministran electrones con mayor facilidad y favorecen el paso de electrones del N al átomo de C glucosídico. En el conjunto reaccionante se ha de establecer un equilibrio entre todas las reacciones.

La enolización del ión imonio tiene lugar por traslado del átomo de H del C-2 :



Esto es posible , porque un flujo de electrones hacia el átomo de N positivo deja al C-1 transitoriamente positivo, en tanto que un flujo secundario del C-2 al C-1 debilita el enlace de C-2, haciendo susceptible la eliminación de este H.

Aunque la transposición de una osa da lugar al aminoazúcar correspondiente , es posible que se forme en menor cuantía una mezcla de las aldosilaminas epiméricas (114). Es de interés la observación que estudios del metabolismo de la fructosa-C¹⁴ ha reconocido C¹⁴ en glucosa, fructosa y lactato (115).

El traslado del H del C-2 requiere un aceptor de protones , catalizador básico, que se ha creído procede del medio. Pero el fuerte efecto catalítico de los componentes metilénicos y ácidos carboxílicos, hace pensar en que el proceso es algo más que una simple catálisis ácido-base, debiendo ocurrir mecanismos intramoleculares, a través de una eno-

- . ASPECTOS BIOLÓGICOS COMUNES a
HIDRATOS de CARBONO y AMINOACIDOS . -

La fácil reaccionabilidad entre azúcares reductores y compuestos aminados se pone de manifiesto en reacciones biológicas de muy diversas procedencia. La formación y existencia de compuestos derivados de la interacción de azúcares con aminoácidos o proteínas se ha hecho patente a lo largo de numerosos trabajos, por la transcendencia que pueden llevar consigo. A ellos se le atribuye, por ejemplo, la disminución del valor nutritivo de proteínas, ó hidrolizados de proteínas, calentadas, ó dejadas estar, con monosacáridos (118), así como el empardecimiento, olor y cambio de solubilidad proteica en alimentos secos (103). Este hecho puede acarrear serias consecuencias en la preparación de conservas desecadas, como huevos y leche (119)(120), y en el empleo de técnicas de liofilización para preparaciones biológicas.

Compuestos como las glicosilaminas son de la mayor importancia biológica (121), pudiendo el componente amino proceder de ácidos nucleicos, ó de ciertas coenzimas y vitaminas. Las sales potásicas del ácido glucurónico forman fácilmente glicosilaminas inestables (122) cuando reaccionan con aminas aromáticas, compuestos que son metabolitos del cancerígeno 2-naftilamina. (123).

Hígados de mamíferos contienen enzimas asociadas con microsomas, que transfieren restos de glucosilurónico del ácido uridin-difosfato glucurónico a aminas aromáticas (124) .

Algunos microorganismos excretan un derivado del ácido antraⁿílico, que parece ser un intermedio en la síntesis del indol y triptófano, y que puede ser una fructosilamina o un producto de transposición de Amadori de la ribosilamina (125)(126).

Estudios realizados acerca del origen de la D-glucosamina señalan como precursores a la D-glucosa-6-fosfato en sistema con la glutamina (127) y fundamentalmente a la D-fructosa-6-fosfato (128) que con amoniaco, suministrado por sulfato amónico en preparaciones de riñón (129), origina hexosamina en presencia de cantidades catalíticas de N-acetil-glucosamina-6-fosfato. Ni la L-glutamina, ni la L-asparagina eran capaces de aportar en estas condiciones el grupo amino, ni la D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa ó D-ribosa la cadena carbonada. Esta conversión se observó no solo en preparaciones de riñón, sino también trabajando con extractos de hígado, cerebro, pulmón ó tejido intestinal.

Cuando se alimentan gallinas con glicocola-N¹⁵-C¹⁴, la relación N¹⁵: C¹⁴ en la D-glucosamina aislada del ovomucoide se hace cincuenta veces mayor que la relación en la glicocola original (131). Recientemente (130), se ha comprobado que el grupo amino del aminoazúcar procede en su mayor parte de aminoácidos, pero no su cadena carbonada.

También procedente de la glicocola se ha encontrado N¹⁵ como constituyente de los núcleos de pirrol de moléculas de porfirinas y porfobilinógeno (132).

En el hígado se ha puesto en evidencia la existencia de compuestos fructosa-aminoácidos, glucosa-aminoácidos, así como la posible existencia de fructosa-péptidos (133).

Ya en 1.955 se habían aislado del hígado de mamíferos (56) compuestos del tipo 1-amino-1-desoxi-2-cetohexosa N-sustituida, que estimulaban la incorporación in vitro de aminoácidos a las proteínas de ciertas células. La parte azucarada del compuesto tenía configuración de fructosa, y los aminoácidos glicocola y alanina, fueron reconocidos por separación mediante hidrólisis.

A partir de mucoproteínas, y por la acción del virus de la gripe, se han obtenido compuestos cuyas estructuras parecen corresponder a D-fructosaminas N-sustituidas (22) (134)(135).

En la hidrólisis clorhídrica ó sulfúrica de los glucoproteidos se había observado que solo se libera del 60 al 80 % de las osas (136)(137). Este comportamiento se atribuye (138) a la estabilidad de los enlaces osas-aminoácidos (ó proteínas), que radica en la irreversibilidad general de la reacción (139), al formarse el aminoazúcar a través de una transposición de Amadori.

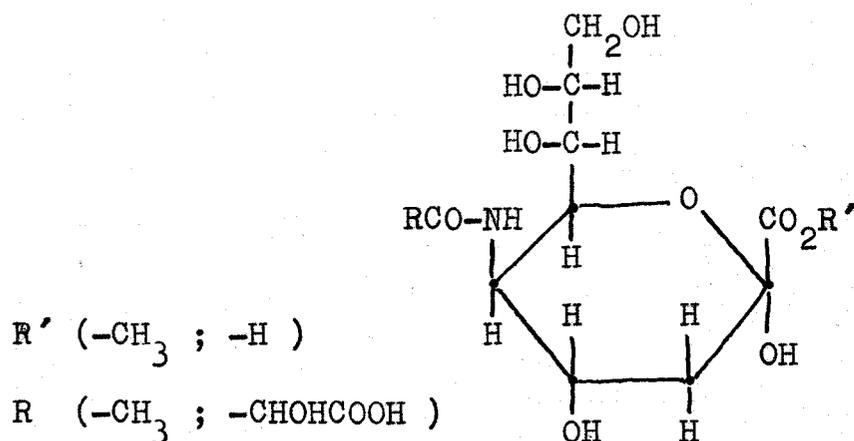
Por otro lado, es de gran interés el significado biológico de los aminoazúcares, componentes fundamentales de los tejidos y líquidos orgánicos animales y bacterianos. Los aminoazúcares se asocian frecuentemente con otras hexosas, de una parte, y con proteínas y lípidos, de otra, para dar lugar a macromoléculas complejas de mucoproteínas y mucolípidos.

Muchas de estas macromoléculas dan la reacción de Ehrlich directa, que hemos estudiado para los núcleos de pi

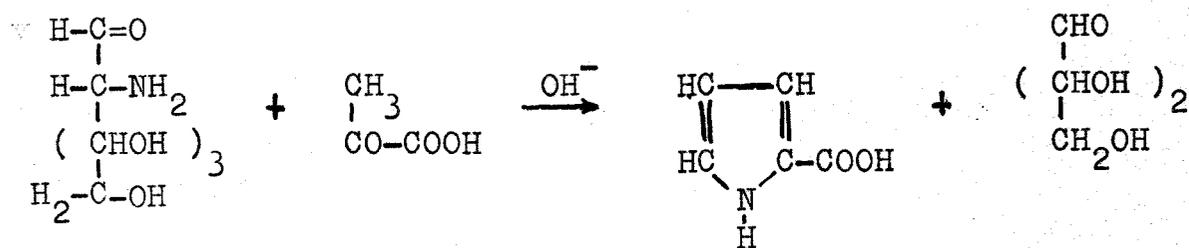
prol. La investigación de las sustancias que causan esta reacción ha llevado al descubrimiento que en un gran número de mucoproteínas de interés biológico existe un importante grupo de compuestos de nueve o más átomos de carbono γ híbridos de azúcares y aminoácidos -, conocidos con el nombre de ácidos "sialícos", nonulosamínicos o más exactamente amino-carboxi-desoxi-nonulosas.

Estos compuestos, en cuyas estructuras participan un grupo carbonilo, un grupo amino, un grupo carboxilo y , con frecuencia, un grupo acílico (metoxilo, acetilo o glicolilo), desempeñan un papel biológico de notable importancia en los procesos de defensa del organismo. En virtud de su grupo carboxilo puede considerarseles como polihidroxi- α -aminoácidos, y aquí radica la mayor parte del interés de estos compuestos, ya que tienen la posibilidad de entrar en combinación con otros azúcares y aminoácidos a través de enlaces glucosídicos y péptidos, actuando de puente químico entre polipéptidos y polisacáridos.

El estudio químico les ha podido señalar la estructura general (XXX) :



Por tratamiento con álcalis se transforman con facilidad en el ácido 2-pirrolcarboxílico (XXXI), que se obtiene con rendimientos muy elevados al calentar ácido pirúvico con D-glucosamina a pH alcalino (140) :

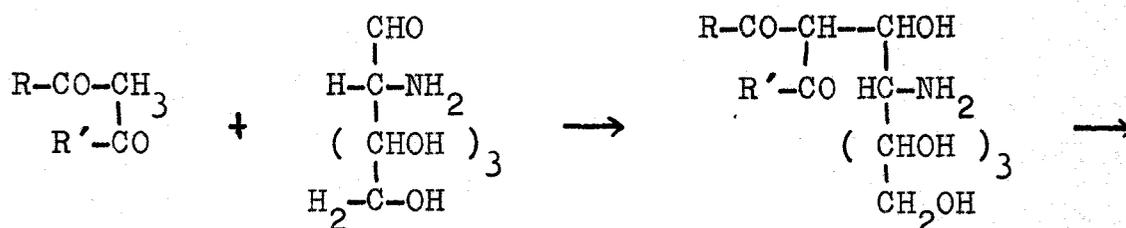


- XXXI -

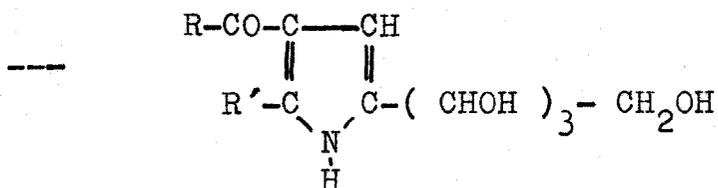
Estos datos hacen suponer a Gottschalk que los ácidos nonulosamínicos pueden resultar de una condensación aldólica. En su apoyo viene el hecho que en condiciones semejantes (141) el ácido oxalacético y la N-acetil-D-glucosamina producen varios compuestos, uno de los cuales concuerda en propiedades con el ácido N-acetil-siálico.

En relación con la hipótesis de Gottschalk para la síntesis de ácidos siálicos puede estar la reacción, estudiada por García Gonzalez (142) entre azúcares, ó aminoazúcares, reductores y compuestos betadicarbonílicos.

En el caso de los aminoazúcares se forman derivados del pirrol a través de un compuesto intermedio (XXXII), aislado para el caso del furano (143), que es el producto de la condensación aldólica. Es posible que en las condiciones ácidas de la reacción de Ehrlich el ácido nonulosamínico se ciclice a un núcleo de pirrol, causante del cromógeno con el reactivo :



- XXXII -



PARTE TEÓRICA

II .- Descripción de nuevos pirroles.

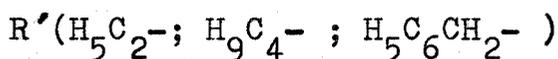
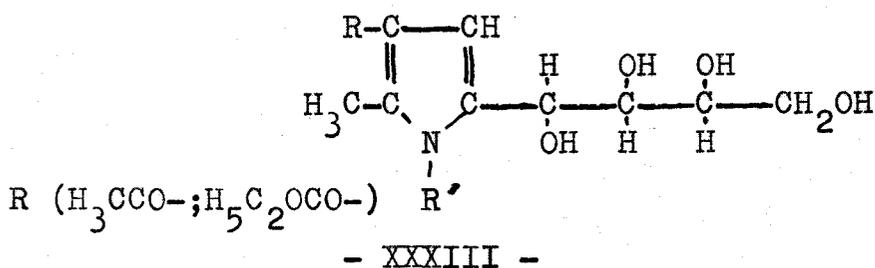
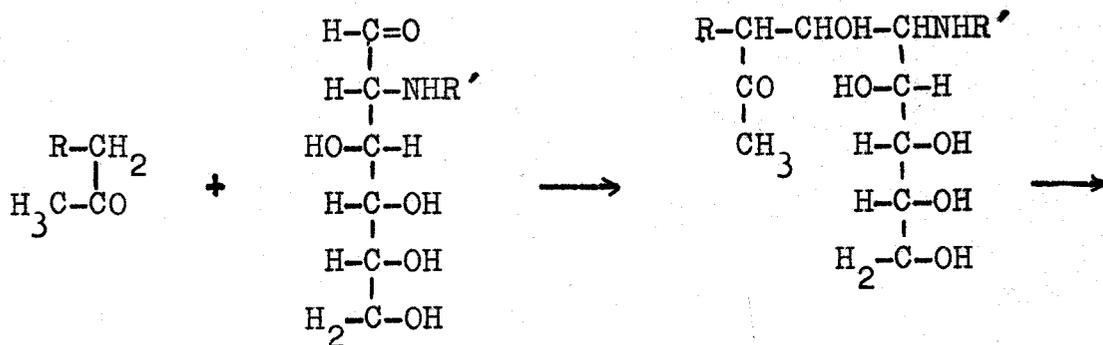
- . NUEVOS PIRROLES con CADENA POLIALCOHOLICA . -

La condensación entre un aminoazúcar y los compuestos betadicarbonílicos para dar lugar a compuestos derivados del pirrol con cadena polialcohólica, la hemos llevado a cabo con aminoazúcares aún no experimentados y su estudio se puede desarrollar en tres apartados:

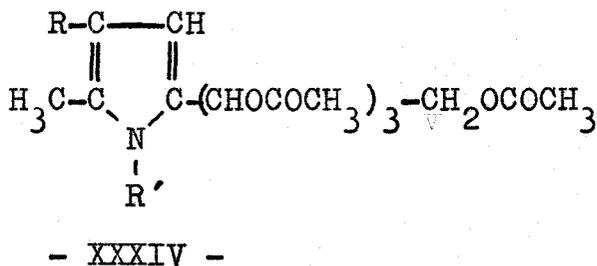
- A) Condensación de éster acetilacético y acetilacetona con N-alquil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa. -

Se ha hecho reaccionar éster acetilacético y acetilacetona en solución alcohólica a la temperatura ambiente con los compuestos N-bencil-D-glucosamina, N-etil-D-glucosamina y N-butil-D-glucosamina. Estas sustancias han sido obtenidas a partir de la D-fructosa y las bencil-, etil- y butilaminas respectivamente, a través de una transposición de Amadori "inversa". En la condensación se aislan productos cristalinos que dan color rojo-violeta con el reactivo de Ehrlich en caliente - posición α sustituida - y a los que se les asignan estructuras con núcleo de pirrol (XXXIII).

La reacción suponemos transcurre según el siguiente esquema:

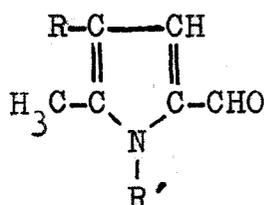


Los resultados obtenidos en la valoración de las cadenas polialcohólicas de estos condensados con ácido periódico señalan la existencia de cuatro hidroxilos contiguos. El análisis de los derivados acetilados (XXXIV) cristalinos preparados denotan la presencia de cuatro grupos acetilos en la cadena :



En el caso del 1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidro xibutil-3-acetil pirrol no se ha conseguido obtener el derivado acetilado en estado cristalino.

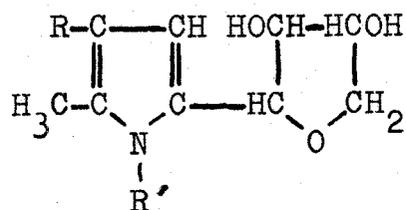
Al oxidar los compuestos del tipo (XXXIII) con metaperiodato sódico se aislan los correspondientes aldehidos (XXXV) al estado cristalino :



- XXXV -

Cuando la oxidación se intenta partiendo de soluciones acuosas muy concentradas de los condensados obtenidos a partir de la acetilacetona con la N-etil- ó N-butil-D-glucosamina, se separan rápidamente compuestos cristalinos cuyo punto de fusión , cromatografía y rotación óptica coinciden con los de los compuestos obtenidos calentando los mismos condensados a 50° durante unas horas en solución acuosa concentrada.

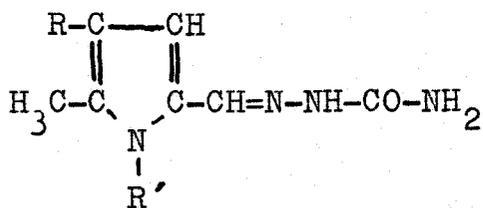
Estas circunstancias y el hecho de que en ninguno de los dos compuestos separados se haya podido formar la semicarbazona correspondiente, nos hace pensar en una anhidrización de la cadena polialcohólica motivada por la acidez del medio, que concuerda con la rotación óptica tan elevada que presentan y el método a través del cual se han obtenido:



- XXXVI -

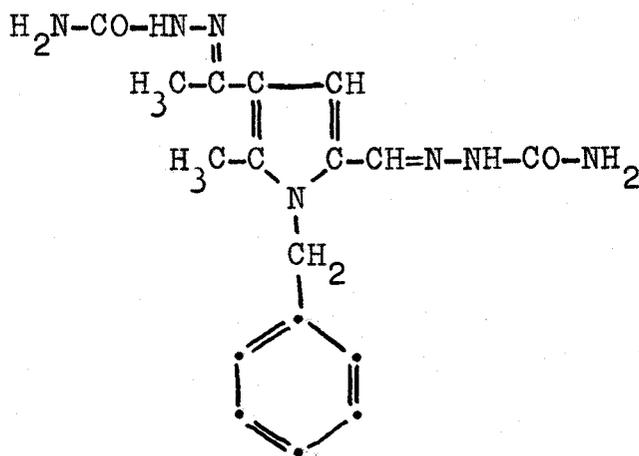
La valoración de la cadena polialcohólica con ácido periódico viene a corroborar la supuesta estructura anhídrida (XXXVI) señalando la presencia de dos hidroxilos en la cadena.

De los aldehidos (XXXV) se obtienen las semicarbazonas cristalinas (XXXVII) al ser tratados con semicarbazida :



- XXXVII -

Los resultados analíticos de la semicarbazona procedente de 1-bencil-2-metil-5-formil-3-acetil pirrol indican la entrada de dos restos de semicarbazona, uno de ellos posiblemente en el carbonilo del grupo acetil (XXXVIII):



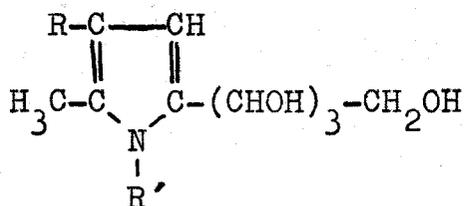
- XXXVIII -

Para los derivados N-etil- y N-butil- del mismo condensado parece que se forma - según los resultados de los análisis - una mezcla de los dos tipos de semicarbazonas descritas.

B) Reacción de fructosilaminas con éster acetilacético y acetilacetona. -

Cuando se hace reaccionar D-fructosa con n-butilamina se obtiene directamente N-butil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, pero trabajando con etilamina ó bencilamina se aísla el fructosilderivado correspondiente. En las condensaciones descritas en el apartado anterior hemos partido del aminoazúcar, obtenido a través de una transposición de Amadori "inversa", catalizada por ácido acético, según Carson (99).

Los mismos derivados del pirrol, aislados al condensar los N-alquilderivados de la D-glucosamina, se obtienen, con buenos rendimientos, poniendo en interacción fructosiletilamina ó fructosilbencilamina con éster acetilacético ó acetilacetona.

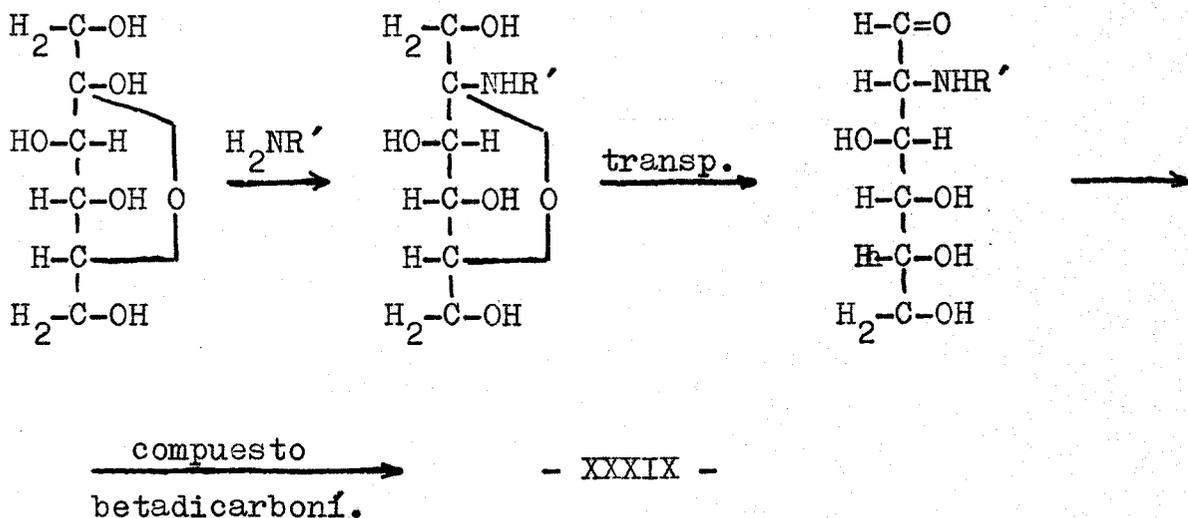


- XXXIX -

R (CH₃- ; H₅C₂OOC-)

R' (H₃CCH₂- ; H₅C₆CH₂-)

En este caso existe una transposición de fructosilalquilamina a N-alquil-D-glucosamina, catalizada por el compuesto betadicarbonílico que, en exceso, condensa para originar el derivado de pirrol correspondiente:



La acción catalítica de los compuestos betadicarbonílicos, éster acetilacético y acetilacetona, hacen extensible a las alquilfructosilaminas la transposición de Amadori "inversa", al actuar como pseudoácidos.

La reacción transcurre con excelentes rendimientos al dejar estar los compuestos a la temperatura ambiente, en solución alcohólica, durante dos días.

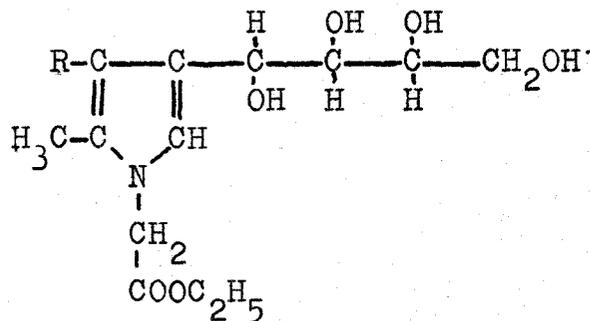
En el caso del N-etil-D-fructosilamina con la acetilacetona no hemos podido aislar el derivado de pirrol cristalino, pero sí hemos detectado su presencia en el líquido de reacción por cromatografía.

Hemos podido comprobar que la presencia de cantidades catalíticas de piperidina no afecta a los rendimientos, tal vez porque el sistema catalítico ácido-base requerido para la transposición sea ya suministrado por el compuesto β -tadicarbonílico y la amina.

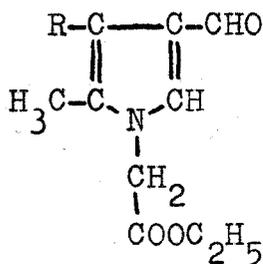
C) Condensación de éster acetilacético y acetilacetona con compuestos azúcar-aminoácidos. -

También, hemos obtenido compuestos con núcleo de pirrol y cadena polialcohólica a partir de fructosaminas N-sustituidas, cuyo grupo amino procede de un aminoácido.

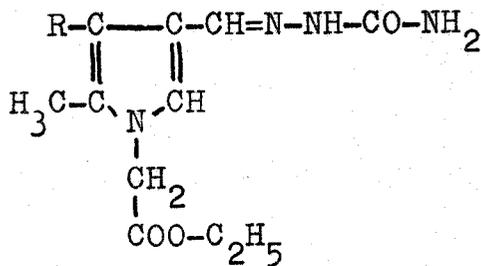
Un derivado de la glicocola, el 1-aminogliciléster -1-desoxi-D-fructosa, obtenido a partir de D-glucosa y el éster etílico de la glicocola (46), se condensa en las mismas condiciones de trabajo experimentadas anteriormente con éster acetilacético y acetilacetona, obteniéndose en cada caso los derivados de pirrol correspondientes (XL) :



A partir de estas sustancias, aisladas al estado cristalino, hemos obtenido por oxidación de la cadena poli alcohólica con metaperiodato sódico, los aldehidos (XLI) y de estos las semicarbazonas (XLII):



- XLI -



- XLII -

El tratamiento con anhídrido acético en piridina de estos condensados no conduce, como en otros casos, a la separación de los derivados acetilados en estado cristalino, sino que se obtienen en estado de sirupo.

El análisis elemental de cada una de estas sustancias responde plenamente a las estructuras descritas. Estas estructuras aportan un dato explicativo del mecanismo a través del cual los aminoácidos, en presencia de azúcares reductores falsean la valoración de aminoazúcares por el método de Elson-Morgan, según vimos al estudiar las interferencias producidas.

Este tipo de reacción que estudiamos presenta gran interés si se tiene en cuenta que el aminoazúcar que condensa con los compuestos betadicarbonílicos se pueden obtener a partir de hidrato de carbono y aminoácido por una transposición de Amadori, transposición que puede ser catalizada por los mismos compuestos betadicarbonílicos.

Estudiamos, pues, un tipo de reacción en el que pueden tomar parte, al menos desde un punto de vista teórico, el metabolismo de los hidratos de carbono a través de la D-glucosa, el metabolismo de las grasas con la aportación de los compuestos betadicarbonílicos y el metabolismo proteico suministrando el aminoácido portador del grupo amino.

En apoyo de este interés tenemos el hecho, demostrado por D. Shemin (132), que N^{15} procedente de glicocola marcada se encuentra formando parte de núcleos de pirrol de las porfirinas de la hemoglobina sanguínea.

- . ESPECTROS de ABSORCION ULTRAVIOLETA de PIRROLES
con CADENA POLIALCOHOLICA . -

Junto con el estudio químico de estos nuevos derivados del pirrol hemos realizado el estudio de sus espectros de absorción ultravioleta, en unión con los de los pirroles no sustituidos en el nitrógeno, a fin de aportar algunos datos a las propiedades físico-químicas de estos compuestos, y sacar algunas conclusiones en correlación con los datos ya existentes en la bibliografía, no muy numerosos ni concluyentes, en especial en lo que hace referencia a derivados N-sustituidos del núcleo pirrol.

Según quedó establecido por Braude (145), el pirrol posee una fuerte banda A en la región de $210 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 15.000$) y otra débil B en la $240 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 300$).

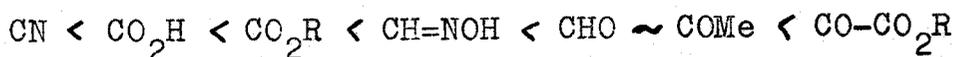
Años más tarde, Cookson (146) observó que la alquilsustitución origina una disminución en la banda A y tiende a la desaparición de la banda B.

Estos efectos hipocrómicos (disminución en la intensidad de absorcción) fueron confirmados recientemente por los trabajos de Eisner y Gore (147). La banda B desaparecía en pirroles con sustituyentes simples, como cadenas hidrocarbonadas: metilo, etilo, isopropilo, etc..., ó se desplazaba $20 \text{ m}\mu$ hacia el visible con sustituciones más complejas.

Sustituyentes con efecto mesomérico -M hacen surgir una nueva banda, denominada K, del alemán "konjugierte", por

que es debida a la conjugación de grupos cromóferos, y cuyos valores de ϵ son más bien función de la posición de la sustitución que del tipo del sustituyente, fenómeno que no se observa en los sistemas bencénicos.

Según su poder conjugativo los grupos -M se pueden ordenar de la siguiente manera:



La entrada de un grupo OH en una cetona para dar un ácido ejerce un efecto hipsocrómico (disminución de la longitud de onda), efecto que hemos podido comprobar al confrontar los datos expresados en la tabla I.

A través de los datos experimentales se ha puesto de manifiesto una desviación de la banda K en unas 7 m μ hacia el rojo, para cada grupo alquily, con independencia de la posición de sustitución.

A veces se aprecian interferencias estéricas entre un grupo alquily y un sustituyente cromófero vecino, principalmente si la posición es 2-5, más que la 3-4. Tal vez sea una consecuencia de una reducción de la interacción de electrones π entre el sustituyente y el núcleo de pirrol, disminuyendo el valor de ϵ , ó produciendo una desviación hipsocrómica. En general, el tipo de espectro ultravioleta, producido por la absorción de un núcleo de pirrol conjugado con un cromófero, depende de la posición de la sustitución. Pirroles betasustituidos absorben en λ más corta, unas 15 a 20 m μ , que el correspondiente derivado alfa sustituido.

Nosotros hemos podido observar en pirroles cuyo sustituyente -M es un grupo carboxilato, CO_2Et , que el valor de ξ en la banda K, originada por el grupo cromóforo, es menor para sustituciones 3-5 (cadena en posición alfa), fig. 11, que en sustituciones 3-4 (cadena en posición beta), fig. 1.

Cuando el grupo -M es el acetilo, COMe, existe además un efecto hipsocrómico de la posición alfa frente a la beta, como puede apreciarse al comparar las fig. 5 y 13. En las otras zonas se nota, para ambos tipos de sustituyentes -M, una disminución en la longitud de onda de la posición alfa con respecto de la beta.

También encontramos ciertas diferencias cuando una cadena polialcohólica sustituye a un grupo metilo, más acentuadas en pirroles con grupos COMe que con grupos CO_2Et , según podemos observar al comparar en la tabla II las fig. 11 y 13 con los datos aportados Eisner (147) para grupos metilos en lugar de cadena polialcohólica.

La anhidrización de la cadena dando lugar a un grupo dihidroxi-dihidrofurano solo ejerce una ligera variación sobre las longitudes de onda e intensidades de absorción, con patente efecto hipercrómico para la banda A, fig. 6-7 y 8-9.

Según Pappalardo (148), la diferencia que se origina entre una sustitución de un radical en un C del núcleo y una sustitución del mismo radical en el N, se manifiesta principalmente en una inversión de las intensidades de las bandas de absorción. Así, al confrontar los espectros del α -acetilpirrol y del N-acetilpirrol, originado por una transposición del

anterior, se observa que, si bien en el primero se presenta una banda A pronunciada, de elevada intensidad, y una banda B esfumada en una zona de inflexión, en el segundo se da precisamente lo contrario. En el mismo trabajo señala que la N-metilación no parece producir modificación profunda en los espectros. Las zonas de absorción encontradas por él son las mismas y solo se hace notar un efecto hipocrómico.

En nuestros derivados N-sustituídos con $R=CO_2Et$ solo se confirma para la zona A en el caso del etil derivado, apareciendo para el caso del butil un efecto contrario ó hipercrómico. Para los derivados en que $R = COMe$ se pueden hacer las mismas consideraciones para las bandas B y K, apa-reciendo además un máximo intenso en la banda A.

En aquellos otros casos en que el N posee como sustituyente un grupo cromóforo aislado por un grupo alquil, $-CH_2-$, es decir, no conjugado con el núcleo de pirrol, ape-nas se hace notar la presencia de tal grupo. En el caso que el cromóforo sea $-CH_2-CO_2Et$ se obtienen resultados que conuerden con los señalados anteriormente para sustituyentes alquílicos en las zonas A y B. En cambio, para la zona K no se aprecia la menor variación cuando $R = COMe$, fg. 14, y solo para $R=CO_2Et$ se presenta un punto de inflexión como consecuencia de un incremento en la absorción de la zona del mínimo, fig. 12.

Cuando el cromóforo no conjugado es el grupo $-CH_2C_6H_5$ se comporta también como un sustituyente alquílico, con la particularidad de presentar para $R = CO_2Et$ un punto de inflexión en vez de un máximo, en la zona A, con un efecto hipercrómico, como en el caso del butilo, en vez de hipocrómico.

T A B L A I

Z O N A S de M A X I M A A B S O R C I O N

Fig.	Posición sustituida					banda A		banda B		banda K	
	1	2	3	4	5	λ	ϵ	λ	ϵ	λ	ϵ
1	H	Me	CO ₂ Et	H	cadena	230*	8880	---	---	264	7400
2	Et	"	"	"	"	235	8139	---	---	261	6651
3	But	"	"	"	"	236	9372	---	---	261	7139
4	Benc	"	"	"	"	235*	11361	---	---	261	8111
5	H	"	COMe	"	"	---	---	246	6890	290	5236
6	Et	"	"	"	"	217	16160	255	8517	288	6196
7	"	"	"	"	anhidr.	219	20982	252	7827	285	6034
8	But	"	"	"	cadena	218	15609	256	8634	287	6463
9	"	"	"	"	anhidr.	220	18243	251	7268	283	5463
10	Benc	"	"	"	cadena	---	---	252	8666	286	5666
11	H	"	CO ₂ Et	cadena	H	235	7796	---	---	263	6571
12	CH ₂ O ₂ Et	"	"	"	"	238	8483	---	---	258*	6322
13	H	"	COMe	"	"	---	---	255	8132	275*	6100
14	CH ₂ OEt	"	"	"	"	---	---	258	10258	275*	7580

Las longitudes de onda marcadas con asterisco corresponden a puntos de inflexión.

T A B L A I I

Z O N A S d e M A X I M A A B S O R C I O N

Posición sustituida					banda A		banda B		banda K	
1	2	3	4	5	λ	ϵ	λ	ϵ	λ	ϵ
H	Me	CO ₂ Et	Me	H	232	9000	---	---	258	5300
"	"	"	cadena	"	235	7796	---	---	263	6571
"	"	COMe	Me	"	209	10300	250	10400	282	4900
"	"	"	cadena	"	---	---	255	8132	275*	6100

La longitud de onda con asterisco corresponde a un punto de inflexión.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

M A T E R I A S P R I M A S

OBTENCION de FRUCTOSILBENCILAMINA . - (99)

30 gr. de D-fructosa anhidra y 135 gr. de bencilamina se mezclan y deja estar a 0° C durante 24 horas y después tres días a la temperatura ambiente. El exceso de bencilamina se elimina agitando con 300 c.c. de éter de petróleo de 60-70°, repitiendo la agitación tres veces. El aceite espeso amarillo que se obtiene se disuelve en 250 c.c. de éter comercial secado con cloruro cálcico y se deja en nevera hasta que cristalice. Se obtienen 23 gr. de cristales blancos que se recrystalizan de acetona. P. f.: 107-8° C. Es un producto muy inestable que ha de conservarse en nevera.

Hemos modificado la técnica de Carson, que lava el aceite espeso con éter absoluto - exento de alcohol - en el que no se disuelve, evaporando al vacío hasta sirupo la solución del aceite-lavado en 250 c.c. de metanol absoluto. El sirupo lo disuelve en 250 c.c. de acetona, que concentra hasta 100 c.c., donde cristaliza el compuesto al dejar la solución en nevera.

OBTENCION de 2-bencilamino-2-desoxi-D-glucosa. - (99)

Una solución de 5 gr. fructosilbencilamina en 400 c.c. de metanol absoluto conteniendo 1 c.c. de ácido acético se deja estar a 24-26° C. durante 40-48 horas. La solución de color ámbar se concentra al vacío hasta 25 c.c., se le añaden 50 c.c. de etanol absoluto y se concentra hasta 20 c.c. Se le adiciona 60 c.c. de acetona, se siembra y cristaliza enseguida. Después de dos días a cero grados se filtra, obteniéndose 2,75 gr. (55%) de producto que se recristaliza de etanol-acetona 1:1 . Punto de fusión: 157-8° C (con desc.)

OBTENCION de D-FRUCTOSILETILAMINA. - (93)(98)

52 gr. de D-fructosa y 130 gr. de etilamina anhidra previamente enfriada a -20° C, se agitan durante cinco minutos hasta solución completa. La solución se mantiene durante dos días a -20° C y después otros cinco a -0° C. La solución amarilla se concentra al vacío hasta sirupo, que se disuelve en 200 c.c. de metanol absoluto, concentrando a vacío hasta 100 c.c. Se deja tres días a -20° C cristalizando un producto que funde a 100° C. Se obtienen 49 gr. que se han de conservar en metanol frío.

OBTENCION de 2-etilamino-2-desoxi-D-glucosa. - (93)(98)

Una solución de 5 gr. de frustosiletilamina en 250 c.c. de metanol con 0,2 c.c. de ácido acético se dejan estar a 24-6° C durante un día. La solución incolora se vuelve amarilla a las ocho horas y ámbar a las veinticuatro horas. Al cabo de este tiempo se concentra a vacío hasta un volumen de 15 c.c. y se añaden 45 c.c. de acetona. Tras sembrar y dejar varios días en nevera se recogen 1,8 gramos de un producto semicristalino y amarillño que se cristaliza en 20 c.c. de metanol y 50 c.c. de acetona. P.f.:138-9° C.

OBTENCION de 2-n-butilamino-2-desoxi-D-glucosa. - (93)(98)

40 gr. de D-fructosa se mezclan con 130 gr. de n-butilamina anhidra, previamente enfriada a -20° C. La mezcla se agita hasta solución completa y se deja durante dos días a -20° C y cuatro más a 0° C. La solución amarillenta se concentra a vacío, enfriando con hielo, hasta sirupo que se disuelve en 100 c.c. de acetona, se siembra y se deja en nevera durante una semana para que cristalice. De las aguas madres se vuelve a obtener una segunda fracción. En total se obtienen 9,3 gr. de producto que se disuelven en 100c.c. de metanol hirviendo y se le añaden 200 c.c. de acetona, cristalizando en nevera. P. f.: $147-8^{\circ}$ C.

OBTENCION del ESTER ETILICO de la GLICOCOLA. - (144)

Una mezcla conteniendo 12,8 gr. de cloruro amónico y 11,7 gr. del clorhidrato de glicocola se tratan con 40 c.c. de etanol absoluto y se hace pasar una fuerte corriente de cloruro de hidrógeno seco. Se filtra todavía caliente y se deja cristalizar el clorhidrato del éster de la glicocola. Rendimiento: 11 gr.

Para obtener el éster libre se disuelven 50 gr. del clorhidrato en 25 c.c. de agua y se le agregan 100c.c. de éter, además de-bajo fuerte enfriamiento- 40c.c. de NaOH al 33%. Luego se adicionan trozos de carbonato potásico seco hasta formar una papilla espesa. Se agita, se separa el éter y se extrae dos veces con más éter. La disolución después de varias horas con CO_3K_2 y don Oca , se agita frecuentemente durante diez minutos con más CO_3K_2 y varias horas con SO_4Na_2 . Se destila a vacío recogiendo un aceite que a 18 mm. hierve a 56-8°C.

OBTENCION de N-D-glucosilglicocola etiléster. - (46)

66 gr. del éster etílico de la glicocola, recientemente preparado, se añaden a una suspensión de 115 gr. de D-glucosa anhidra en 200 c.c. de etanol absoluto y la mezcla se agita mecánicamente a la vez que se calienta a reflujo y se protege de la humedad con un tubo de cloruro cálcico. Al cabo de unos 75 minutos se ha disuelto toda la glucosa, se elimina al vacío unos 150 c.c. de etanol y al sirupo resultante se le añaden 150 c.c. de acetona. Se siembra y se deja estar una noche a la temperatura ambiente para que complete la cristalización. Se recrystaliza varias veces a partes iguales de etanol absoluto caliente. P.f.: 108° C. Rendimiento: 50 gramos (30%).

OBTENCION de 1-amino-gliciléster-1-desoxi-D-fructosa.-(103)

5 gr. de D-glucosilglicocola etiléster se disuelven en 25 c.c. de etanol absoluto caliente y se añaden 25 c.c. de malonato de etilo con dos gotas de piperidina. La solución incolora se calienta a reflujo durante media hora y el color cambia del amarillo al naranja, para terminar rojo.

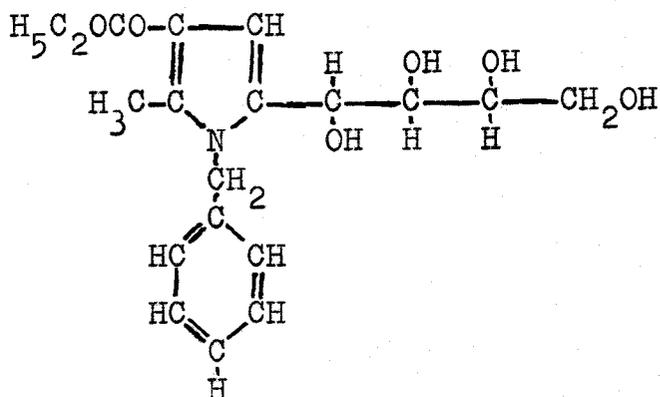
Después de enfriar y filtrar se diluye con 100 c.c. de éter y se enfría a cero grados durante 24 horas. Se forma un producto cristalino de color naranja que es muy higroscópico y funde a 60-75° C después de lavar con alcohol-acetona 1:1 y secar. Rendimiento : 2,5-3 gramos.

El producto reduce al reactivo de Tillman (diclorofenolindofenol) y al azul de metileno. Se puede secar para análisis sobre P_2O_5 al vacío durante dos semanas.

La reacción se complica por hidrólisis parcial del enlace éster de la glicocola.

NUEVOS PRODUCTOS

1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



3 gr. de N-bencil-D-glucosamina, 9c.c. de éster acetilacético y 30 c.c. de etanol se mezclan hasta quedar una solución transparente que se deja estar a la temperatura ambiente durante cinco días. Seguidamente, se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se trata con 20 c.c. de agua y 15c.c. de éter. Después de separar las dos capas originadas, se extrae la etérea con dos porciones de agua de 8 c.c. cada una. Las fases acuosas reunidas se concentran al vacío. El concentrado se enfría en la nevera durante un día. El precipitado cristalino se filtra, se lava con alcohol-éter y se recristaliza de etanol-agua. Peso de sustancia aislado: 1,2 gr. Punto de fusión: 138-40° C. Se purifica por recristalización de etanol absoluto fundiendo a 140-41° C.

ANALISIS :

Calculado para $C_{19}H_{25}O_6N$: C,62'79 ; H,6'93 ; N,3'85 .

Encontrado : C,62'91 ; H,6'75 ; N,4'00 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0117 gr. de 1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol carboxilato de etilo se disuelven en 10 c.c. de agua ó alcohol. Se toman muestras de 4 c.c. conteniendo 0,00468 gr. para cada valoración.

5 c.c. de IO_4^- consumen 4,43 c.c. de ASO_3^- 0,1 N.

5 c.c. de " 4 c.c. probl. " 3,65 c.c. de " "

Diferencia.... 0,78 c.c. de " "

Equivalente calculado para 4 hidroxilos: $P_m/6 = \frac{363}{6} = 60,0$

Equivalente encontrado : $\frac{4,68}{0,1 \cdot 0,78} = 60,5$

MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

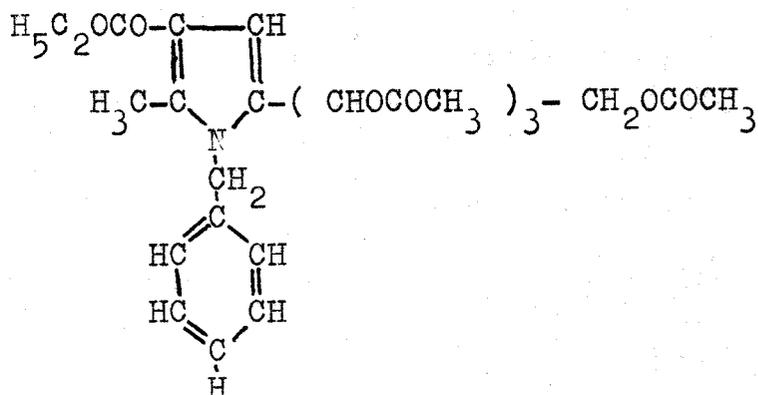
0,0931 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de etanol.

Longitud del tubo: 5 cm.

α leído: - 0,07

$$\left[\alpha \right]_D^{17} = - 15,0^\circ$$

1-bencil-2-metil-5-D-arabotetraacetoxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



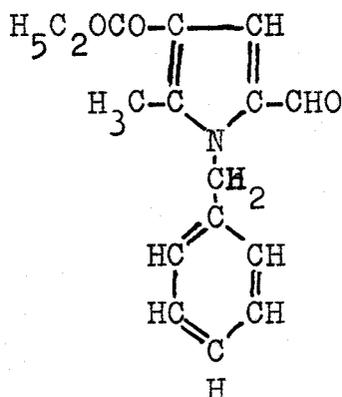
0,1 gr. de 1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi-3-pirrol carboxilato de etilo, disueltos en la mínima cantidad de piridina, se tratan con 0,6 c.c. de anhídrido acético, dejándose estar la solución a temperatura ambiente durante dos días, al cabo de los cuales se vierte sobre hielo, separando un aceite que, tras lavar varias veces con agua, cristaliza. El producto se recristaliza de etanol absoluto. Punto de fusión: 139-41° C. Secado sobre Cl_2Ca pesa 0,15 gr.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_{10}\text{N}$: C,61'01 ; H,6'21 ; N,2'63 .

Encontrado : C,60'86 ; H,6'06 ; N,2'89 .

1-bencil-2-metil-5-formil-3-pirrol carboxilato de etilo. -



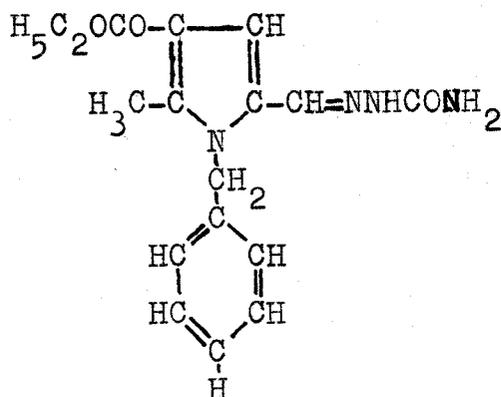
0,2 gr. de 1-bencil-2metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol carboxilato de etilo, suspendidos en 30 c.c. de agua, se tratan con una solución saturada de metaperiodato de sodio hasta reacción positiva al papel de ioduro de potasio-almidón. Se deja estar todavía media hora más y luego se enfría en la nevera. Después de filtrar el precipitado cristalino y lavar con agua, se seca sobre Cl_2Ca , pesando 0,12 gr. Se purifica por cristalización de metanol-agua, fundiendo a $58-60^\circ \text{C}$.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}$: C,70'84 ; H,6'27 ; N,5'16 .

Encontrado : C,70'88 ; H,6'21 ; N,4'81 .

SEMICARBAZONA de 1-bencil-2-metil-5-formil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



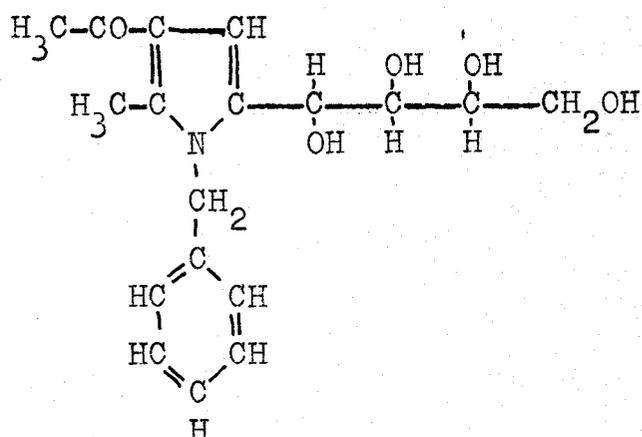
0,05 gr. de 1-bencil-2-metil-5-formil-3-pirrol carboxilato de etilo, disueltos en 1 c.c. de etanol de 96%, se tratan, en caliente, con otra solución de 0,05 gr. de clorhidrato de semicarbazida y 0,07 gr. de acetato de sodio en 1 c.c. de agua. El precipitado cristalino que se forma inmediatamente, se deja reposar unas horas, se filtra y se lava con agua. Se recristaliza de etanol. P. f. : 206-8° C. Peso de sustancia: 0,06 gr.

ANALISIS :

Calculado para $C_{17}H_{20}O_3N$: C,62'19 ; H,6'09 ; N,17'07 .

Encontrado : C,61'85 ; H,6'01 ; N,16'80 .

1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol. -



4 gr. de N-bencil-D-glucosamina, disueltos en 40 c.c. de etanol, absoluto, se tratan con 12 c.c. de acetilacetona y se deja estar a la temperatura ambiente durante tres días. Se evapora el disolvente al vacío y el residuo se trata con 50 c.c. de agua, que se extraen con tres fracciones de éter de 20 c.c. cada una. La fase acuosa se concentra hasta pequeño volumen, se siembra y cristaliza. Una vez lavado funde a 162-3°C. Se recrystaliza de etanol absoluto, p. f.: 165-6°C. Peso de sustancia aislado: 1,7 gr.

ANALISIS :

Calculado para $C_{18}H_{23}O_5N$: C,64'86 ; H,6'90 ; N,4'20 .

Encontrado : C,65'13 ; H,7'16 ; N,4'09 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0174 gr. de 1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil-pirrol se disuelven en 10 c.c. de agua. Para cada valoración se toman muestras de 2 c.c. conteniendo 0,00348 gr.

5 c.c. de IO_4^-consumen 4,16 c.c. de $AsO_3^=$ 0,1 N.

5 c.c. de " + 2 c.c. probl. " 3,51 c.c. de " "

Diferencia.... 0,65 c.c. de " "

Equivalente teórico para 4 hidroxilos: $P_m/6 = \frac{333}{6} = 55,5$

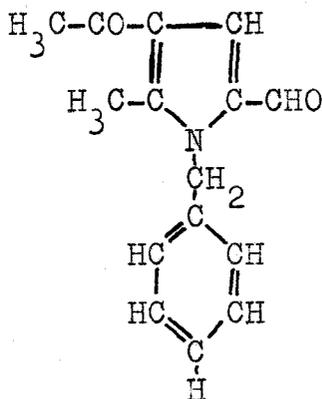
Equivalente encontrado : $\frac{3,48}{0,1 \cdot 0,65} = 53,5$

MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

0,2964 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo: 5 cm. α leído: - 0,08

$$[\alpha]_D^{17} = - 5,3^\circ$$

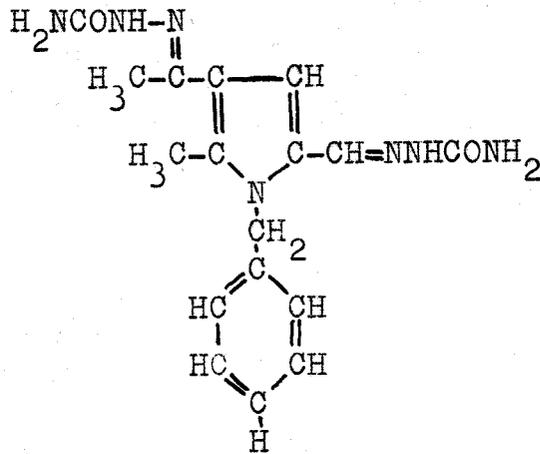
1-bencil-2-metil-5-formil-3-acetil-pirrol. -

0,2 gr. de 1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi-butiril-3-acetil-pirrol, suspendidos en 3 c.c. de agua y 5 c.c. de éter, se tratan, gota a gota, con una solución saturada de metaperiodato de sodio hasta reacción positiva al papel de ioduro de potasio-almidón. Se separa la fase acuosa de la etérea, extrayendose la primera nuevamente con 3 c.c. más de éter. Las porciones etéreas reunidas se secan sobre SO_4Na_2 anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se recristaliza de etanol-agua, decolorando con carbón activo. Punto de fusión despues de varias recristalizaciones 110-12° C. Peso de sustancia obtenido: 0,08 gr.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$: C,74'68 ; H,6'22 ; N,5'80 .

Encontrado : C,74'50 ; H,6'38 ; N,5'66 .

DI-SEMICARBAZONA de 1-bencil-2-metil-5-formil-3-acetil pirrol.-

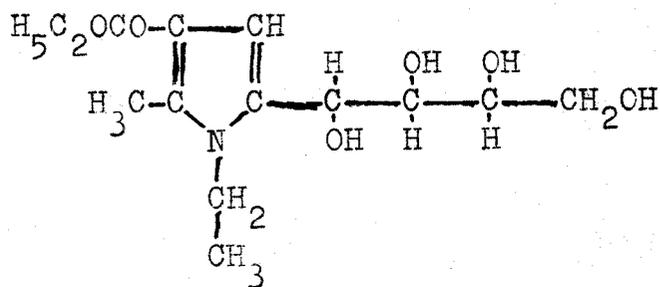
0,1 gr. de 1-bencil-2-metil-5-formil-3-acetil pirrol, disueltos en 1 c.c. de etanol, se tratan, en caliente, con otra solución formada con 0,1 gr. de clorhidrato de semicarbazida y 0,15 gr. de acetato de sodio, disueltos en 2 c.c. de agua. Después de enfriar se deja reposar un día. El compuesto que precipita, se filtra, lava con agua y seca sobre Cl₂Ca. Peso de sustancia: 0,11 gr. Se recristaliza de etanol absoluto con muy poca agua hasta punto de fusión constante: 185° C. El análisis indica que en este caso se ha formado una di-semi-carbazona.

ANALISIS :

Calculado para C₁₇H₂₁O₂N₇ : C,57'46 ; H,5'91 ; N,27'60 .

Encontrado : C,57'22 ; H,5'72 ; N,27'48 .

1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



3 gr. de N-etil-D-glucosamina y 9 c.c. de éster acetilacético se mezclan con 30 c.c. de etanol. La solución formada se deja estar a temperatura ambiente durante tres días, al cabo de los cuales se elimina el disolvente a vacío, quedando un residuo siruposo, que se trata con 20 c.c. de agua y 15 c.c. de éter. Una vez decantada la fracción etérea, se extrae tres veces con 10 c.c. de agua cada vez. Las fases acuosas reunidas se concentran al vacío hasta formación de un precipitado cristalino que, enfriado en nevara, se filtra. Se lava con etanol-éter 1:2 y se cristaliza de etanol-agua, fundiendo a 136-39 ° C. Peso de sustancia: 1,8 gr. Se purifica para análisis por recristalización de etanol absoluto. P. F.: 143-4° C.

ANALISIS :

Calculado para $C_{14}H_{23}O_6N$: C,55'81 ; H,7'64 ; N,4'65 .

Encontrado : C,55'93 ; H,7'84 ; N,4'48 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0103 gr. de 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil -
-3-pirrol carboxilato de etilo se disuelven en 10 c.c. de
agua. Para cada valoración se toman muestras de 4 c.c.
conteniendo 0,00412 gr.

5 c.c. de IO_4^- consumen 4,43 c.c. de AsO_3^- 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 3,61 c.c. de " "

Diferencia.... 0,82 c.c. de " "

Equivalente teórico para 4 hidroxilos: $P_m \sqrt{6} = \frac{301}{6} = 50,1$

Equivalente encontrado : $\frac{4,12}{0,1 \cdot 0,82} = 50,2$

MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

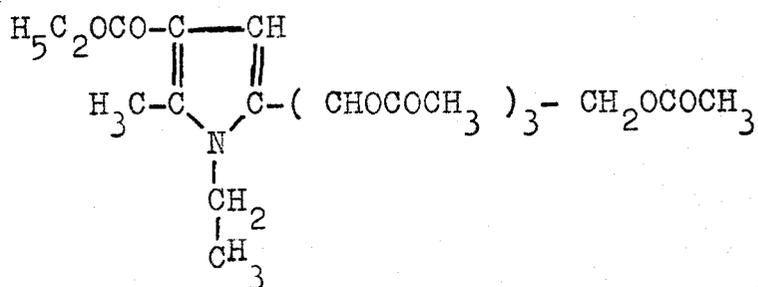
0,1430 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado
en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo: 5 cm.

α leído: dentro del error
del aparato.

$$\left[\alpha \right]_D^{17} = \text{nulo}$$

1-etil-2-metil-5-D-arabotetraacetoxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -

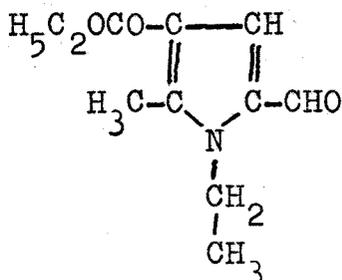


0,08 gr. de 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi
 butil-3-pirrol carboxilato de etilo, disueltos en 0,20 c.c.
 de piridina anhidra, se tratan con 0,48 c.c. de anhídrido
 acético. La solución, dejada estar a temperatura ambiente
 durante dos días, se vierte sobre hielo. El aceite que se
 separa se lava con agua repetidas veces, cristalizando fi-
 nalmente. Después de filtrar, lavar con agua y secar sobre
 Cl_2Ca , pesa 0,06 gr. y funde a $94-5^\circ \text{C}$. Se recristaliza de
 éter de petróleo de punto de ebullición $80-100^\circ \text{C}$. , fun-
 diendo a la misma temperatura.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_{10}\text{N}$: C, 56'29 ; H, 6'61 ; N, 2'98 .

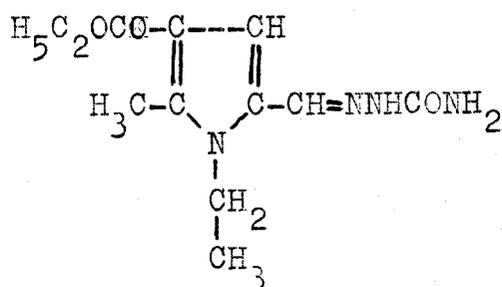
Encontrado : C, 56'43 ; H, 6'91 ; N, 3'07 .

1-etil-2-metil-5-formil-3-pirrol carboxilato de etilo. -

0,2 gr. de 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibu
 til-3-pirrol carboxilato de etilo se disuelven en la mínima
 cantidad de agua y se trata, gota a gota , con una solución
 saturada de metaperiodato sódico hasta reacción positiva al
 papel de ioduro de potasio-almidón. Se deja estar media ho-
 ra y se enfría para completar la precipitación del aldehido.
 Después de filtrar, lavar con agua fría y secar sobre Cl_2Ca
 funde a 46-50 ° C. Recristalizado de agua, funde a 48-50 °C.
 Peso de sustancia: 0,12 gr.

De esta sustancia se pasó directamente a la obten
 ción de la semicarbazona.

SEMICARBAZONA de 1-etil-2-metil-5-formil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



0,2 gr. de 1-etil-2-metil-5-formil-3-pirrol carboxilato de etilo, disueltos en 1,5 c.c. de etanol, se tratan, en caliente, con otra solución formada con 0,2 gr. de clorhidrato de semicarbazida y 0,3 gr. de acetato de sodio en 1,5 c.c. de agua. Al cabo de unos minutos se separa la semicarbazona. Se deja reposar unas horas, se filtra, lava con agua y seca sobre cloruro de calcio, fundiendo a 177-80°C. peso de sustancia: 0,21 gr. Se purifica por recristalización de etanol absoluto, fundiendo a 184-6 ° C.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}_4$: C, 54'13 ; H, 6'76 ; N, 21'05 .

Encontrado : C, 54'33 ; H, 7'01 ; N, 21'21 .

ANALISIS :

Calculado para $C_{13}H_{21}O_5N$: C,57'56 ; H,7'74 ; N,5'16 .

Encontrado : C,57'83 ; H,8'03 ; N,5'25 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0172 gr. de 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol se disuelven en 10 c.c. de agua. Para cada valoración se toman muestras de 4 c.c. conteniendo 0,00688 gr.

5 c.c. de IO_4^-consumen 4,43 c.c. de $AsO_3^=$ 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 2,91 c.c. de " "

Diferencia.... 1,52 c.c. de " "

Equivalente calculado para 4 hidroxilos : $P_m/6 = \frac{271}{6} = 45,16$

Equivalente encontrado : $\frac{6,88}{0,1 \cdot 1,52} = 45,20$

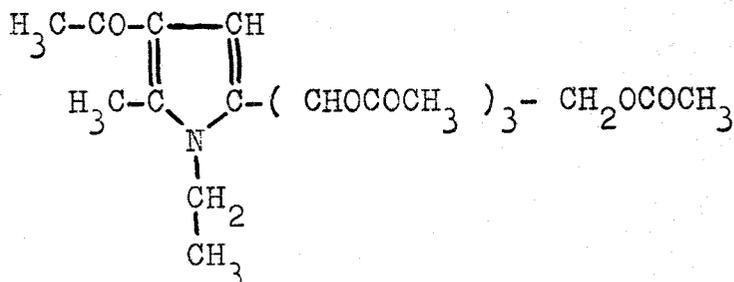
MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

0,1960 gr. de condensado se disuelven en un matrazaaforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo: 5 cm.

α leído: - 0,06

$$[\alpha]_D^{17} = - 6,1^\circ$$

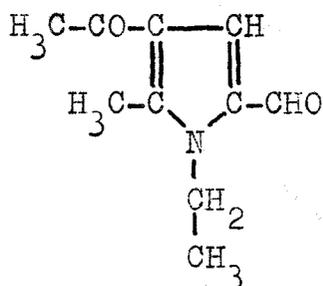
1-etil-2-metil-5-D-arabotetraacetoxibutil-3-acetil pirrol. -

0,3 gr. de 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi-
 butil-3-acetil pirrol, disueltos en 1 c.c. de piridina se
 ca, se tratan con 1,8 c.c. de anhídrido acético. La solu-
 ción, dejada estar a temperatura ambiente durante dos días,
 se vierte sobre hielo. El aceite separado se lava repetidas
 veces con agua hasta que, finalmente, cristaliza. Peso de
 sustancia aislado: 0,31 gr. Se purifica por recristalización
 de éter de petróleo de punto de ebullición 80-100 ° C. fun-
 diendo a 129-30 ° C.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_9\text{N}$: C, 57'40 ; H, 6'60 ; N, 3'19 .

Encontrado : C, 57'54 ; H, 6'64 ; N, 3'50 .

1-etil-2-metil-5-formil-3-acetil pirrol. -

0,2 gr. de 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi butil-3-acetil pirrol se disuelven en 40 c.c. de agua y se añaden 15 c.c. de benceno. La oxidación de la cadena polialcohólica se realiza con solución saturada de meta-periodato sódico. Cuando no consume más oxidante, se deja reposar media hora, se separan las dos capas y se extrae la acuosa con dos fracciones de benceno de 10 c.c. cada una. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre SO_4Na_2 y el benceno se elimina a presión reducida. El residuo cristalino pesa 0,1 gr. y funde a $114-5^\circ \text{C}$. Se recristaliza de etanol-agua sin que se altere su punto de fusión.

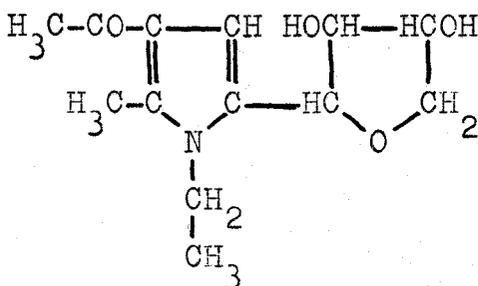
ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$: C,67'04 ; H,7'26 ; N,7'82 .

Encontrado : C,67'00 ; H,7'42 ; N,7'68 .

1-etil-2-metil-5-(2'5'dihidro-3'4'dihidroxifuran-2'-)-

-3-acetil pirrol. -



0,2 gr. de 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi
 butil-3-acetil pirrol se disuelven en 2,5 c.c. de agua y
 y se calientan a 50 ° C. durante siete horas, formandose
 un producto cristalino que, una vez filtrado , lavado y
 recristalizado de etanol absoluto, funde a 189-91 ° C.
 Peso de sustancia aislado: 0,12 gr.

ANALISIS :

Calculado para $C_{13}H_{19}O_4N$: N, 5'53 ; C, 61'66 ; H, 7'50.

Encontrado : N, 5'80 ; C, 61'83 ; H, 7'53 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0132 gr. de 1-etil-2-metil-5-(2'5'dihidro-3'4'dihidroxi furan-2'-)-3-acetil pirrol se disuelven en 10 c.c. de etanol. Para cada valoración se toman muestras de 4 c.c. con teniendo 0,00528 gr.

5 c.c. de IO_4^- consumen 3,42 c.c. de $AsO_3^=$ 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 2,99 c.c. de " "

Diferencia.... 0,43 c.c. de " "

Equivalente teórico encontrado para 2 hidroxilos = $\frac{P}{m} / 2 = 126,5$

Equivalente encontrado : $\frac{5,28}{0,1 \cdot 0,43} = 122,8$

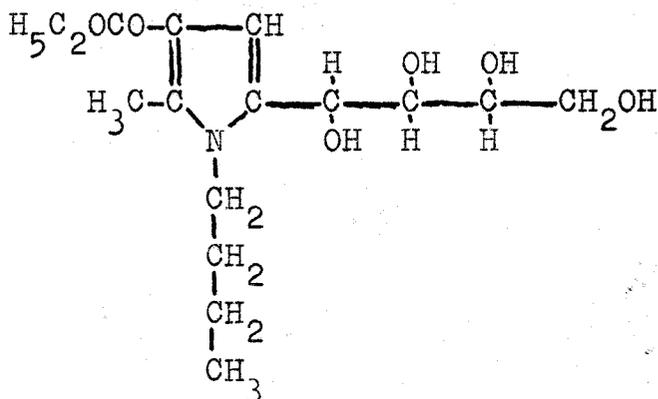
MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

0,3464 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo : 5 cm.

α leído: -2,46

$$[\alpha]_D^{17} = -142^\circ$$

1-butil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrolcarboxilato de etilo. -

9 gr. de N-butil-D-glucosamina, disueltos en 90 c.c. de etanol, se tratan con 27 c.c. de éster acetilacético. La solución, dejada estar a la temperatura ambiente, cuaja en masa cristalina al cabo de dos días. Después de filtrar, se concentra al vacío el líquido filtrado, cristalizando una nueva fracción. Ambas porciones reunidas pesan 8,5 gr., fundiendo a 164-5° C. Se recrystaliza de etanol absoluto hasta punto de fusión constante: 168-9° C .

ANALISIS :

Calculado para $C_{16}H_{27}O_6N$: C,58'35 ; H,8'20 ; N,4'25 .

Encontrado : C,58'44 ; H,8'47 ; N,4'33 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0121 gr. de 1-butyl-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol carboxilato de etilo se disuelven en 10 c.c. de agua con algo de etanol. Para cada valoración se toman muestras de 4 c.c. conteniendo 0,00484 gr.

5 c.c. de IO_4^- consumen 4,43 c.c. de $AsO_3^=$ 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 3,52 c.c. de " "

Diferencia.... 0,91 c.c. de " "

Equivalente teórico para 4 hidroxilos: $P_m/6 = -\frac{329}{6} = 54,8$

Equivalente encontrado : $-\frac{4,84}{0,1 \cdot 0,91} = 53,2$

MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

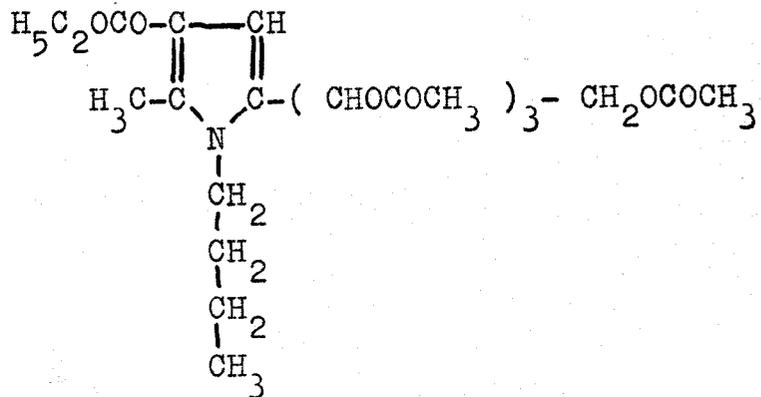
0,2872 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo: 5 cm.

α leído: - 0,08

$$[\alpha]_D^{17} = - 5,5^\circ$$

1-butil-2-metil-5-D-arabotetraacetoxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -

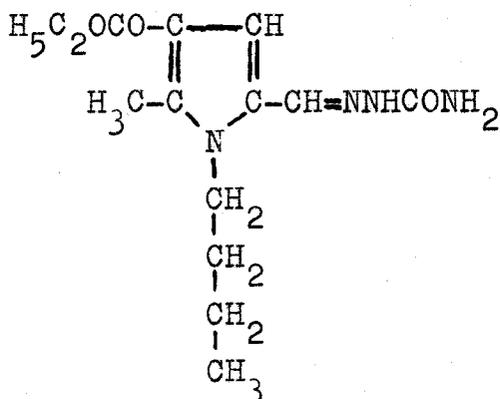


0,3 gr. de 1-butil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi-
 butil-3-pirrol carboxilato de etilo, disueltos en la mínima
 cantidad de piridina anhidra, se tratan con 1,8 c.c. de an-
 hidrido acético. La solución, dejada estar a temperatura am
 biente durante dos días, se vierte sobre hielo separando un
 aceite. Se añade carbonato de potasio hasta neutralidad al
 papel de tornasol, se decanta el agua y el sirupo se lava
 varias veces con agua, cristalizando finalmente. Se seca so
 bre Cl_2Ca , pesando 0,35 gr. y fundiendo a 68-70° C. La puri
 ficación por recristalización de éter de petróleo de 60-80°
 no alteró el punto de fusión.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_{10}\text{N}$: C, 57'94 ; H, 7'04 ; N, 2'81 .

Encontrado : C, 57'74 ; H, 7'23 ; N, 3'10 .

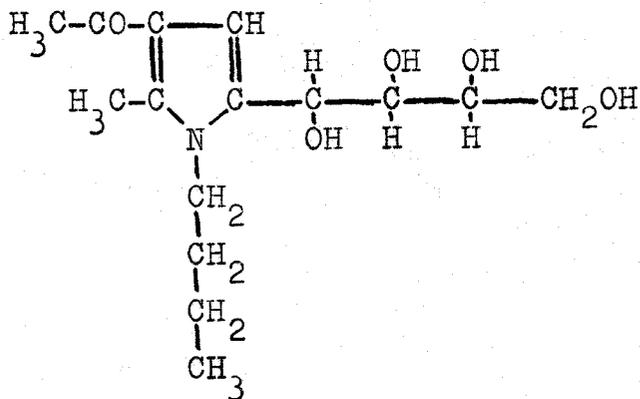
SEMICARBAZONA de 1-butil-2-metil-5-formil-3-pirrolcarboxilato de etilo. -

0,1 gr. de 1-butil-2-metil-5-formil-3-pirrol carboxilato de etilo, disueltos en 1,5 c.c. de etanol, se mezclan, en caliente, con otra solución formada con 0,1 gr. de clorhidrato de semicarbazida y 0,15 gr. de acetato de sodio en 1,5 c.c. de agua. Después de en friar, se separa un producto cristalino que tras filtrar, lavar con agua y secar sobre Cl_2Ca , pesa 0,11 gr. y fun de a 198-200° C.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N}_4$: C, 57'14 ; H, 7'48 ; N, 19'16 .

Encontrado : C, 57'42 ; H, 7'63 ; N, 19'28 .

1-butil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol. -

9 gr. de N-butil-D-glucosamina, disueltos en 90 c.c. de etanol y 18 c.c. de acetilacetona, se dejan estar a la temperatura ambiente durante dos días, al cabo de los cuales cristaliza en masa el condensado. Después de enfriar, se filtra, lava con éter y seca sobre cloruro de calcio, fundiendo a 154-5° C. La recristalización en etanol absoluto mantiene el mismo punto de fusión. Peso de sustancia aislado : 5 gr.

ANALISIS :

Calculado para $C_{15}H_{25}O_5N$: C,60'20 ; H,8'36 ; N,4'68 .

Encontrado : C,60'35 ; H,8'20 ; N,4'79 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0110 gr. de 1-butyl-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol se disuelven en 10 c.c. de agua. Para ca da valoración se toman muestras de 4 c.c. conteniendo 0,00440 gr.

5 c.c. de IO_4^-consumen 4,43 c.c. de $AsO_3^=$ 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 3,55 c.c. de " "

Diferencia.... 0,88 c.c. de " "

Equivalente teórico para 4 hidroxilos: $P_m/6 = \frac{299}{6} = 49,8$

Equivalente encontrado : $\frac{4,40}{0,1 \cdot 0,88} = 50,0$

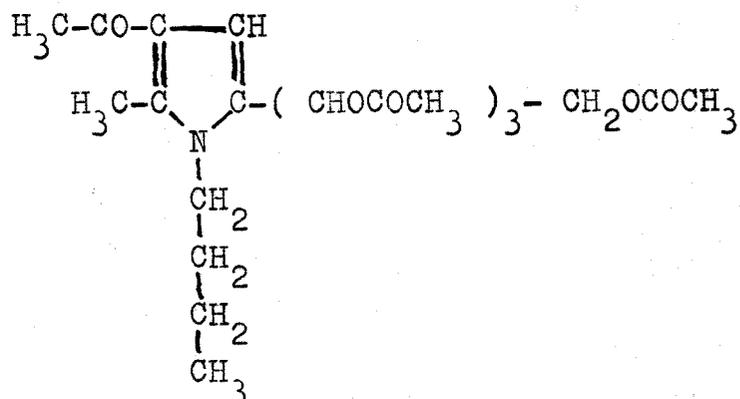
MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

0,3394 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo: 5 cm.

α leído: - 0,39

$$[\alpha]_D^{17} = - 23,0^\circ$$

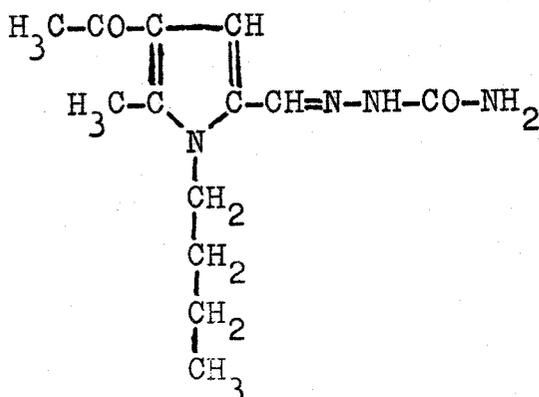
1-butil-2-metil-5-D-arabotetraacetoxibutil-3-acetil pirrol. -

0,3 gr. de 1-butil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi-
 butil-3-acetil pirrol, disueltos en 1,3 c.c. de piridina an
 hidra, se tratan con 1,8 c.c. de anhídrido acético. La solu
 ción, dejada estar a temperatura ambiente durante un día, se
 vierte sobre hielo, separando un aceite que, tras sembrar,
 cristaliza. Peso de sustancia: 0,31 gr. Recristalizado de
 éter de petróleo de 80-100° funde a 74-6° C.

ANALISIS :

Calculado, para $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_9\text{N}$: N, 2'99 ; H, 7'06

Encontrado : N, 2'69 ; H, 7'30

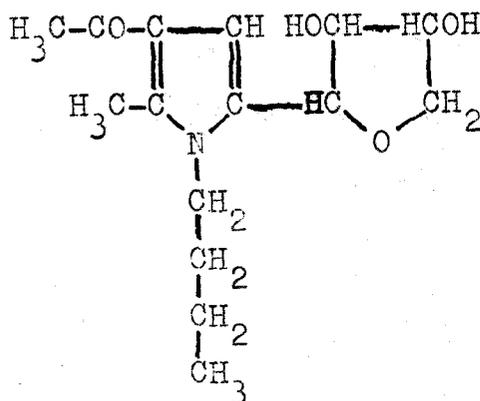
SEMICARBAZONA de 1-butil-2-metil-5-formil-3-acetil pirrol. -

0,1 gr. de 1-butil-2-metil-5-formil-3-acetil pirrol disueltos en 1 c.c. de etanol caliente se tratan con otra solución de 0,1 gr. de clorhidrato de semicarbazida y 0,15 gr. de acetato sódico, disueltos en 1,5 c.c. de agua, previamente calentada. El producto cristalino que se separa, es purificado por recristalización de etanol-agua, fundiendo a 175-77 ° C. Peso de sustancia: 0,1 gr.

Los análisis realizados hacen sospechar que se trata de una mezcla de semi y disemicarbazona.

1-butil-2-metil-5-(2'5'dihidro-3'4'dihidroxifuran-2'-)-

-3-acetil pirrol. -



0,2 gr. de 1-butil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxi
butil-3-acetil pirrol se disuelven en la mínima cantidad de
agua posible y se calientan a 50 ° C. durante veinticuatro
horas, obteniendose un producto cristalino que, recristali
zado de etanol absoluto, funde a 167-8 ° C. Peso de sustancia
aislado: 0,1 gr.

ANALISIS :

Calculado para $C_{15}H_{23}O_4N$: C,64'05 ; H,8'19 ; N,4'98 .

Encontrado : C,63'96 ; H,8'34 ; N,4'87 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0109 gr. de 1-butil-2-metil-5-(2'5'dihidro-3'4'dihidroxi furan-2'-)-3-acetil pirrol se disuelven en 10 c.c. de etanol. Para cada valoración se toman muestras de 4 c.c. conteniendo 0,00436 gr.

5 c.c. de IO_4^-consumen 3,92 c.c. de AsO_3 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 3,60 c.c. de " "

Diferencia.... 0,32 c.c. de " "

Equivalente teórico para 2 hidroxilos: $F_m/2 = \frac{281}{2} = 140,5$

Equivalente encontrado : $\frac{4,36}{0,1 \cdot 0,32} = 136,2$

MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

0,0826 gr. de compuesto se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo: 5 cm. α leído: - 0,48

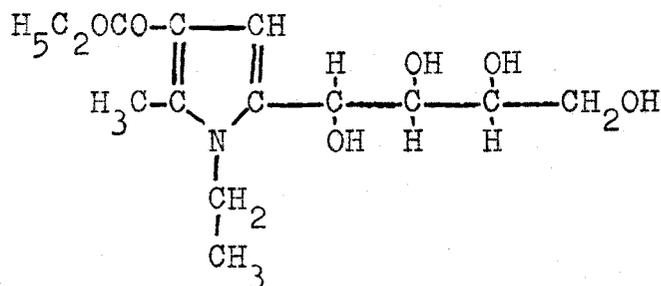
$$[\alpha]_D^{17} = - 116,2^\circ$$

0,5 gr. del producto aislado, se disuelven en 10 c.c. de metanol caliente y se refluja en baño maría 6 horas, tomando la solución intenso color rojo oscuro. Finalmente, se elimina el disolvente a presión reducida, quedando un residuo cristalino que se recoge con éter, se filtra y cristaliza de etanol absoluto, fundiendo a 140-1° C. Peso de sustancia aislado: 0,3 gr. Punto de fusión mixto con el producto obtenido en la reacción de N-bencil-D-glucosamina y éster acetilacético sin depresión.

ANALISIS :

Calculado para $C_{19}H_{25}O_6N$: C,62'79 ; H,6'93 ; N,3'85 .

Encontrado : C,62'94 ; H,7'19 ; N,3'75 .

Reacción de N-etil-D-fructosilamina con éster acetilacético. -

8 gr. de N-etil-D-fructosilamina, disueltos en 60 c.c. de metanol, se tratan con 6 c.c. de éster acetilacético, dejándose estar la solución a temperatura ambiente durante dos días, al término de los cuales se concentra hasta sirupo por eliminación del disolvente a presión reducida. El sirupo se disuelve en 20 c.c. de agua y se extrae cinco veces con porciones de éter de 10 c.c. cada una. Finalmente, la fase acuosa se siembra y se enfría en nevera. Al cabo de unos días, se filtra el producto cristalino separado y se lava con etanol-éter 1:3. Se recristaliza de agua, fundiendo a 144-5° C. Peso de sustancia: 2,6 gr. Punto de fusión mixto con 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol carboxilato de etilo sin depresión.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}$: C, 55'81 ; H, 7'64 ; N, 4'65 .

Encontrado : C, 55'93 ; H, 7'84 ; N, 4'48 .

ANALISIS :

Calculado para $C_{16}H_{25}O_8N$: C,53'48 ; H,6'96 ; N,3'89 .

Encontrado : C,53'51 ; H,6'97 ; N,3'73 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0104 gr. de éster etílico del ácido 2-metil-3-pirrolcarboxilato de etilo-4-D-arabotetrahidroxibutil-1-acético se disuelven en 10 c.c. de agua. Para cada valoración se toman muestras de 4 c.c. conteniendo 0,00416 gr.

5 c.c. de IO_4^- consumen 4,43 c.c. de $AsO_3^=$ 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 3,73 c.c. de " "

Diferencia.... 0,70 c.c. de " "

Equivalente teórico para 4 hidroxilos: $P_m/6 = \frac{359}{6} = 59,8$

Equivalente encontrado : $\frac{4,16}{0,1 \cdot 0,70} = 59,4$

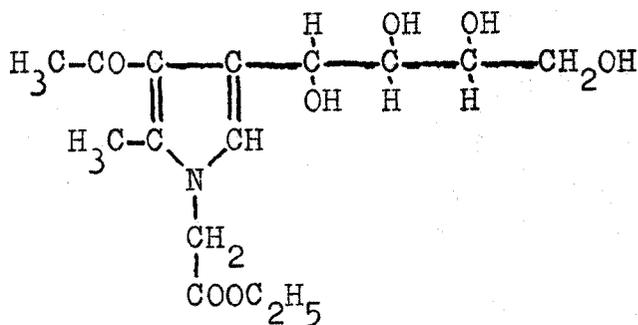
MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

0,2580 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo: 5 cm. α leído: - 0,62

$$[\alpha]_D^{17} = - 48,0^\circ$$

Ester etílico del ácido 2-metil-3-acetilpirrol-4-D-arabotetrahidroxibutil-1-acético. -



6,5 gr. de 1-gliciléster-1-desoxi-D-fructosa, disueltos en 30 c.c. de etanol absoluto, se tratan con 9 c.c. de acetilacetona. La solución, de color rojo oscuro, se deja estar a temperatura ambiente durante dos días, al término de los cuales, cuaja en masa de finas agujas. Después de enfriar en la nevera, se filtra el precipitado cristalino y se lava con etanol-éter 1:2. El producto funde a 147-8° C. Peso de sustancia aislado, 1,8 gr. Se recristaliza de etanol absoluto finalmente a 150-51° C.

ANALISIS :

Calculado para $C_{15}H_{23}O_7N$: C,54'71 ; H,6'99 ; N,4'25 .

Encontrado : C,54'76 ; H,7'09 ; N,4'49 .

DETERMINACION DEL NUMERO DE HIDROXILOS EN LA MOLECULA :

0,0132 gr. de éster etílico del ácido 2-metil-3-acetilpirrol-4-D-arabotetrahidroxibutil-1-acético se disuelven en 10c.c. de agua. Para cada valoración se toman muestras de 4 c.c. conteniendo 0,00528 gr.

5 c.c. de IO_4^-consumen 4,43 c.c. de $AsO_3^=$ 0,1 N.

5 c.c. de " + 4 c.c. probl. " 3,47 c.c. de " "

Diferencia..... 0,96 c.c. de " "

Equivalente teórico para 4 hidroxilos: $P_m/6 = \frac{329}{6} = 54,8$

Equivalente encontrado : $\frac{5,28}{0,1 \cdot 0,96} = 55,0$

MEDIDA DE LA ROTACION OPTICA :

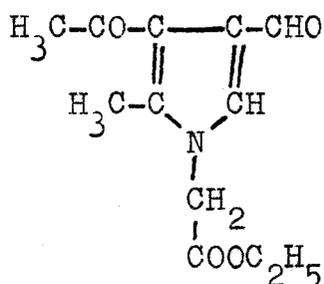
0,1402 gr. de condensado se disuelven en un matraz aforado en 10 c.c. de piridina.

Longitud del tubo : 5 cm.

α leído: - 0,20

$$\left[\alpha \right]_D^{17} = - 28,5^\circ$$

Ester etílico del ácido 2-metil-3-acetilpirrol-
-4-formil-1-acético. -



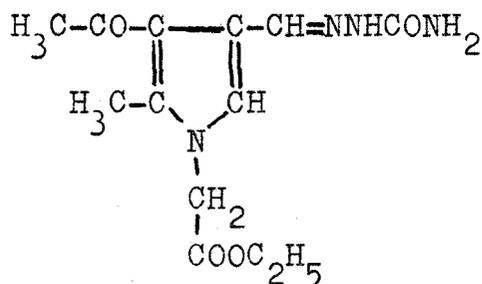
0,4 gr. del éster etílico del ácido 2-metil-3-acetilpirrol-4-D-arabotetrahidroxibutil-1-acético, suspendidos en 2 c.c. de agua y 12 c.c. de benceno, se tratan, con agitación, con solución saturada de metaperiodato de sodio hasta reacción positiva al papel de ioduro de potasio-almidón. Cuando todo el compuesto ha sido oxidado, la capa bencénica queda ligeramente coloreada de amarillo. Después de decantar, la fase acuosa se extrae con 5 c.c. de benceno. Las fracciones bencénicas, secadas sobre SO_4Na_2 , se concentran hasta sequedad a presión reducida. El producto cristalino aislado pesa 0,11 gr. y funde a $85-7^\circ \text{C}$. Se purifica por recristalización de etanol-agua, fundiendo a $94-5^\circ \text{C}$.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}$: C, 60'76 ; H, 6'32 ; N, 5'90 .

Encontrado : C, 60'63 ; H, 6'46 ; N, 5'90 .

SEMICARBAZONA del éster etílico del ácido 2-metil-
-3-acetilpirrol-4-formil-1-acético. -

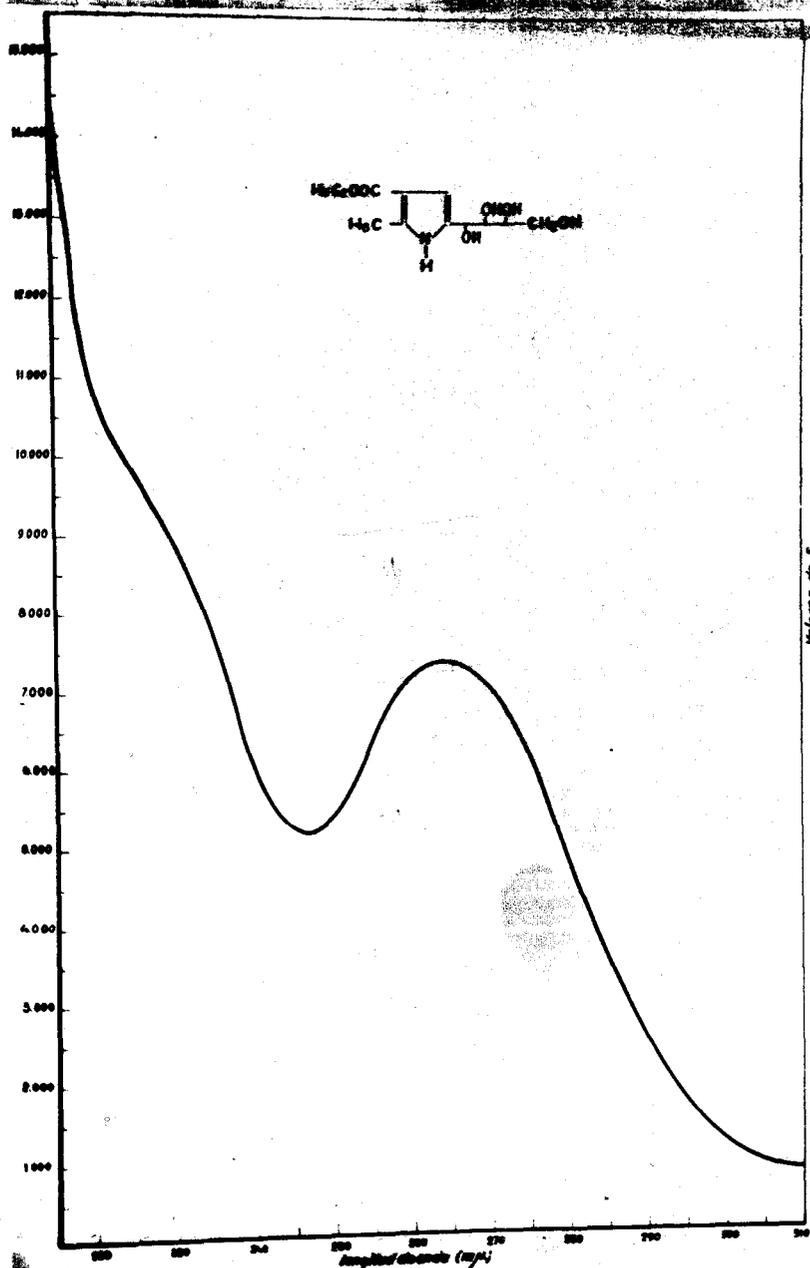


0,05 gr. del éster etílico del ácido 2-metil-3-acetilpirrol-4-formil-1-acético, disueltos en etanol-agua 1:1, se tratan, en caliente, con una solución acuosa de 0,05 gr. de clorhidrato de semicarbazida y 0,075 gr. de acetato de sodio, disueltos en 1 c.c. de agua. Al cabo de unos minutos, precipita la semicarbazona. Después de filtrar, lavar con agua y secar sobre cloruro de calcio, el producto funde a 195 ° C. Se recristaliza de etanol-agua sin que se altere el punto de fusión. Peso de sustancia: 0,05 gr.

ANALISIS :

Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_4$: C, 53'06 ; H, 6'12 ; N, 19'05 .

Encontrado : C, 52'90 ; H, 6'16 ; N, 19'05 .



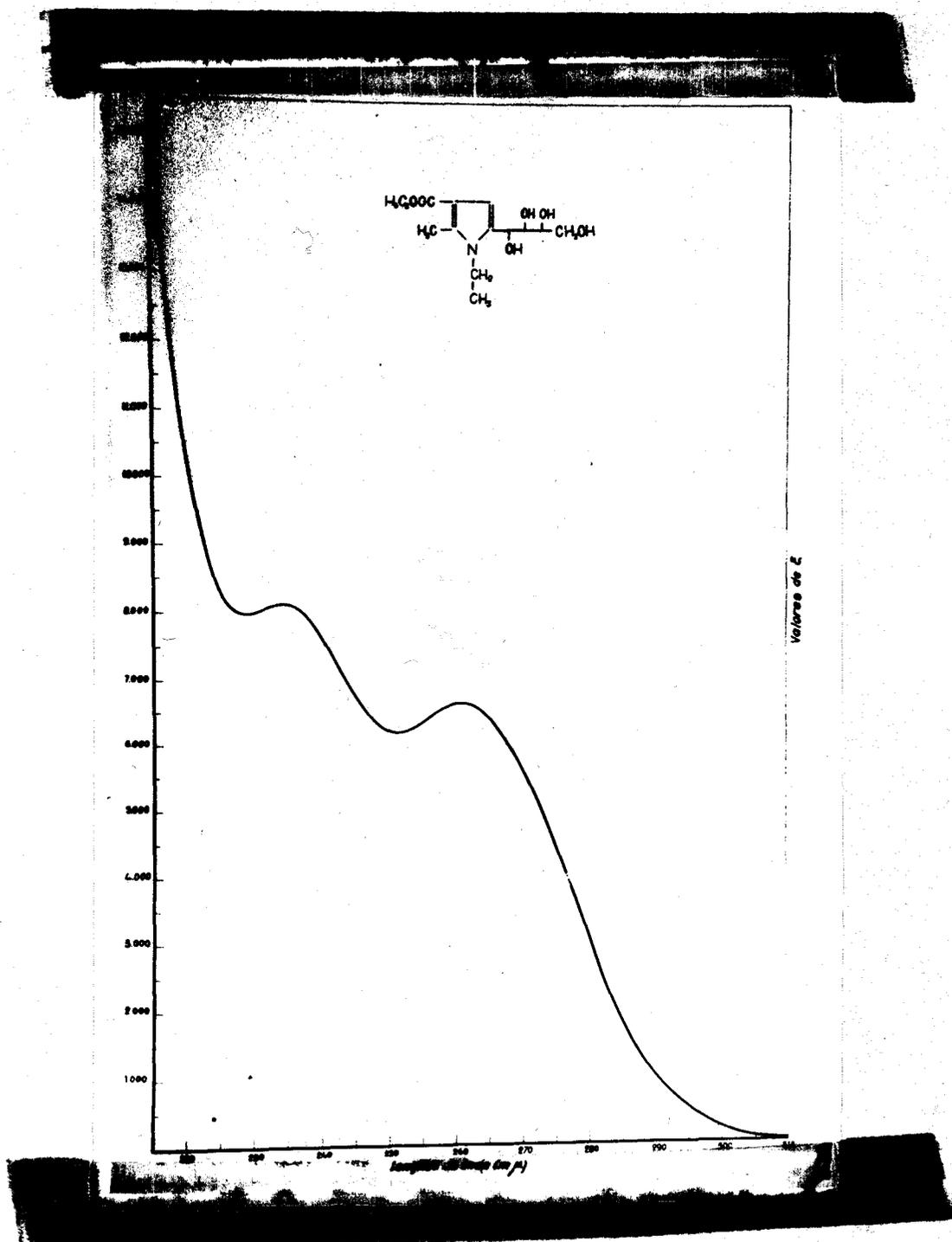
- fig. 1 -

Solvente : H₂O

C mino óptico : 1 cm.

Concentración : $2,5 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



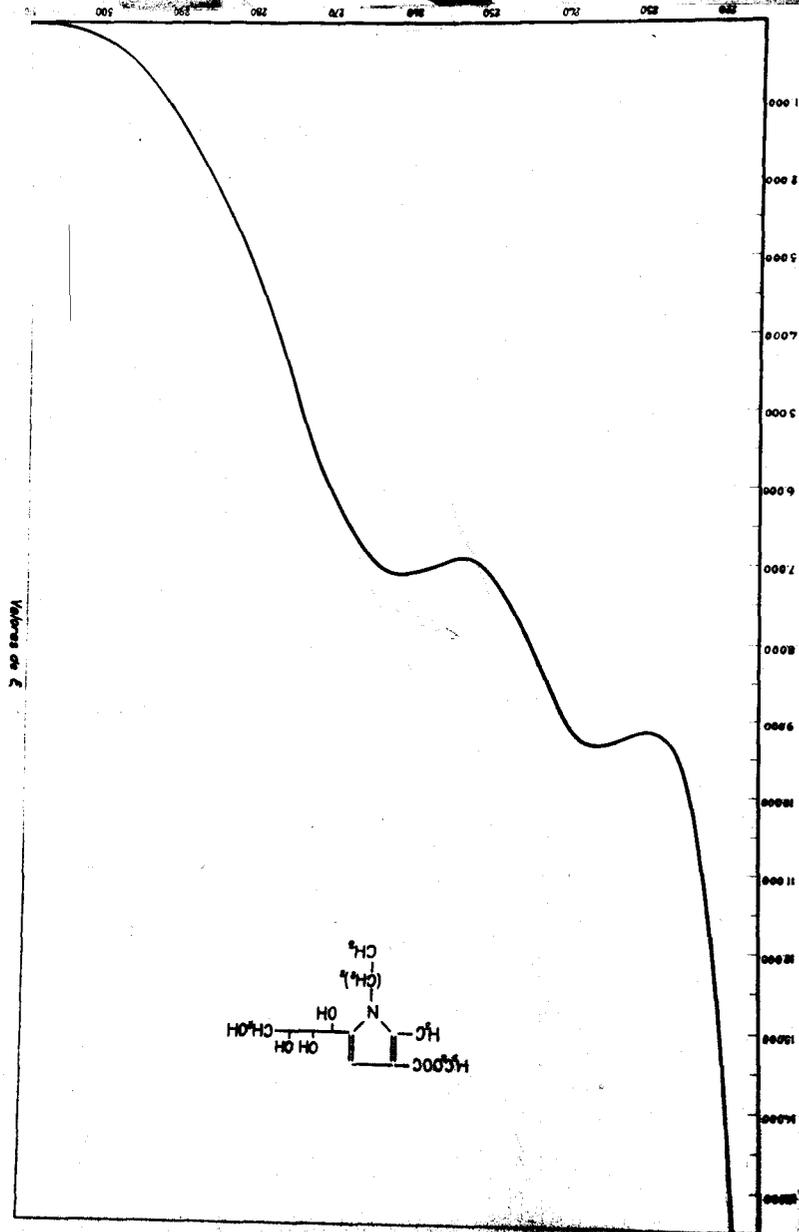
- fig. 2 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $4,3 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



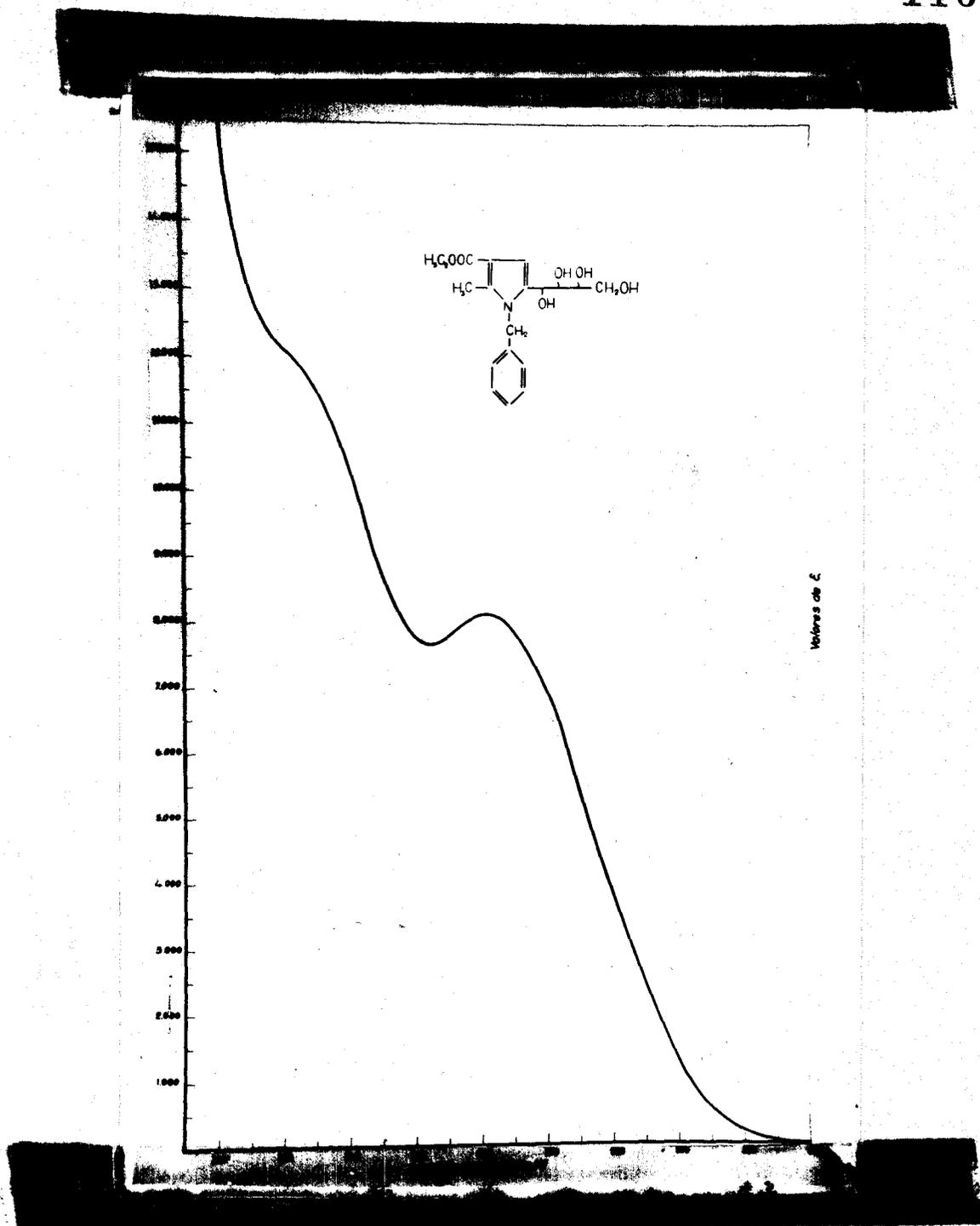
- fig. 3 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $4,3 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 1-butil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol
 carboxilato de etilo. -



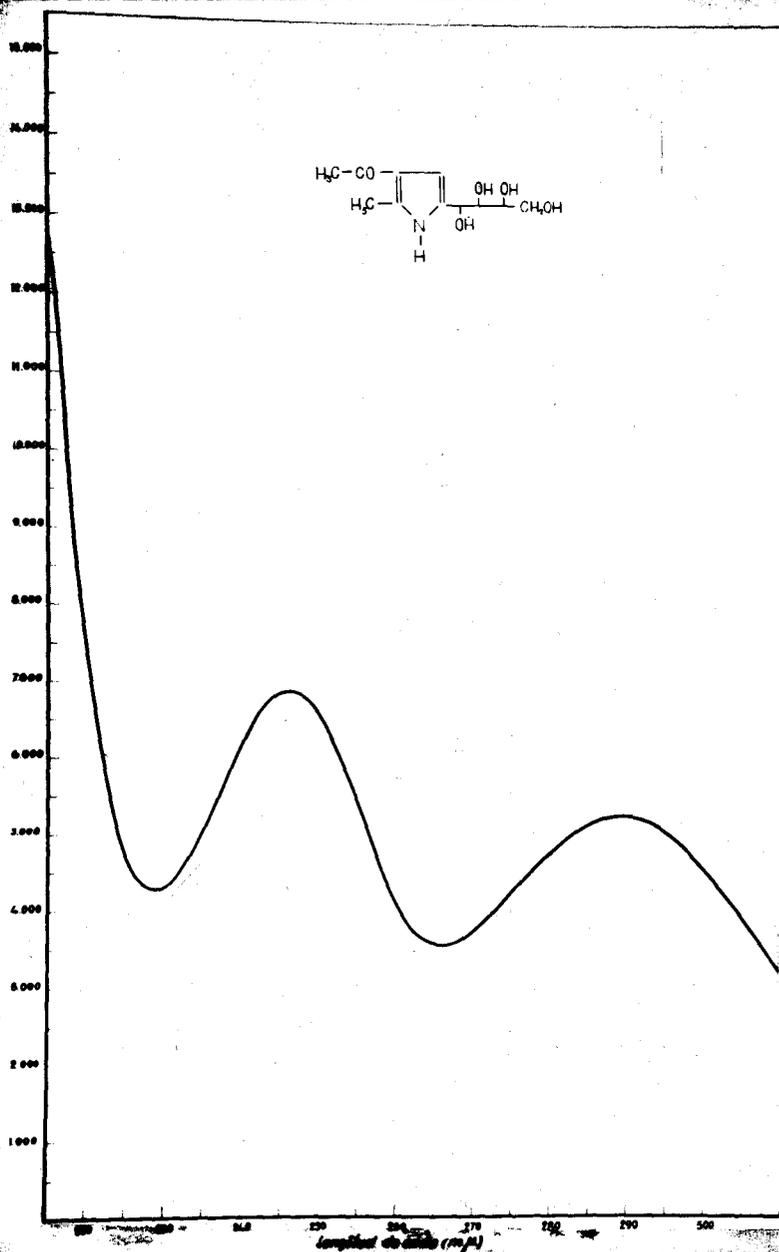
- fig. 4 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $3,6 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol
carboxilato de etilo. -



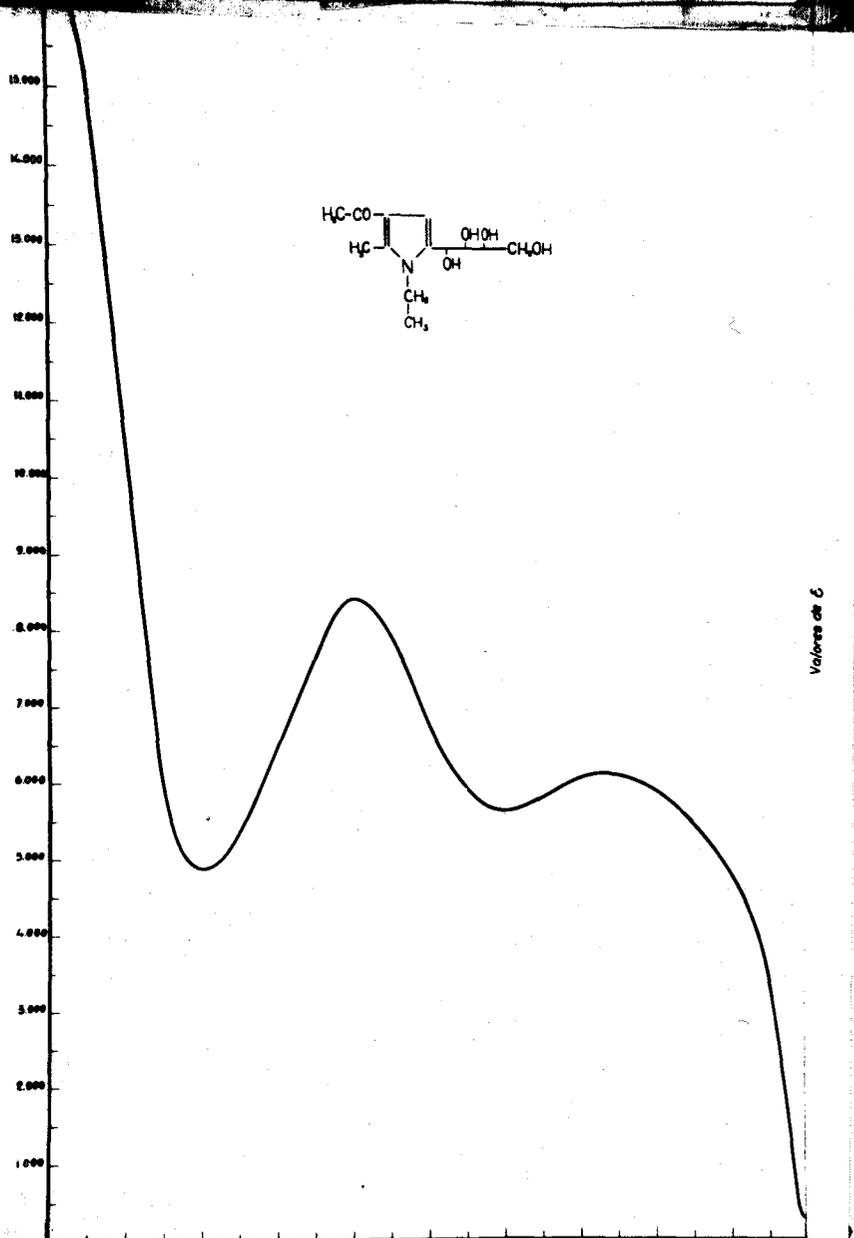
- fig. 5 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $5,5 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol. -



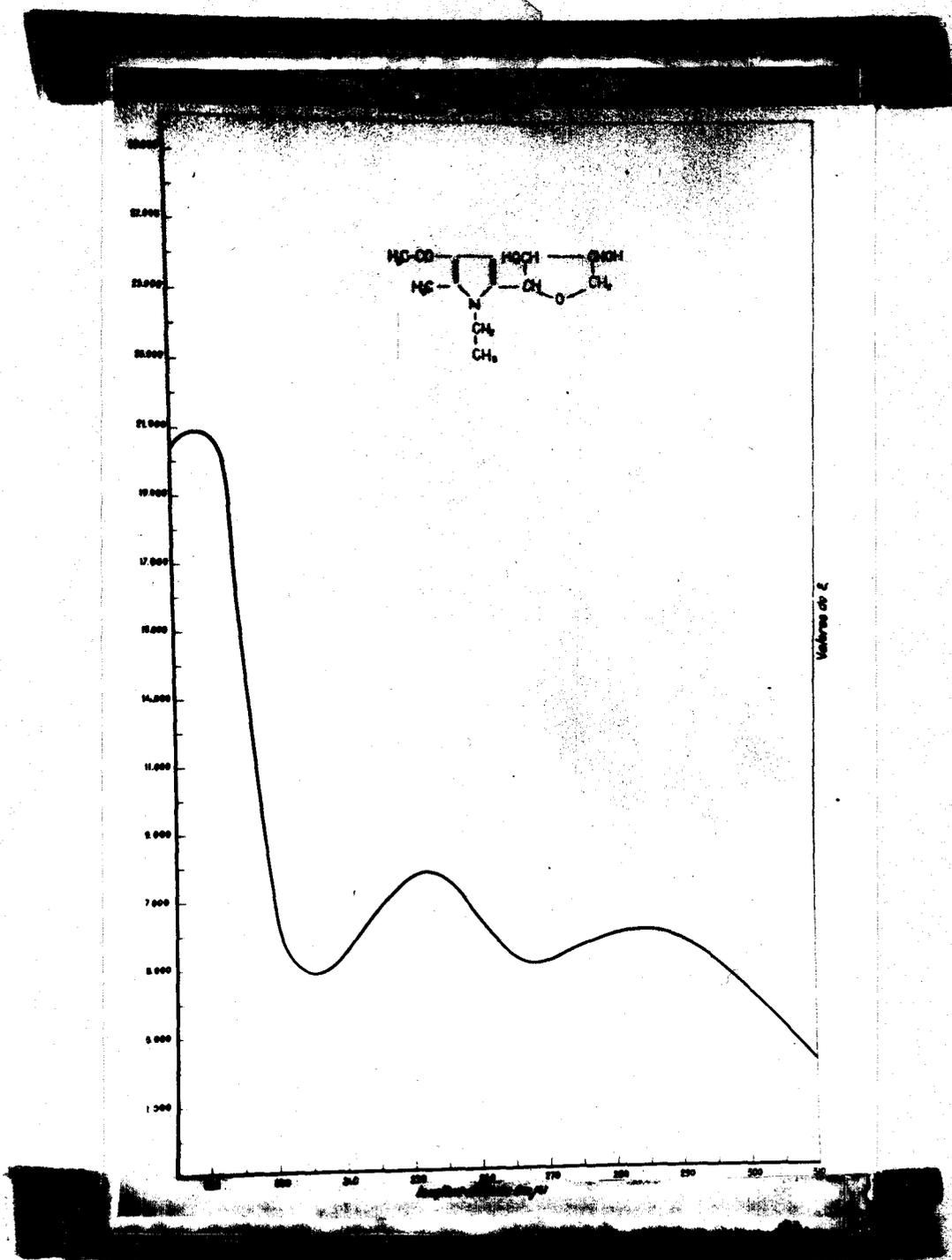
= fig. 6 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $5,6 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 1-etil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol.



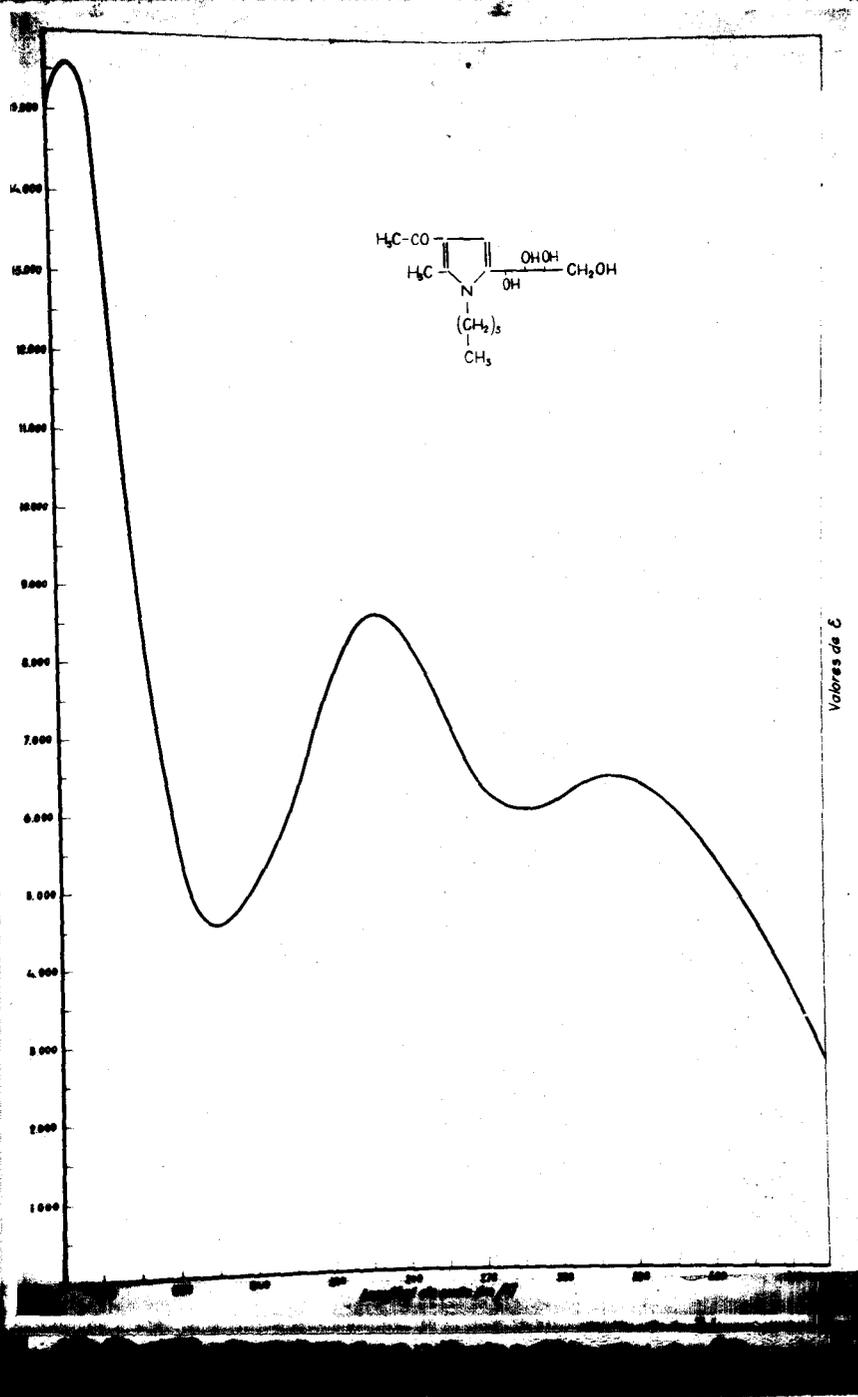
- fig. 7 -

Solvente : etanol

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $5,8 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 1-etil-2-metil-5-(2'5'dihidro-3'4'dihidroxifuran-2')-
-3-acetil pirrol. -



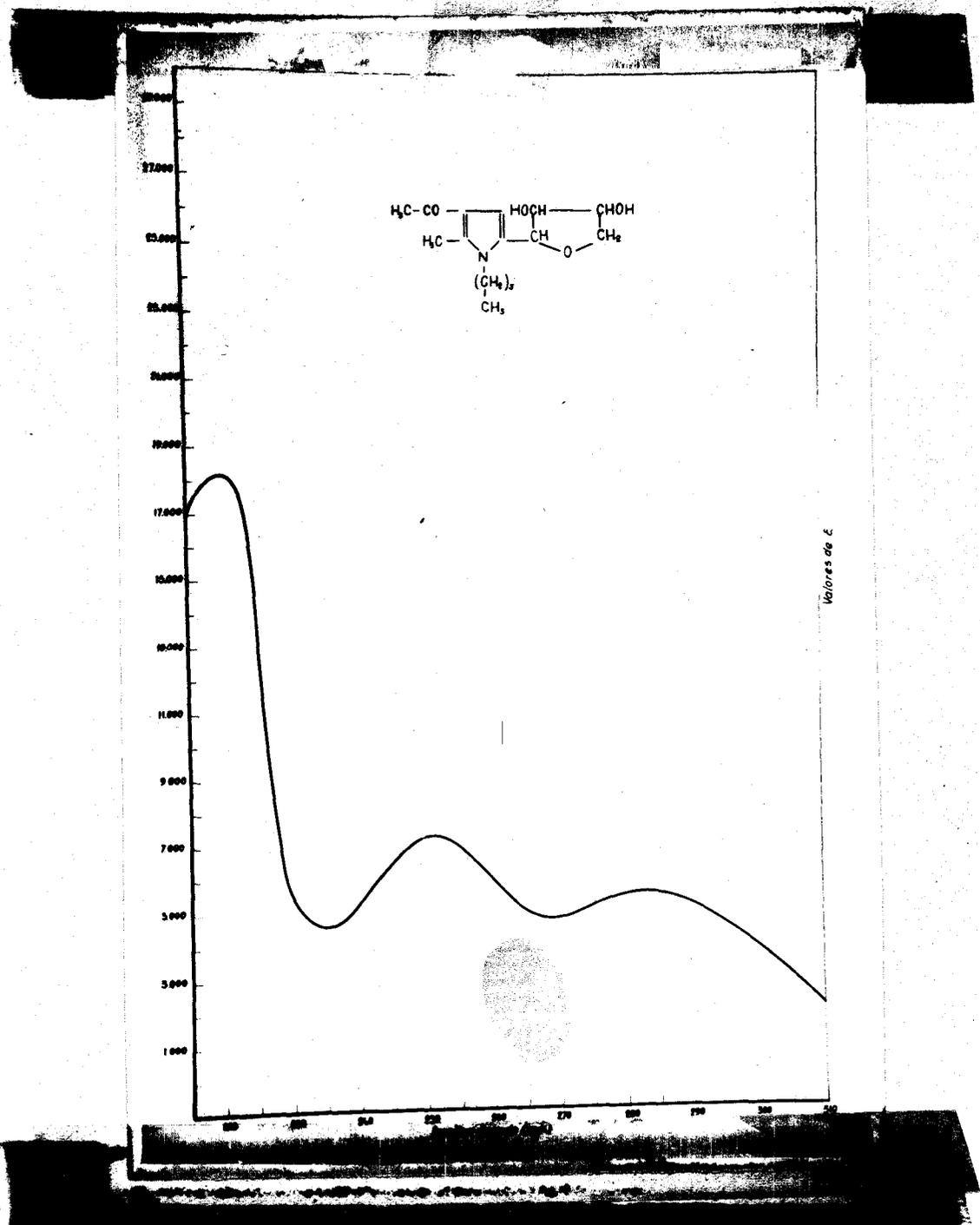
- fig. 8 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : 4,1 · 10⁻⁵ moles / litro.

- 1-butil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol.

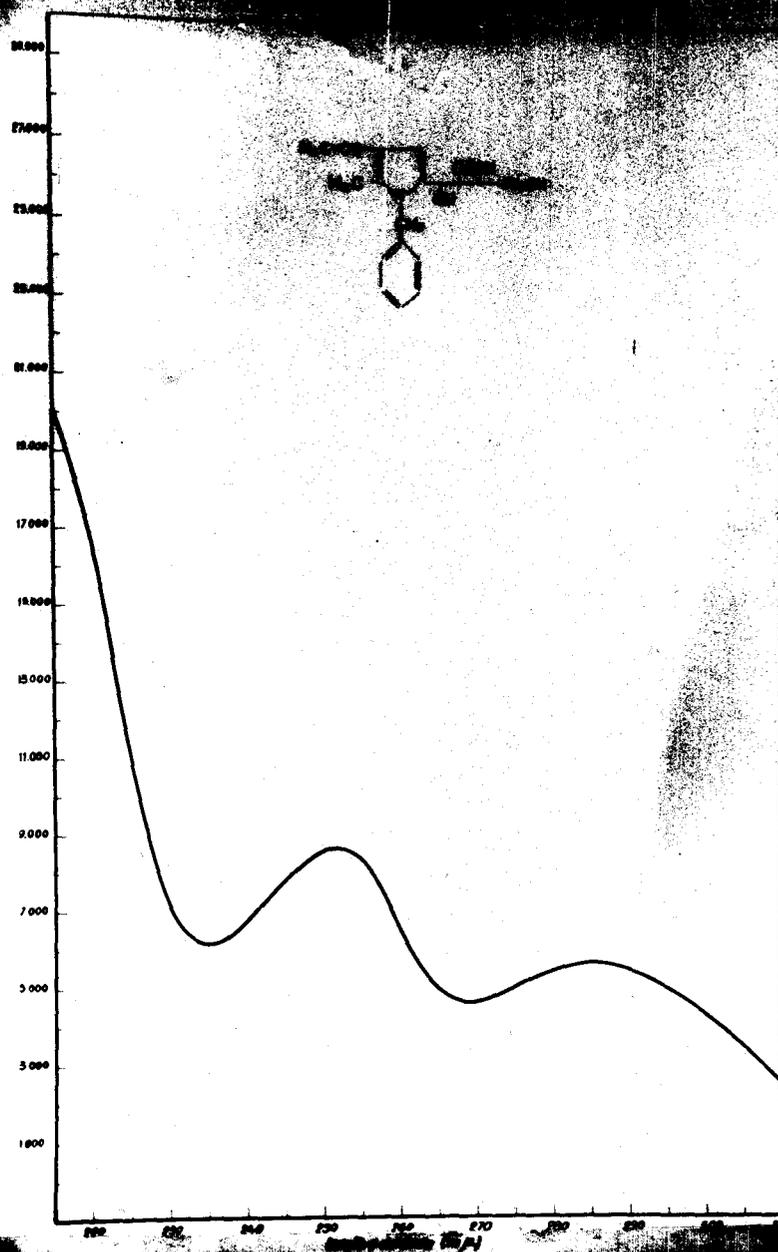


- fig. 9 -

Solvente : etanol Camino óptico : 1 cm.

Concentración : 4,1 . 10⁻⁵ moles / litro.

- 1-butil-2-metil-5-(2'5'dihidro-3'4'dihidroxi-furan-2')-
-3-acetil pirrol. -



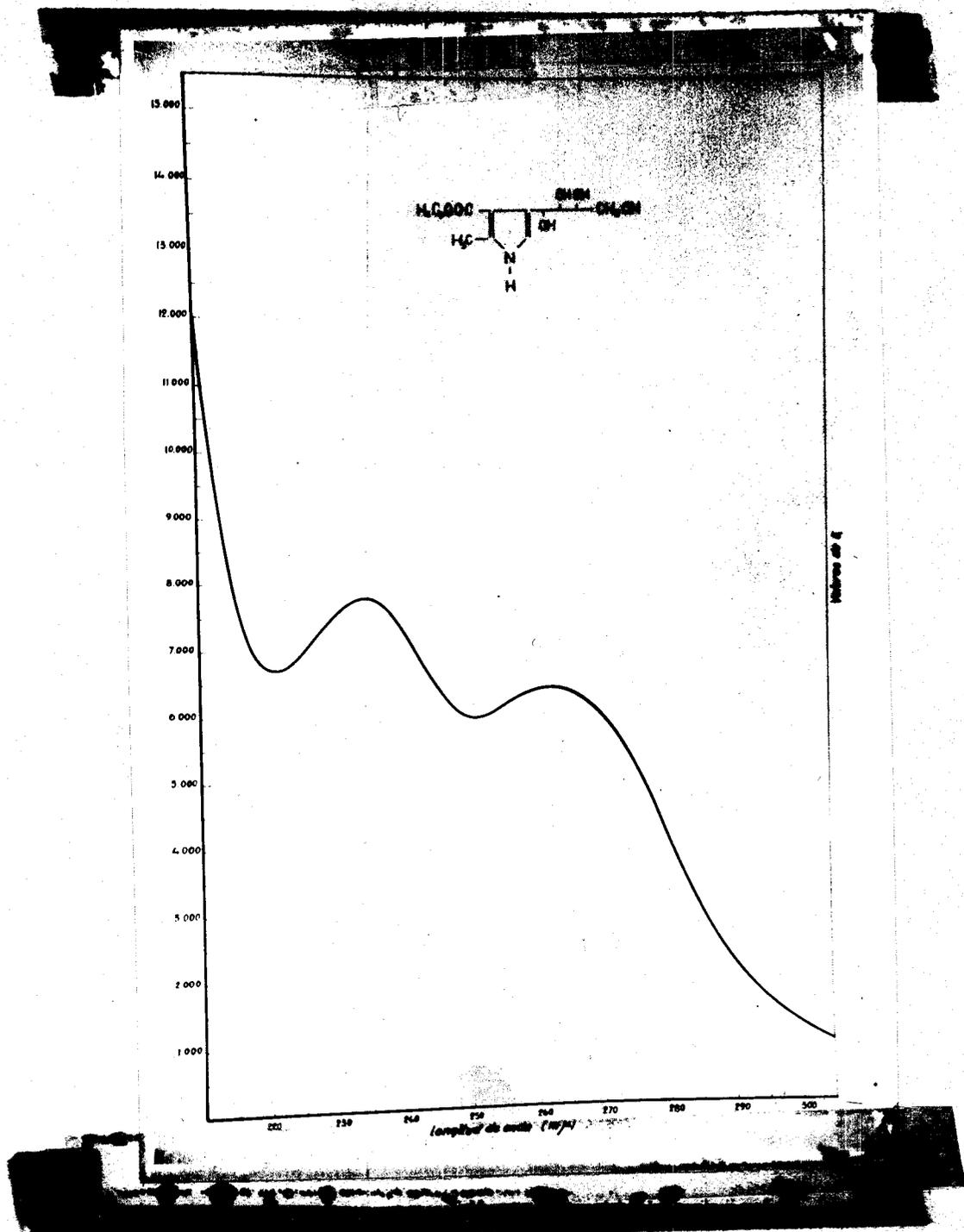
- fig. 10 -

Solvente : etanol

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $3,3 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 1-bencil-2-metil-5-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol



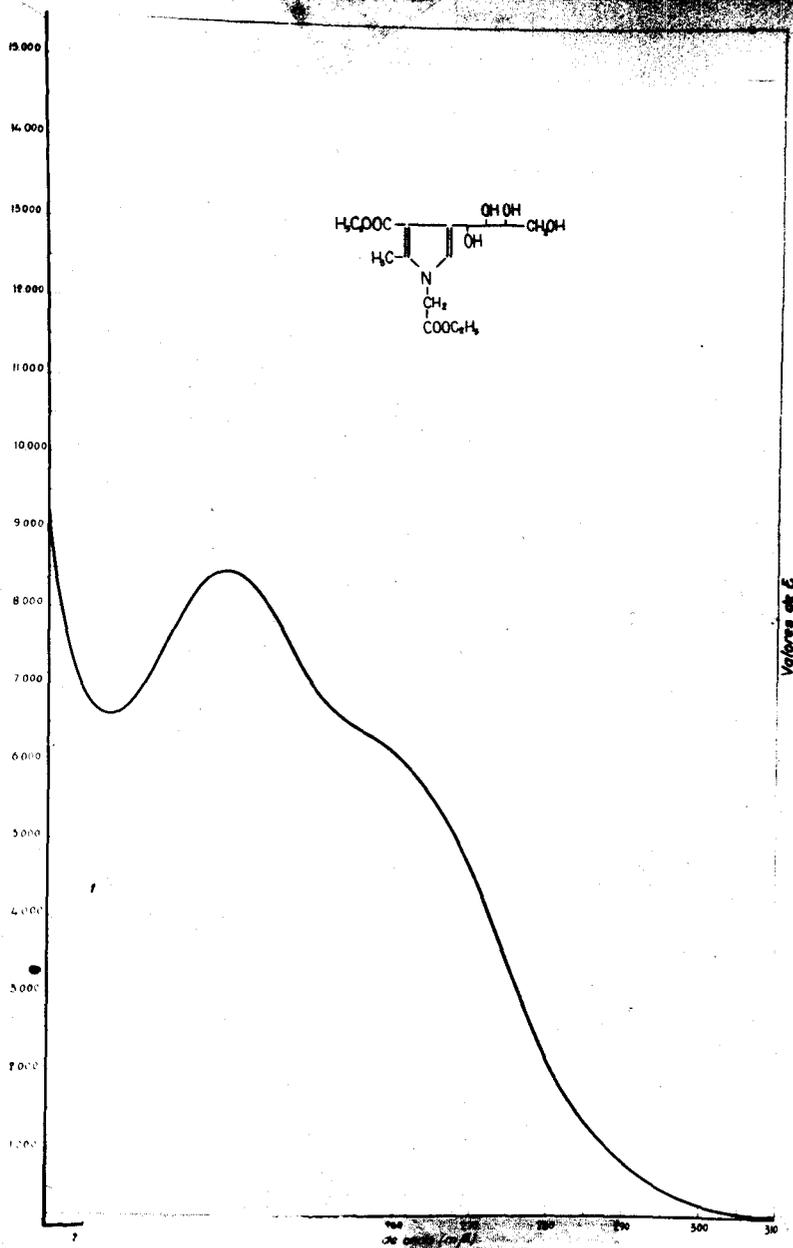
- fig. 11 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : 2,45 · 10⁻⁵ moles / litro.

= 2-metil-4-D-arabotetrahidroxibutil-3-pirrol
 carboxilato de etilo. -



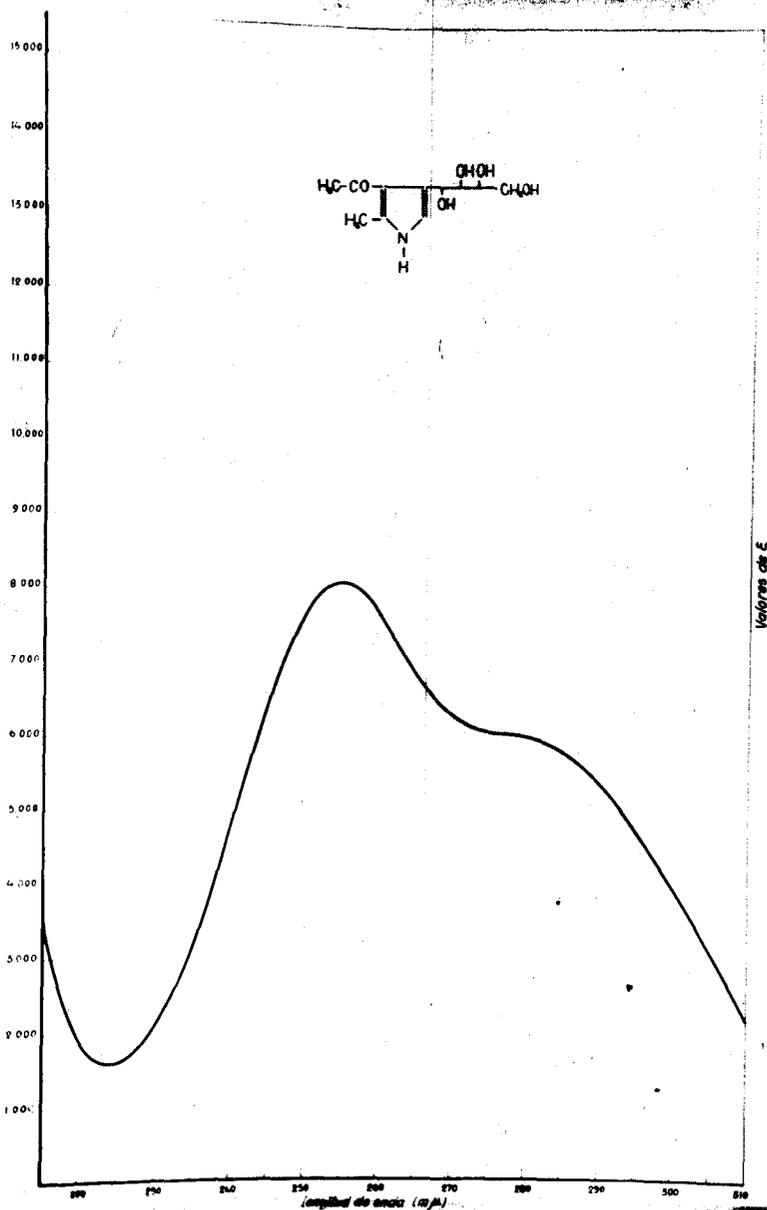
= fig. 12 -

Solvente : H₂O

Caminò óptico : 1 cm.

Concentración : $3,1 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- -Ester etílico del ácido 2-metil-3-pirrol carboxilato de etilo-4-D-arabotetrahidroxibutil-2-acético. -



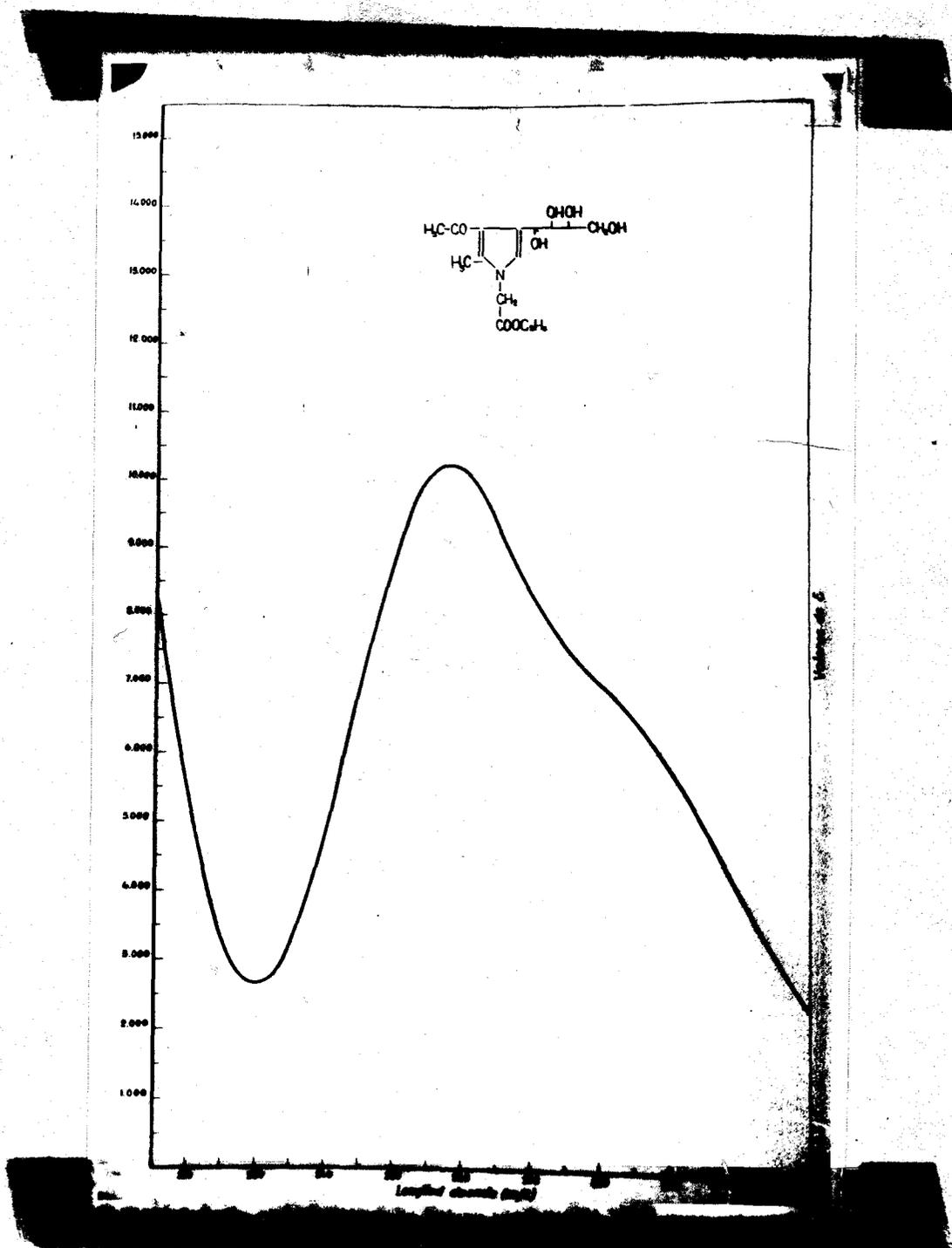
- fig. 13 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

Concentración : $6,8 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- 2-metil-4-D-arabotetrahidroxibutil-3-acetil pirrol. -



- fig. 14 -

Solvente : H₂O

Camino óptico : 1 cm.

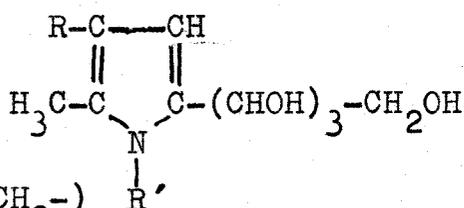
Concentración : $3,1 \cdot 10^{-5}$ moles / litro.

- Ester etílico del ácido 2-metil-3-acetil pirrol-
-4-D-arabotetrahidroxibutil-1-acético. -

C O N C L U S I O N E S

- . CONCLUSIONES . -

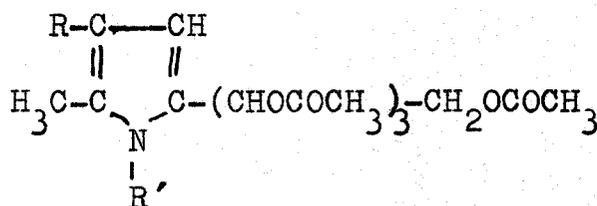
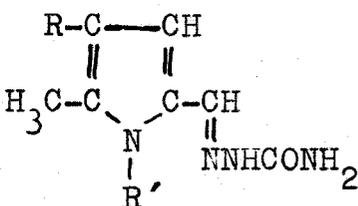
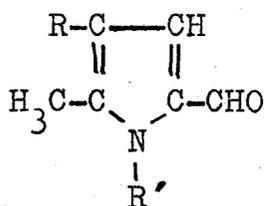
Primera.- A partir de N-alquil-D-glucosaminas ($\text{HCO-CH}_2\text{NR}'-(\text{CHOH})_3\text{-CH}_2\text{OH}$), siendo R' un resto etil, n-butil ó bencil, y compuestos betadicarbonílicos se obtienen, en condiciones tan suaves como las fisiológicas, derivados N-sustituídos del pirrol, de fórmula general :



R' (C_2H_5- ; C_4H_9- ; $\text{H}_5\text{C}_6\text{CH}_2-$)

R ($\text{H}_3\text{CCO}-$; $\text{H}_5\text{C}_2\text{OCO}-$)

Segunda.- Se describen por primera vez los siguientes derivados de los compuestos de la conclusión anterior:



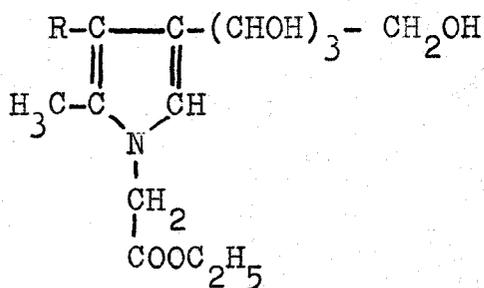
Tercera.- Se demuestra que los fructósidos, D-fructosiletilamina y D-fructosilbencilamina, reaccionan con éster acético ó acetilacetona para dar, con buenos rendimientos, derivados pirrólicos N-alquil-sustituídos, idénticos a los obtenidos a partir de las N-alquil-D-glucosaminas correspondientes de la conclusión primera.

Cuarta.- Se hace extensible la acción catalítica de los compuestos betadicarbonílicos, éster acetilacético y acetilacetona, a la transposición de Amadori "inversa" de fructósidos N-alquil-sustituídos.

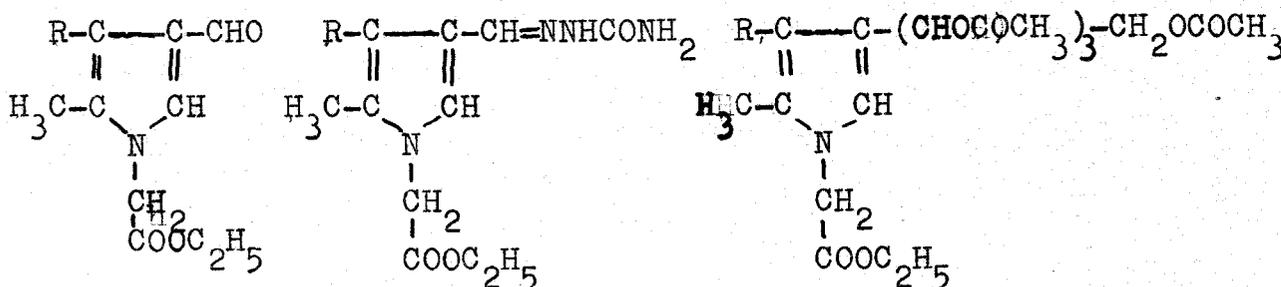
Quinta.- Se indica la formación de núcleos pirrólicos a partir de fructosilaminas como una explicación posible del mecanismo a través del cual las cetosas, en presencia de aminanas, falsean los valores de la determinación de hexosaminas por el método de Elson-Morgan.

Sexta.- Los rendimientos obtenidos en la reacción con acetilacetona de los fructósidos N-sustituídos son superiores a los que se obtienen cuando se investigan glucósidos N-sustitituídos, descritos en la bibliografía. Este hecho está de aguerdo con los datos experimentales, que ponen de manifiesto una mayor interferencia de las cetosas, en relación con las aldosas, en el método de Elson-Morgan para la valoración de hexosaminas.

Séptima.- Se ha hecho reaccionar el 1-aminogliciléster-1-desoxi-D-fructosa con éster acetilacético y acetilacetona obteniéndose pirroles N-sustituídos :



Octava.- Se describen por primera vez los siguientes derivados de los compuestos de la conclusión sexta:



Novena.- Se lleva a cabo por primera vez la síntesis química de derivados del pirrol cuyo nitrógeno procede del grupo amino de un aminoácido, en reacción con un hidrato de carbono.

Décima.- Se indican estos derivados del pirrol como los posibles cromóferos responsables de las interferencias de los aminoácidos en la valoración de aminoazúcares por el método de Elson-Morgan, cuando hay presentes aldosas o cetosas.

Undécima.- Se hace un estudio sistemático de los espectros de absorción ultravioleta de pirroles N-sustituidos.

BIBLIOGRAFIA

- . B I B L I O G R A F I A . -

- (1) H. Pauli y E. Ludwig : Hoppe-Seyl. Z. 121,170(1.922).
- (2) F. García Gonzalez : Anales Fís. y Quím. (Madrid) 32, 815 (1.934).
- (3) F. García Gonzalez : Rev. Acad. Ciencias Madrid, 31, 396 (1.934).
- (4) F. García Gonzalez y R. Trujillo : Anales Fís. y Quím. (Madrid), 33, 566(1.935).
- (5) H. Fischer y M. Hussong : Ann. 492, 146 (1.931).
- (6) A. Müller y L. Varga : Ber., 72, 1993 (1.939).
- (7) H. Fischer y F. Schubert : Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 155, 76 (1.926).
- (8) J. K. N. Jones : J. Chem. Soc., 116 (1.945).
- (9) A. Ollero y R. Castro : Anales Fís. y Quím. (Madrid), 41 B, 868 (1.945).
- (10) J. Fernandez y A. Ollero : Anales real soc. española Fís. y Quím. (Madrid), 44 B, 133 (1.948).
- (11) F. García Gonzalez y R. Castro : Anales real soc. española Fís. y Quím. (Madrid), 46 B, 68 (1.950).

- (12) A. Ollero y J. Fernandez : Anales Fís. y Quím. (Madrid), 41 B, 1165 (1.945).
- (13) F. García Gonzalez y R. Castro : Anales real soc. española Fís. y Quím. (Madrid), 46 B, 73 (1.950).
- (14) F. García Gonzalez, A. Gomez Sanchez y J. Gasch Gomez : Anales real soc. española Fís. y Quím. (Madrid), 54 B, 513 (1.958).
- (15) ídem : ídem, 54 B, 519 (1.958).
- (16) L. A. Elson y W. T. Morgan : Biochem. J., 27, 1824(1.933)
- (17) B. S. Schloss : Analytical Chem., 23, 1321 (1.951).
- (18) H. N. Horowitz, M. Ikawa y M. Fling : Arch. Biochem., 25, 226 (1.952).
- (19) P. W. Kent y M. W. Whitehouse : " Biochemistry of the aminosugars ", Butterworths Scientific Publications , London, (1.955), pg. 181 ;
A. B. Foster y M. Stacey : Adv. in Carb. Chem., 7, 247 (1.952).
- (20) A. Gomez Sanchez y J. Gasch Gomez : Anales real soc. española Fís. y Quím. (Madrid), 54 B, 753 (1.958).
- (21) A. Gottschalk y S. M. Partridge : Nature, 165,684(1.950)=

- (22) A. Gottschalk y S. M. Partridge : Biochem. J., 52, 455 (1.952).
- (23) C. O. Chichester, F. H. Stadtman y G. Mackinney : J. Am. Chem. Soc., 74, 3418 (1.952).
- (24) J. E. Hodge : J. Agri. Food Chem., 1, 929 (1.953) ; Adv. in Carb. Chem., 10, 169 (1.955) .
- (25) G. Weitzel, H. V. Geyer y A. M. Fretzdorff : Chem. Ber., 90, 1153 (1.957).
- (26) E. F. I. J. Anet : Austra. J. of Chem., 10;192 (1.957).
- (27) J. Dubourg y P. Devillers : Bull. soc. Chim. France , 333 (1.957) .
- (28) Hiromichi Kato : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan , 20, 273 , (1.957) .
- (29) S. Lewis y Z. Kosinski : Trans. Faraday Soc. 54, 222, (1.958) .
- (30) T. M. Reynolds : Austra. J. of Chem., 12, 265 (1.959).
- (31) D. C. Inglés : Austra. J. of Chem., 12, 97 (1.959) .
- (32) G. P. Ellis : Adv. in Carb. Chem., 14, 63 (1.959) .
- (33) J. F. Danehy y W. Pigman : Adv. in Food Research , 3, 241 (1.951) .

- (34) B. Jurecka, D. Barszcz, Z. Bergman, B. Bulhak y I. Chmielewska : Przemyst Chem., 13, 343 (1.957) ; Chem. Abst., 52, 5290 (1.958) .
- (35) E. D. Stakheeva-kaverzneva y V. E. Kalis : Biokhimiya., 23, 92 (1.958) ; Chem Abst., 52, 10246 (1.958) .
- (36) L. C. Maillard : Compt. rend., 154, 66 (1.912) ; Compt. rend. Soc. Biol., 72, 599 (1.912) .
- (37) H. von Euler, E. Brunius y K. Josephson : J. physiol. Chem., 153, 1 (1.926) ; 155, 259 (1.926) .
- (38) D. T. Englis y F. A. Dykins : Ind. Chem., Anal. Ed., 3, 17 (1.931) .
- (39) A. Katchalsky : Biochem. J., 35, 1024 (1.941) .
- (40) M. Frankel y A. Katchalsky : Biochem. J., 35, 1034(1.941)
- (41) G. Haugaard, L. Tummerman y H. Silvertri : J. Am. Chem. Soc., 73, 4594 (1.951) .
- (42) J. Watanabe : J. Biochem. (Japan), 16, 163 (1.932).
- (43) R. W. Liggett, C. E. Feasel y J. Y. Ellenberg : J. Agr. Food Chem., 7, 277 (1.959) .
- (44) M. L. Roxas : J. Biol. Chem., 27, 71 (1.916) .
- (45) V. A. Beckley : J. Agr. Sci., 11, 69 (1.921) .

- (46) M. L. Wolfrom, R. D. Schuetz y L. F. Cavalieri : J. Am. Chem. Soc., 71, 3518 (1.949).
- (47) E. L. Richards : Biochem. J., 64, 639 (1.956).
- (48) R. Klemen y E. Seitz : Z. Lebensm.-Untersuch. u.-Forsch, 109, 386 (1.959).
- (49) S. Agren : Acta physiol. Scand., 1, 105(1.940).
- (50) T. Kubota : J. Biochem. (Tokyo), 34, 119 (1.941).
- (51) A. Katchalsky y S. Sharon : Biochim. biophys. Acta, 10, 290 (1.953).
- (52) S. Lewin : Biochem. J., 63, 5 P (1.956).
- (53) S. Lewin : idem. , 61, XXV (1.955) ; 63, 14 (1.956).
- (54) V. H. Haas y E. R. Stadtman : Indus. Engng. Chem.(Indus.) 41, 983 (1.949).
- (55) H. G. Wager : J. Sci. Food Agric., 1, 57 (1.955).
- (56) H. Borsook, A. Abrams y P. H. Lowy : J. Biol. Chem. , 215, 111 (1.955).
- (57) F. Micheel y B. Schleppinghoff : Chem. Ber., 89, 1702 (1.956).
- (58) A. Girard : French. Pat., 1.015.573(1.952) ; Chem. Abst., 52, 1217 (1.958).

- (59) G. Agren y A. Taylor : Arkiv. Kemi, Mineral Geol. ,
14 B, nº 14, 6pp (1.940).
- (60) N. Shiga : J. Biochem. (Tokyo), 25, 607 (1.957).
- (61) L. J. Schroeder, M. Jacobellis y A. H. Smith : J. Biol.
Chem., 212, 973 (1.955).
- (62) C. P. Sideris, H. Y. Young y B. H. Krauss : J. Biol.
Chem., 126, 233 (1.938).
- (63) A. Bendich y E. J. Chargaff : J. Biol. Chem., 166, 283
(1.946).
- (64) E. Vasseur y J. Immers : Arkiv. Kemi, 1, 253 (1.949).
- (65) J. Immers y E. Vasseur : Acta Chem. Scand., 6, 363 (1.952).
- (66) A. Gottschalk y S. M. Partridge : Biochem. J., 46, vi (1950)
- (67) J. W. Cornforth y M. E. Firth : J. Chem. Soc., 1091 (1.958)
- (68) Schiff : Ann. Chem. Pharm., 140, 123 (1.866); 154, 30 (1.870).
- (69) B. Sorokin : J. Chem. Soc., 50, 526 (1.886).
- (70) idem : idem., 54, 807 (1.887).
- (71) idem : J. prakt. Chem., 37, 291 (1.888).
- (72) M. Amadori: Atti reale Accd. nazl. Lincei, (6) 2, 337 (1925).
- (73) idem : idem (6) 9, 68 (1.929).
- (74) idem : idem (6) 9, 226 (1.929).
- (75) idem : idem (6) 13, 72 (1.931).

- (76) R. Kuhn y A. Dansi : Ber., 69, 1745 (1.936).
- (77) R. Kuhn y F. Weygand : Ber., 70, 769 (1.937).
- (78) R. Kuhn y L. Birkofer : Ber., 71, 621 (1.938).
- (79) E. Mitts y R. M. Hixon : J. Am. Chem. Soc., 68, 483 (1.944).
- (80) F. Weygand : Ber., 73, 1259 (1.940).
- (81) idem : Ber., 73, 1284 (1.940).
- (82) F. Weygand y A. Bergmann : Chem. Ber., 80, 255 (1.947).
- (83) F. Weygand, A. Wacker y V. Schmied-Kowarzik : Chem. Ber.,
82, 25 (1.949).
- (84) H. H. Strain y H. A. Spoehr : J. Biol. Chem., 89, 527 (1930).
- (85) L. I. Smith y R. H. Anderson : J. Org. Chem., 16, 972 (1.951).
- (86) R. H. Anderson : J. Org. Chem., 19, 1238 (1.954).
- (87) C. P. Barry y J. Honeyman : J. Chem. Soc., 4147 (1.952).
- (88) B. Helferich y W. Portz : Ber., 86, 604 (1.953).
- (89) J. G. Erickson : J. Am. Chem. Soc., 75, 2784 (1.953).
- (90) K. Heyns y K. H. Meinecke : Ber., 86, 1453 (1.953).
- (91) J. G. Erickson : J. Am. Chem. Soc., 77, 2839 (1.955).
- (92) H. von Euler, H. Hasselquist y H. Wahlstam : Arkiv. Kemi.,
12, 85 (1.957).
- (93) J. F. Carson : J. Am. Chem. Soc., 77, 1881 (1.955).

- (94) A. Abrams, P. H. Lowy y H. Borsook : J. Am. Chem. Soc.,
77, 4794 (1.955).
- (95) idem : idem, 78, 3175 (1.956).
- (96) F. Micheel y A. Frowein : Chem. Ber., 90, 1599 (1.957).
- (97) J. E. Hodge y C. E. Rist : J. Am. Chem. Soc., 75, 316 (1953)
- (98) J. F. Carson : J. Am. Chem. Soc., 77, 5957 (1.955).
- (99) idem : idem, 78, 3728 (1.956).
- (100) K. Heyns, H. Paulsen, R. Eichstedt y M. Rolle : Chem.
Ber., 90, 2039 (1.957).
- (101) F. Knotz : Monatsh. Chem., 68, 703 (1.957).
- (102) J. E. Hodge y C. E. Rist: J. Am. Chem. Soc., 74, 1494 (1952)
- (103) idem : idem, 75, 316 (1.953).
- (104) E. Votocek y F. Valentin: Coll. Czch. Chem. Com., 7 ,
299 (1.935).
- (105) F. Micheel y A. Frowein : Chem. Ber., 92, 305 (1.959).
- (106) K. Heyns, R. Eichstedt y K. H. Meinecke : Ber., 88, 1551 (1955)
- (107) R. T. Bayly, E. J. Bourne y M. Stacey: Natu., 169, 876 (1952)
- (108) L. Berger y J. Lee: J. Org. Chem., 11, 75 (1946); 11, 84 (1946)
- (109) L. Rosen, J. W. Woods y W. Pigman: J. Am. Chem. Soc.,
80, 4697 (1.958).
- (110) idem : Chem. Ber., 90, 1038 (1.957).

- (111) H. G. Isbell y H. L. Frush: J. Am. Chem. Soc., 72, 1043
(1.950).
- (112) *idem* : J. Research Natl. Bur. Stan., 46, 132 (1.951)
- (113) *idem* : J. Org. Chem., 23, 1309 (1.958).
- (114) K. Heyns, H. Breuer y H. Paulsen: Chem. Ber., 90, 1374 (1957)
- (115) J.K. Kiyasu y I.L. Chaikoff: J. Biol. Chem., 224, 934 (1957)
- (116) W. Gordy : J. Chem. Phys., 9, 215 (1.941).
- (117) M. Tamres, S. Scarles, E. M. Leighly y D. W. Mohrman :
J. Am. Chem. Soc., 76, 3983 (1.954).
- (118) L. Friedman y O.L. Kline: J. Biol. Chem., 184, 599 (1.950).
- (119) H.S. Olcott y H.J. Dutton: Ind. Eng. Chem., 37, 1119 (1945)
- (120) E.C. Bate-Smith y J.R. Hawthorne : J. Soc. Chem. Ind.,
297 T (1.945).
- (121) R. Kuhn : Angew. Chem., 69, 23 (1.957).
- (122) K. Heyns y W. Baltes : Chem: Ber., 91, 622 (1.958).
- (123) E. Boyland, D. Manson y S.F.D. Orr : Biochem. J., 65,
417 (1.957).
- (124) J. Axelrod, J. K. Inscoe y G. M. Tomkins : Nature ,
179, 538 (1.957).
- (125) L. W. Parks y H. C. Douglas: Biochim. y Biophys. Acta,
23, 207 (1.957).

- (126) F.W.E. Gibson, C.H. Doy y G.B. Segall : Nature , 181, 550 (1.958).
- (127) B. M. Pogell : Biochim. y Biophys. Acta, 21, 205 (1.956).
- (128) R.L. Whistler y E.J. Olson: Adv. in Carb. Chem., 12 , 313 (1.957).
- (129) L.F. Leloir y C.E. Cardini: Biochim. y Biophys. Acta , 20, 33 (1.956).
- (130) S. V. Rieder y J. M. Buchanan : J. Biol. Chem., 232 , 951, 959 (1.958).
- (131) S. V. Rieder : Dissertation Abstr., 13, 634 (1.953).
- (132) D. Shemin : Symposium on Aminoacid Metabolism, 727 (1.955)
- (133) K. Heynsand y H. Paulsen: Ann., 622, 160 (1.959).
- (134) A. Gottschalk y P. E. Lind : Nature, 164, 232 (1.949).
- (135) A. Gottschalk : Nature, 167, 845 (1.951).
- (136) A. Nauberger : Biochem. J., 32, 1435 (1.938).
- (137) A. Gottschalk y G. L. Ada: Biochem. J., 62, 681 (1.956).
- (138) J. Montreuil : Bull. Soc. Chim. Biol., 333, III-3 (1.957).
- (139) W. pigman, K. Nisizawa y S. Tsviki : Ann. Review Bioch. 28, 15 (1.959).

- (140) A. Gottschalk : Nature, 174, 652 (1.954).
- (141) J. W. Cornforth, M. E. Davies y A. Gottschalk : Proc. Chem. Soc. (Londres), 25, (1.957).
- (142) F. García Gonzalez : Adv. in Carb. Chem., 11,97(1.956).
- (143) F. J. Lopez Aparicio, M. Yruela y F. García Gonzalez : Anales real soc. española Físi. y Quími.,54B,705(1.958).
- (144) S. Hantzsch : Ber., 33, 70
- (145) Bowden, Braude y Jones : J. Chem. Soc., 948 (1.946).
- (146) G. H. Cookson : J. Chem. Soc., 2789 (1.953).
- (147) U. Eisner y P. H. Gore : J. Chem. Soc., 922 (1.958).
- (148) R. Andrisano y G, Pappalardo : Gazz. Chim. Ital., 85, 1430 (1.958).

Reunido el Tribunal de Estudios de la Armada en el día de la ...

en el día de la ...
Don Jose Bello Gutierrez

Tesis Doctoral de

Historia de nuevo pi-

calificación de Subsualiente "cum laude"

Sevilla, a ...

de 195...

El Vocal,

[Signature]

El Vocal,

M. Line

El Vocal,

Jose Lopez

El Vocal Presidente,

Juan Martinez

El Vocal Secretario,

[Signature]

El Doctorando,

Jose Bello Gutierrez