

UNIVERSIDAD IBERO AMERICANA
INCORPORADA A LA U. N. A. M.
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO
DE LA 16 DEHIDROPREGNENOLONA

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PAULA VIVEROS ORTEGA

MEXICO, D. F. 1959



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres:

*Sr. José Guadalupe Viveros Plata y
Sra. Ma. Cristina Ortega de Viveros.*

Con cariño y gratitud infinites.

A mis queridos hermanos.

Con todo respeto y cariño al

*Sr. Quím. Don Luis M. Vereá
Director de la Facultad de Química "Berzelius".*

A mis maestros.

*Agradezco sinceramente al Sr. Inq. Quím. Carlos Manero
y al Sr. Inq. Quím. Pedro Ortiz de Beneficiadora e
Industrializadora, S. A. de C. U. las facilidades que me
fueron concedidas para la realización de esta tesis.*

C A P I T U L O S

Pág.

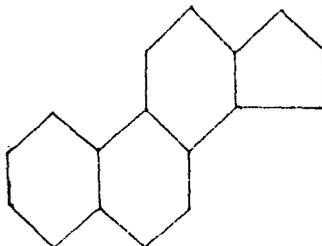
I.-	INTRODUCCION.....	
II.-	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	
III.-	DATOS EXPERIMENTALES.....	
IV.-	CONCLUSIONES.....	
V.-	BIBLIOGRAFIA.....	

CAPITULO I

INTRODUCCION

De la palabra griega stereos que significa sólido se derivó el nombre de esteroi, mismo que inicialmente se aplicó a los alcoholes sólidos que se obtenían de las porciones insaponificables de lípidos obtenidos de extractos tisulares.

En el año de 1935 (5) se aplicó el nombre de esteroide a todos los compuestos que tenían como núcleo -- fundamental el ciclopentanoperhidrofenantreno, cuya -- configuración es la siguiente:



En la actualidad los esteroides abarcan un gran número de compuestos naturales y sintéticos entre los cuales se pueden nombrar los esteroides propiamente dichos, ácidos biliares, hormonas sexuales, hormonas -- adrenocorticales, los glucósidos cardíacos, las sapogeninas, algunos alcoholes y otros grupos menores.

Antes de citar el papel tan importante que la 16--dehidropregnenolona tiene en el campo de los esteroides sintéticos modernos es conveniente hacer mención del --

desarrollo general de estos compuestos.

Con la producción de extractos glandulares se inició una etapa de grandes avances para la biología y la química que culminó con el descubrimiento de las hormonas sexuales y las producidas por la corteza suprarrenal. En este lapso, y con la contribución de varios científicos se logró conocer en forma amplia que las -hormonas además de poseer una actividad específica tienen un conjunto bastante complejo de actividades. De igual modo se consiguieron mayores y mejores fuentes -naturales de abastecimiento.

En 1932 cuando quedó establecida la estructura -del colesterol, Windaws (1,2) publicó algunos reportes sobre la producción de hormonas a partir de algunas --plantas.

Ya conocida esta posibilidad, surgió una intensa lucha de investigaciones tendientes a aislar substan--cias activas tanto en plantas como en animales. Los -glucósidos cardíacos, atrajeron mucho la atención de -los investigadores: tal fué el caso de la digitalis, ya conocida como estimulante cardíaco desde 1785 cuando -se administró como tratamiento para la hidropesía. --Pensando que el principio activo de esa droga podía -ser un esteroide Windaws comisionó este problema a uno de sus discípulos: Rudolf Tscheshe.

El Instituto Rockefeller de investigaciones médicas, W.A. Jacobs y R.C. Elderfield (6) también se ocuparon de este problema; después de dos años dedujeron que el principio activo de la digitalis se debía precisamente a esteroides.

Los glucósidos que se encuentran en esas plantas -tienen la propiedad característica de formar una espu-

ma persistente cuando se ponen en contacto con el agua; por esta característica reciben el nombre de saponinas. Algunas plantas que presentan esta propiedad pero que contienen venenos cardíacos están clasificados separadamente debido a esta acción específica.

Las saponinas por medio de hidrólisis ácida se -- transforman en sapogeninas y azúcares; estas sapogeninas se han dividido en dos grupos diferentes basándose en experimentos de hidrogenación: sapogeninas triterpenoides y sapogeninas esteroides. Hay ciertas diferencias entre sapogeninas y saponinas. Las sapogeninas se aíslan más fácilmente en forma pura que las saponinas, son menos alterables que los glucósidos y más fáciles de caracterizar por los medios ordinarios de identificación.

Las saponinas tienen un peso molecular tan elevado que los análisis solos no son definitivos y las fórmulas empíricas que se les han asignado se infieren de las fórmulas asignadas a las agliconas y de la evidencia que se tiene con respecto a la naturaleza y proporción relativa de los azúcares unitarios.

En los años de 1890 a 1918, Kiliani (1,2) hizo -- una serie de investigaciones en las cuales identificó los azúcares de las principales saponinas de las digitalis y descubrió algunos procedimientos para convertirir la digitonina hasta una serie de productos de degradación ácida.

Este trabajo fue excelente en su experimentación empírica, pero no se puso cuidado en lo que respecta a la técnica e interpretación de los análisis por lo cual las fórmulas propuestas para los ácidos fueron erróneas en muchos casos.

Windows (1,2) que también trabajó con Kiliari sobre los glucósidos cardíacos y las sapogeninas de las digitalis, asignó en 1913 a la digitogenina la fórmula ----- $C_{24}H_{42}O_3$ basándose en algunos análisis, en los cuales se incluyen productos de degradación y la gitogitónida del colesterol.

En posteriores investigaciones Windows encontró que la digogenina, digitogenina y la gitogenina eran compuestos con 26 átomos de carbono.

Power y Sulwy (1,2) clasificaron también la sarsapogenina con la fórmula $C_{26}H_{42}O_3$, pero en 1935 Simpson y Jacobs concluyeron por evidencia analítica que la fórmula debía ser $C_{27}H_{44}O_3$.

La estructura de las sapogeninas y la de los esteroles se relacionaron mediante la deshidrogenación con selenio que conduce en ambos casos al llamado hidrocarburo de Diels. Este trabajo se debe a Ruzicka y a Van -- Veen, que además lograron romper la cadena lateral tratando una sapogenina con agentes oxidantes aislando un -- producto cetónico.

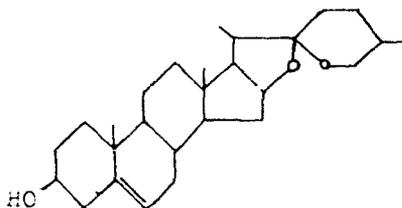
Varias sapogeninas se trataron por estos medios y -- se llegó a la conclusión de que en su molécula hay una -- cadena lateral con ocho átomos de carbono.

También por medio de degradación se encontró que -- existen dos puentes de oxígeno en esta cadena. De acuerdo con lo previsto por Marker, ambos puentes están unidos a la posición 22 y por lo tanto esto da lugar a un -- grupo espiro acetal.

Resumiendo se tiene un núcleo del furano fundido al anillo D y el del pirano unido al carbón 22.

Los esteroides son compuestos cuya estructura se re

laciona a la del ciclopentanoperhidrofenantreno, en la molécula de las sapogeninas hay un núcleo semejante -- por tal motivo ambas estructuras se relacionaron como se ha dicho anteriormente. Para citar un ejemplo, se dá a continuación la estructura de la Diosgenina.



La diosgenina es una sapogenina caracterizada por tener en su molécula una doble ligadura en el carbón 5 y es notable que esta posición de la doble ligadura -- sea constante en los que presentan insaturación dentro de su molécula.

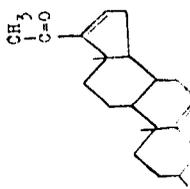
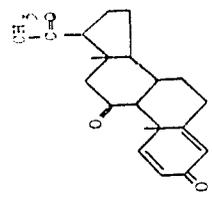
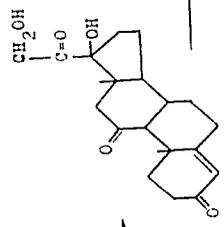
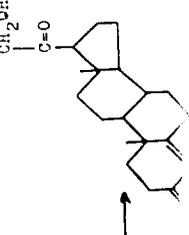
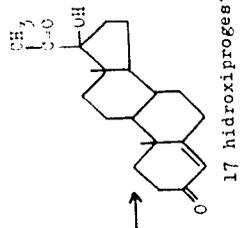
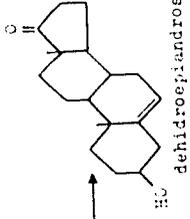
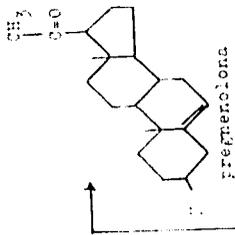
De el descubrimiento de esta estructura surgió la idea de que la diosgenina, podía ser útil para la producción de hormonas sexuales sintéticas.

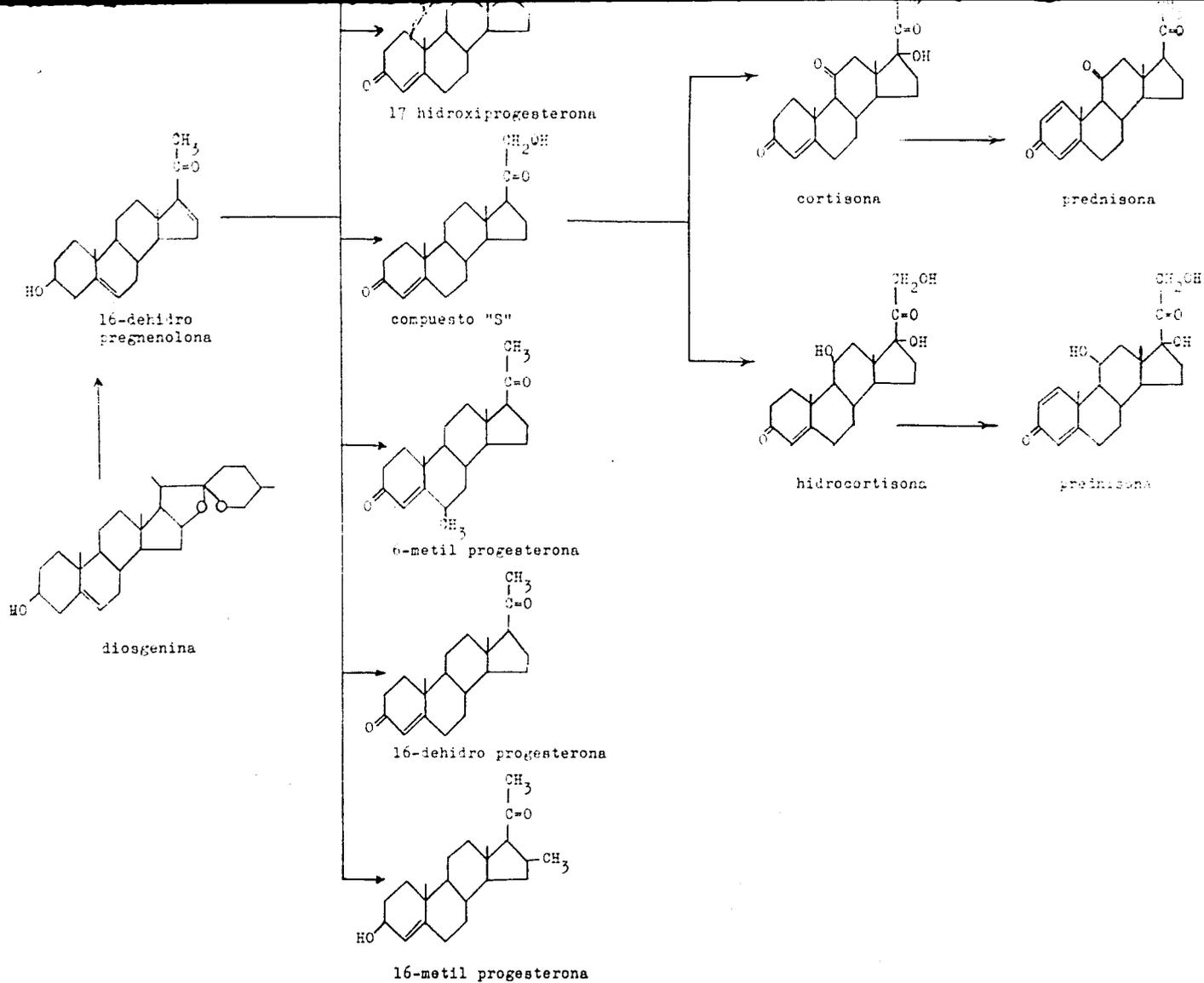
La diosgenina se encuentra en algunas plantas de las familias de las Liliáceas, Escrofulareáceas y de las Dioscoreáceas como por ejemplo: barbasco, cabeza de negro y especuliflora.

Marker demostró que la diosgenina se podía convertir en la dehidroprogesterona, antes de que se usara para la fabricación de progesterona.

Hubo varias compañías que trabajaron en la producción de progesterona a partir de estas plantas.

Mediante procesos sintéticos mas elaborados se ha





logrado transformar la 16 dehidroprogesterona en cortisona que en forma natural es secretada por las glándulas suprarrenales. Esta hormona ha tenido mucha importancia debido a que ayuda a disminuir los padecimientos de la artritis reumatoide; además, se ha descubierto su aplicación en casos de alergia, gota, asma bronquial enfermedad de Addison, etc. con resultados satisfactorios. Como se ve, esta substancia no tiene una acción específica sino que posee gran número de actividades.

Sin embargo se ha observado que con el uso prolongado de esta droga en el tratamiento de algunas afecciones, surgen ciertos efectos poco deseables.

Posteriormente, se descubrieron la prednisona y prednisolona (derivados de la cortisona y de la hidrocortisona respectivamente) compuestos muy usados para esta clase de padecimientos reumáticos que tienen mayor potencia farmacológica, actúan más rápidamente y no presentan los efectos secundarios que se observan con el solo hecho de modificar ligeramente su constitución molecular.

La 16 dehidroprogesterona es un producto intermedio en la síntesis de la cortisona, puede afirmarse -- que constituye el punto de partida para la obtención de un gran número de hormonas sintéticas modernas.

A continuación se presenta un cuadro, en el cual puede observarse el papel tan importante que desempeña dicho producto.

Para el control industrial de la 16 dehidropregnenolona no bastan las constantes físicas como el punto de fusión y la rotación óptica, sino que es necesaria una característica específica que permita determinar rápidamente la pureza de dicho producto.

Estudiando detenidamente su fórmula desarrollada podrá observarse que en la 16 dehidropregnenolona desaparece la cadena lateral presente en la diosgenina y aparece un sistema de dobles ligaduras conjugadas. Este hecho es muy interesante porque representa una propiedad que puede detectarse por medio de la espectrofotometría en la banda ultravioleta, puesto que la absorción a la luz ultravioleta es una característica de compuestos que en su molécula presentan grupos conjugados insaturados.

Siendo la 16 dehidropregnenolona un compuesto -- que tiene esta característica se decidió establecer -- un método espectrofotométrico que permitiera determinar la pureza de dicho producto lo cual resultó tema para esta tesis.

CAPITULO II

TRABAJO EXPERIMENTAL

Como quedó establecido en el capítulo anterior, la absorción a la luz ultravioleta es una característica de esteroides que poseen en su molécula grupos conjugados insaturados siendo este el caso de la 16 dehidroprogesterona se pensó que es posible aprovechar dicha absorción como una prueba mas para su control industrial.

Antes de mencionar el trabajo experimental propiamente dicho, es oportuno citar los principios teóricos que sirvieron de base para este trabajo.

LEYES DE ABSORCION.

Al incidir energía radiante sobre un material, pueden ocurrir tres fenómenos: que la energía sea reflejada, absorbida o transmitida. Generalmente ocurren los tres casos, pero la proporción de cada uno de ellos es diferente a cada longitud de onda.

Ya que uno de los principios básicos de la Física es que la energía nunca puede ser creada ni destruida sino unicamente transformada, se puede expresar el fenómeno anterior por la ecuación siguiente: $R+A+T=I$ expresión frecuentemente conocida como la ley de RAT, la cual establece que la suma de las energías reflejada, absorbida y transmitida siempre es igual a la de la incidente.

La absorción esta regida por dos leyes fundamentales que relacionan la magnitud de absorción y la cantidad de absorbente.

La primera de estas leyes es la de Bouguer, frecuentemente atribuida a Lambert, y expresa la relación entre la capacidad de absorción y el espesor del medio absorbente: si la transmisión a una longitud de onda es T y el espesor es n veces el de una capa sencilla, la transmisión para esa longitud de onda es igual a T^n .

Esta ley puede expresarse de otra forma sencilla diciendo --
que el efecto del cambio de espesor en la capa absorben
es el mismo que si se cambiara el número equivalente
de capas delgadas en un medio óptico.

Es muy importante notar que esta ley establece que
una capa gruesa de un material coloreado puede no tener
el mismo tipo de curva que una capa delgada. Esto es --
un efecto muy común en los colorantes y se designa con
el nombre de Dicroísmo.

La segunda ley, enunciada casi simultaneamente por
Beer y Bernard, establece la influencia de la concentra
ción de una sustancia coloreada en solución en la trans
misión o absorción de energía por dicha solución.

Estos autores encontraron la misma relación entre
transmisión y concentración que Lambert había encontra
do entre transmisión y espesor de la capa. Matemática
mente la ley de Beer se puede expresar por la ecuación:

$$I_t = I_o \times a^{-c}$$

donde:

I_t = energía transmitida

I_o = energía incidente

c = concentración

a = la fracción de energía incidente que --
se transmite por una capa de 1 cm. de
espesor.

En forma sencilla, esta ley establece que, mante--
niendo constante el espesor de la celda, la transmisión
de una sustancia en solución es inversamente proporci
onal a su concentración.

PROCESO DE ABSORCIÓN.

Actualmente todas las radiaciones se consideran co
mo variedades de perturbaciones electromagnéticas y han

quedado, no obstante de tener propiedades tan diversas clasificadas dentro del denominado espectro electromagnético, el cual incluye las ondas hertzianas, los rayos infrarrojos, el espectro visible, los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos gama. Estas radiaciones formadas por trenes de ondas, se les puede describir en términos de su longitud de onda que es la distancia entre dos puntos sucesivos correspondientes del tren de ondas o frecuencia que es el número de ondas completas que pasan por un punto en la unidad de tiempo.

La longitud de onda normalmente se expresa en m. ó cm. pero desde el punto de vista químico es más frecuente expresarlo en micras cuando se refiere a la porción infrarroja del espectro y en milimicras cuando se refiere al visible y al ultravioleta.

La unidad Angstrom se usa más frecuentemente desde el punto de vista físico.

La relación de estas unidades es como sigue:

1 cm.	=	0.01 m.	ó	10^{-2} m.
1 mm.	=	0.001 m.	ó	10^{-3} m.
1 μ .	=	0.001 mm.	ó	10^{-6} m.
1 m μ	=	0.001 μ	ó	10^{-9} m.
1 A ^o	=	0.1 m μ	ó	10^{-10} m.

La porción de el espectro electromagnético usada en espectrometría se divide en la región ultravioleta, que se extiende de 100 a 400 m μ ; la visible, de 400 m μ a 700 m μ ; y la infrarroja de 700 m μ a 400 μ . De acuerdo con algunos autores la división entre el visible y el infrarrojo es a 800 m μ . pero, considerando la sensibilidad del ojo humano, resulta más correcta la clasificación citada.

Al considerar las formas en las cuales la luz y la materia pueden interactuar es conveniente recordar que el contenido de energía en un haz de luz se encuentra dividido en cantidades discretas agrupados en unidades llamadas fotón o cuanto.

El contenido de energía de un fotón depende de la frecuencia de la radiación y se expresa por la ecuación;

$$E = h\nu$$

Donde E es el contenido de energía de un fotón en ergios, ν es la frecuencia en ciclos por segundo y h es la constante de Planck.

De aquí se desprende que una radiación de cierta longitud de onda o frecuencia esta compuesta de fotones que tienen contenidos de energía exactamente iguales.

La intensidad de un haz de radiación es proporcional al número de fotones que pasan en la unidad de tiempo a través de un plano de area unitaria perpendicular a la dirección del haz.

De acuerdo con la teoría cuántica, la materia absorbe radiaciones solamente cuando el contenido de energía de el fotón corresponde a alguna necesidad energética de la substancia que recibe dicha radiación. Estas necesidades dependen de la estructura electrónica de la molécula irradiada.

La energía total de una molécula se puede considerar como la suma de sus energías de translación, electrónica, de rotación y de vibración. La primera de éstos, la de translación o energía cinética es poco interesante en la teoría de absorción, porque las reglas de selección de la mecánica cuántica, prohíben el intercambio directo de energía, entre un campo electromagnético oscilante y el componente de la energía de translación

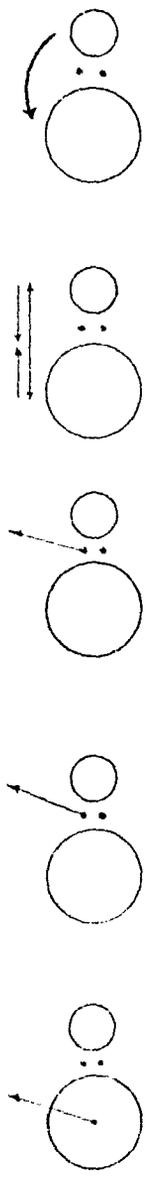
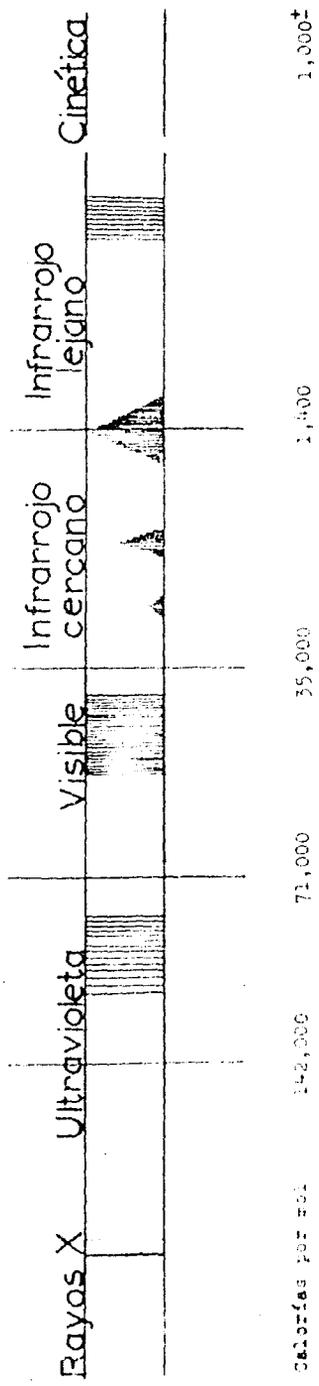
de energía total de una molécula. Esto significa que la absorción de la radiación electromagnética va siempre acompañada de un cambio en la molécula de su momento eléctrico, o sea un cambio de la distribución electrónica -- (energía electrónica), la separación entre dos núcleos -- (energía de vibración), o la rotación de un dipolo (energía rotacional). Por supuesto para tomar una de éstas -- como ejemplo, una vibración una vez iniciada no continúa indefinidamente. La energía ganada originalmente se va perdiendo eventualmente por radiación o por colisión con otra molécula, y así se transforma en energía cinética o térmica. Así, el resultado final en la absorción de luz por una molécula es la liberación de una cantidad equivalente de calor.

Cada uno de los componentes restantes de la energía total de una molécula pueden tener solamente algunos valores llamados niveles energéticos. Se dice que está en estado de reposo una molécula, cuando sus energías electrónica, de rotación y de vibración tienen sus valores mínimos. En este estado, es capaz de absorber energía -- pero solamente en cantidades definidas.

Cuando una molécula se irradia por fotones cuya -- energía corresponde exactamente a la diferencia de energía entre el estado de reposo y algún estado excitado de la molécula, dicha molécula absorbe energía y se eleva a un nivel energético mayor.

Por otro lado, si la energía de un fotón incidente -- sobre una molécula difiere apreciablemente de la diferencia de energías entre el estado de reposo y el excitado, no hay absorción.

En la siguiente figura se resume, objetivamente, el fenómeno de la absorción de radiación en las diferentes partes del espectro electromagnético y la energía de radiación en calorías por mol.



λ : 100 - 400 μ 400 - 700 μ 700 μ - 400 μ

En la parte inferior se dá una representación sencilla de lo que ocurre en un fenómeno de absorción.

Los puntos negros representan electrones y los círculos grandes, átomos en la molécula. Estas consideraciones generales se aplican por igual a moléculas diatómicas y poliatómicas.

La absorción en el infrarrojo lejano provoca la rotación de la molécula tal como se indica por la flecha - curva de la derecha. La absorción en el infrarrojo cercano desplaza los átomos de sus posiciones normales y hace que oscilen hacia atrás y adelante o se muevan lateralmente con movimientos de vaivén dentro de la molécula. - Las rotaciones provocan pequeñas energías que se suman a los desplazamientos atómicos, dando lugar a las bandas de absorción.

Los enlaces intramoleculares se pueden combinar en tal forma para dar armónicas que absorben dos, tres o -- más veces el contenido de energía de la banda de absorción fundamental produciendo bandas de absorción a una longitud de onda que es aproximadamente la mitad o la -- tercera parte de ésta. La probabilidad de absorber energía correspondiente a los, tres o más cuantos es menor -- que la probabilidad de absorber una y así, la banda fundamental es la más prominente y la absorción disminuye, -- es progresivamente menos intenso a armónicas mayores.

Esta disminución en intensidad a las longitudes de onda corta, se representa en la figura reduciendo la altura de las bandas.

En las regiones visible y ultravioleta del espectro la absorción consiste en el desplazamiento de un -- electrón externo de la molécula.

La única diferencia entre el espectro ultravioleta y el visible es que la absorción en el ultravioleta provoca

mayores energías y desplazamientos. Algunas veces la energía de el ultravioleta es suficiente no solo para desplazar al electrón dentro de la molécula sino para arrojarlo enteramente fuera de ella produciendo ionización.

En las regiones visibles y ultravioleta se pueden obtener series de bandas combinando las energías de las tres operaciones del cuanto restringido; desplazamiento de electrón, desplazamiento atómico y rotación molecular.

Los espectros de emisión que se producen cuando los electrones o los átomos vuelven a su posición normal o cuando las moléculas sufren alguna rotación por colisiones u otros medios presentan el mismo espectro que el indicado en la figura.

ABSORCION SELECTIVA Y CONSTITUCION MOLECULAR.

En general la absorción de radiación visible o ultravioleta por un compuesto orgánico se puede efectuar solamente cuando existe algún lugar de insaturación en la molécula.

Por ejemplo el etileno y el acetileno dan bandas de absorción a 190 y 170 $m\mu$ respectivamente. Un compuesto que contenga dos enlaces etilénicos o acetilénicos bien separados uno de otro como el 1,5 hexadieno; $CH_2=CH-CH_2-CH_2-CH=CH_2$ se comportan químicamente como si las dos porciones insaturadas de la molécula fueran completamente independientes uno de otro. Al tratarse con bromo ocurre una adición en 1,2 a través de cada una de las dobles ligaduras; en este aspecto, el 1,5 hexadieno se comportará justamente como el propeno salvo que cada molécula del dieno es capaz de adicionar el doble de bromo que una molécula de propeno. En la misma forma las propiedades ópticas de el dieno serán muy si-

milares a las del propeno: los dos compuestos darán bandas de absorción a una longitud de onda, aproximadamente igual, pero a iguales concentraciones el dieno mostrará una absorción mayor porque contiene dos dobles ligaduras en lugar de una.

Por otro lado, un compuesto que contiene dos ó más dobles ligaduras conjugadas se comportará en forma totalmente diferente. Así, el 1,3 butadieno, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ - tendrá una adición en 1,4 preferentemente que en 1,2 al tratarse con bromo, y en general sus propiedades físicas y químicas son totalmente diferentes de aquellos que podrían predecirse considerando que las dos dobles ligaduras se comportaran totalmente independientes. En resumen la existencia de un sistema conjugado con ligaduras dobles y simples alternados tiene un efecto notable en su estructura electrónica.

No es de sorprender entonces que esa conjugación -- tenga un efecto considerable en las propiedades ópticas de la molécula.

Así, el etileno tiene una banda de absorción a $193\text{m}\mu$ el 1,3 butadieno dá una aproximadamente dos veces más intensa a $217\text{m}\mu$ y debe esperarse que el 1,3,5 hexatrieno dá una banda de absorción más intensa a una longitud de onda mayor.

En otras palabras, el efecto de la conjugación es disminuir la diferencia de energía entre el estado de reposo y el estado de excitación mínimo permisible, y esta diferencia se pierde progresivamente por un incremento - en la longitud de la cadena conjugada.

Por supuesto, hay muchos otros grupos insaturados que al introducirlos en una molécula no absorbente - pueden producir un compuesto que absorbe radiación visible o ultravioleta.

Tales grupos se conocen como cromóforos o cromofóficos. Los grupos cromofóricos comunes incluyen además de

las dobles y triples ligaduras de carbón- carbón, los grupos carbonilo, carboxilo, amido, azo, nitrilo, nitroso, -nitro y tiocarbonilo.

En general cualquier molécula que contiene tal grupo semejante mostrará una banda de absorción en la porción - visible o ultravioleta del espectro, y la posición y la - altura de esta banda será característica del grupo cromóforo que se encuentre presente. Esto significa que por - ejemplo las bandas de absorción de una serie de compuestos como el ácido acético, propánico y butanoico serán casi idénticos.

Por este hecho la espectrofotometría ultravioleta y visible es de gran uso en la diferenciación de gran número de compuestos por ejemplo entre derivados del benceno y - antraceno o compuestos con grupos nitro y nitroso.

Una molécula que contenga dos o más grupos cromofóricos bien aislados, mostrará la banda característica de absorción de cada grupo. Sin embargo, cuando se introduce un nuevo grupo cromofórico en tal posición que quede conjugado con otro grupo ya presente, la estructura electrónica de ambos grupos pueden quedar alterada considerablemente con respecto a sus estados originales. En tal caso, la absorción del compuesto resultante diferirá -- enormemente de la suma de absorciones de los dos cromóforos aislados. Por ejemplo, el benceno dá su mayor banda de absorción a $198 \text{ m}\mu$ seguido por unas series de máximos muy cercanos y al rededor de una longitud de onda de -- $225 \text{ m}\mu$. Estos máximos reflejan los movimientos de vibración del núcleo en el anillo bencénico y aparecen no solo en el espectro del benceno sino también de sus derivados.

Sin embargo, el espectro de un derivado del benceno donde el grupo de sustitución es cromofórico, no dará - totalmente una curva equivalente a la suma del benceno y

del sustituyente cromofórico aislado.

La banda característica del grupo nitro es a $271\text{m}\mu$ en un compuesto como el nitrometano. Pero el espectro del nitrobenzono muestra una absorción mayor a $300\text{m}\mu$ en lugar de $271\text{m}\mu$ debido a la interacción de la estructura electrónica del grupo nitro y la del anillo aromático -- que está conjugado con él; simultaneamente, la banda de absorción que es a $198\text{m}\mu$ en el benzono se substituye -- por una a $252\text{m}\mu$ y la banda de estructura final aparece a $280\text{m}\mu$ en lugar de $255\text{m}\mu$.

Por la discusión anterior podrá pensarse que muchos compuestos orgánicos tienen espectros de absorción característicos en el visible y ultravioleta; sin embargo, ya que la absorción en estas regiones se debe a las estructuras electrónicas de ciertas partes de la molécula cualquier cambio que no afecte a él o los grupos cromofóricos, tendrá muy poco o ningún efecto en absorción visible o ultravioleta. Por ejemplo el espectro del tolueno o del etilbenzono son practicamente idénticos y muy similar al del benzono y los xilenos.

A continuación, se presenta una tabla con las bandas de absorción características de algunos grupos cromofóricos.

Grupo	λ max.(A)	ϵ	λ max.(A)	ϵ
C=O	1870	1000	2800-3200	17
C=C	1990	10,000	2300-2500	0.2
O-H			2300	
O-C			1350	
C-H			1250	

PRINCIPIOS DE MEDICION.

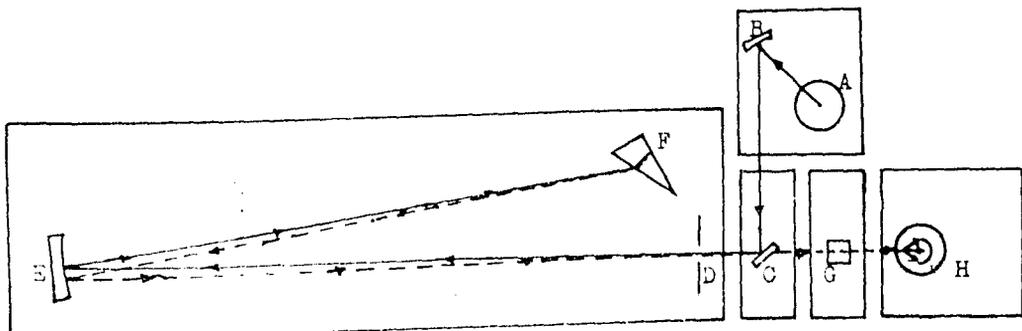
Como quedó asentado a principio de este capítulo, la energía radiante que incide sobre un cuerpo transparente es parcialmente reflejada, absorbida y transmitida.

Estos procesos se denominan respectivamente reflexión, absorción y transmisión y sus magnitudes se expresan en términos de reflectancia, absorbancia y transmitancia y para medirlos se necesitan básicamente:

- (a) Una fuente de energía radiante.
- (b) Un recipiente para muestras.
- (c) Un receptor para la energía radiante.

En los instrumentos de medición modernos, estos factores básicos se encuentran reunidos en tal forma que permiten su uso práctico.

Para las determinaciones experimentales efectuadas en este trabajo se empleó el Espectrofotómetro Beckman modelo D-U cuya descripción se dá a continuación. Para mayor claridad se hará referencia a la figura siguiente.



Básicamente, el instrumento consta de una fuente de energía radiante A que, de acuerdo con la banda del espectro que se desea usar puede ser una lámpara incandescente con filamento de tungsteno o bien un bulbo de descarga lleno con hidrógeno a baja presión. Estas dos fuentes de energía cubren cualquier longitud de onda entre 200 y 1000 $m\mu$.

B es un espejo cóncavo que concentra el haz radiante a través de los espejos C y E al prisma de cuarzo F.

D es un colimador cuya abertura puede variarse de .01 a 2 mm. El haz que incide en el prisma F se refleja nuevamente hacia el espejo E y la celda de muestra G para incidir en el fototubo H.

La celda G puede ser de cuarzo fundido para determinaciones en el ultravioleta, de vidrio óptico para el visible y de algunas sales alcalinas para el infrarrojo. La celda de absorción ideal debe tener las caras ópticas perfectamente planas transparentes y paralelas, completamente libres de rayaduras y su espesor debe conocerse exactamente con objeto de que puedan ser intercambia---bles.

El fototubo consiste de una ampolleta de vidrio al vacío que contiene dos electrodos. Uno de ellos, el cátodo, es una hoja de metal lo suficientemente grande para interceptar completamente el haz de radiación que ha pasado a través de la muestra y está cubierto con una capa de un segundo metal que emite electrones cuando se ilumina.

La naturaleza de esta capa determina las longitudes de onda dentro de las cuales se puede usar el tubo. El fototubo puede estar recubierto de óxido de cesio o bien de una aleación de cesio y antimonio de acuerdo con la sensibilidad que se desee.

El primero de ellos se usa para longitudes de onda comprendidas dentro del espectro visible y el segundo - para la porción ultravioleta.

Los electrones emitidos por el cátodo al ser iluminado son atraídos al ánodo, el cual consiste de un alambre que se mantiene a un potencial moderadamente positivo con respecto al cátodo. En esta forma, fluye por el fototubo una corriente que es proporcional a la energía radiante que incide en el cátodo. Esta corriente muy pequeña de por sí, se alimenta a un circuito electrónico para amplificarla a un valor tal que permita medirla fácilmente y detectar con exactitud cualquier variación en la absorción de la muestra.

Exteriormente, el espectrofotómetro Beckman presenta los controles necesarios para variar las condiciones de trabajo y efectuar los ajustes eléctricos y mecánicos necesarios para las mediciones, dichos controles son:

Un switch selector para el encendido del instrumento y elección de las escalas de sensibilidad del aparato, un reostato para anular la corriente generada por el amplificador electrónico cuando el fototubo no recibe energía radiante, un potenciómetro para balancear el galvanómetro, un control para variar la longitud de onda, con escala calibrada de 200 a 2000 $m\mu$, un potenciómetro para balancear el galvanómetro indicador, con escala calibrada en % de transmisión y densidad óptica, - un galvanómetro indicador, un colimador con escala calibrada de .01 a 2 mm., un switch obturador para aislar el fototubo de la celda, una corredera que permite usar alternativamente hasta cuatro celdas, un switch de corredera para alinear ópticamente y conectar eléctricamente cualquiera de los dos fototubos citados.

Como aditamentos externos al aparato figuran una - batería de 6 Volts, un cargador de dicha batería con varias baterías para proporcionar los voltajes necesarios al instrumento, una lámpara de tungsteno y una lámpara de hidrógeno con su fuente de energía propia.

TRABAJO EXPERIMENTAL.

De acuerdo con algunos autores la absorción característica de cetonas insaturadas en posiciones α y β - presentan su absorción máxima en la región de 230 a 260 $m\mu$, atribuible en gran parte al sistema conjugado que presentan en su molécula algunos esteroides, entre los cuales puede considerarse la 16 dehidropregnenolona, y presentan además una segunda banda de menor intensidad de 315 a 320 $m\mu$ que se puede atribuir al grupo cetónico propiamente. Por otro lado, considerando las bandas de absorción características del grupo cetónico y el -- grupo C = C (ver tabla # 3) se supuso que la longitud de onda característica para la 16 dehidropregnenolona - debería encontrarse dentro de estos límites. Entonces el paso preliminar fué seleccionar un solvente adecuado, transparente dentro de esas longitudes de onda. Se seleccionaron varias substancias en las cuales, de acuerdo con la literatura, la solubilidad de la 16 dehidropregnenolona estaba dentro de límites aceptables.

Las determinaciones de % de transmisión que se hicieron al Dioxano, Tetracloruro de carbono, Cloroformo, Alcohol isopropílico, Acetona, y Metanol entre 225 y -- 300 $m\mu$ decidieron que el metanol podía ser el solvente adecuado.

Todas estas determinaciones se hicieron tomando -- una celda vacía como referencia (100 % de transmisión).

Elegido el metanol como solvente apropiado desde -

el punto de vista espectrofotométrico se procedió a la determinación de la solubilidad máxima de la 16 dehidropregnenolona en dicho solvente.

Esta prueba se llevó a cabo usando un vaso de precipitado provisto de agitador magnético y termómetro - para indicación de la temperatura. La concentración - máxima antes de llegar a la saturación resultó de 1.5g por 100 ml concentración que desde luego se juzgó más- que suficiente para una determinación del tipo que se- intentaba.

Como concentración inicial para determinar la lon- gitud de onda a la cual la 16 dehidropregnenolona pre- senta su máxima absorción se escogió la de 500 mg por 100 ml de solución.

Al intentar hacer lecturas de esta muestra se en- contró que la densidad óptica era tan alta que hacía - imposible la obtención de lecturas que pudieran consi- derarse satisfactorias.

En vista de este resultado se adoptaron otras con- centraciones menores del orden de 50 mg, 25 mg, 10 mg, 5 mg y 1 mg por 100 ml siendo esta última concentración la que permitió una sensibilidad, por lo menos inicial- mente, lo suficientemente aceptable para poder hacer - lecturas en el instrumento.

Se hicieron una serie de lecturas de densidad óp- tica a longitudes de onda de 225 a 265 $m\mu$ y en esta - forma se encontró que la longitud de onda a la cual la muestra presenta su mayor absorción es a 239 $m\mu$.

Posteriormente se hicieron varias determinaciones semejantes pero con diferentes muestras del producto - industrial previamente recristalizado y tratado con -- carbón activado para purificarlo. Todas las muestras- coincidieron en una absorción máxima a 239 $m\mu$, longi-

tud de onda que estaba dentro de los límites previstos.

El siguiente punto fué afinar la concentración que pudiera considerarse realmente óptima para estas determinaciones: se escogieron concentraciones de 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mg por 100 ml de solución con diversos materiales para estudiar en que límites de sensibilidad -- podían obtenerse datos mas uniformes y seguros para el control industrial de dicho producto.

Teniendo como guía las características de punto de fusión y rotación de estas muestras como índice de pureza, se trataron de coordinar los datos obtenidos en esta prueba, deduciéndose que la concentración a la cual los resultados son mas consistentes es de 2.5 mg por -- 100 ml de solución.

Se establecieron ciertos límites de concentración -- porque resultaba muy estrecho 2.5 mg por 100 ml.

Para establecer estos límites, se hicieron varias -- determinaciones escogiéndose concentraciones de 2.3, -- 2.4, 2.6 y 2.7 mg por 100 ml de solución; la sensibilidad permaneció constante hasta 2.6 mg, porque a 2.7 mg empezó a disminuir, lo cual indicó que los límites estaban entre 2.3 y 2.6 mg por 100 ml de solución.

Ya establecidas la longitud de onda máxima y la -- concentración óptima, fué necesario, para preveer lo establecido por la ley de Lambert respecto a la diferencia que puede existir entre dos curvas de absorción de un mismo material a diferentes concentraciones, repetir las pruebas de concentración de 2.5 mg por 100 ml de solución de la 16 dihidropregnenolona, a longitud de onda de 22 μ a 26 μ m μ . Los datos obtenidos fueron practicamente similares a los obtenidos a la concentración inicial de 1 mg por 100 ml de solución, es decir el tipo -- de curva fué el mismo.

CAPITULO III

DATOS EXPERIMENTALES

Como quedó establecido en el capítulo anterior las determinaciones fundamentales fueron las siguientes:

- 1.- Escoger un solvente que tuviera la propiedad de -- ser transparente a las longitudes de onda de 225 a 300 $m\mu$.
- 2.- Determinar la longitud de onda a la cual la 16 dehidropregnenolona presenta su máxima absorción.
- 3.- Determinar la concentración que pudiera considerarse realmente óptima.

Los resultados que se obtuvieron para escoger el solvente se muestran en la tabla # I, esta indica los resultados de % de transmisión, a longitudes de onda de 225 a 300 $m\mu$ de todos los solventes que se usaron, Según estos datos el solvente apropiado desde el punto de vista espectrofotométrico fué el metanol.

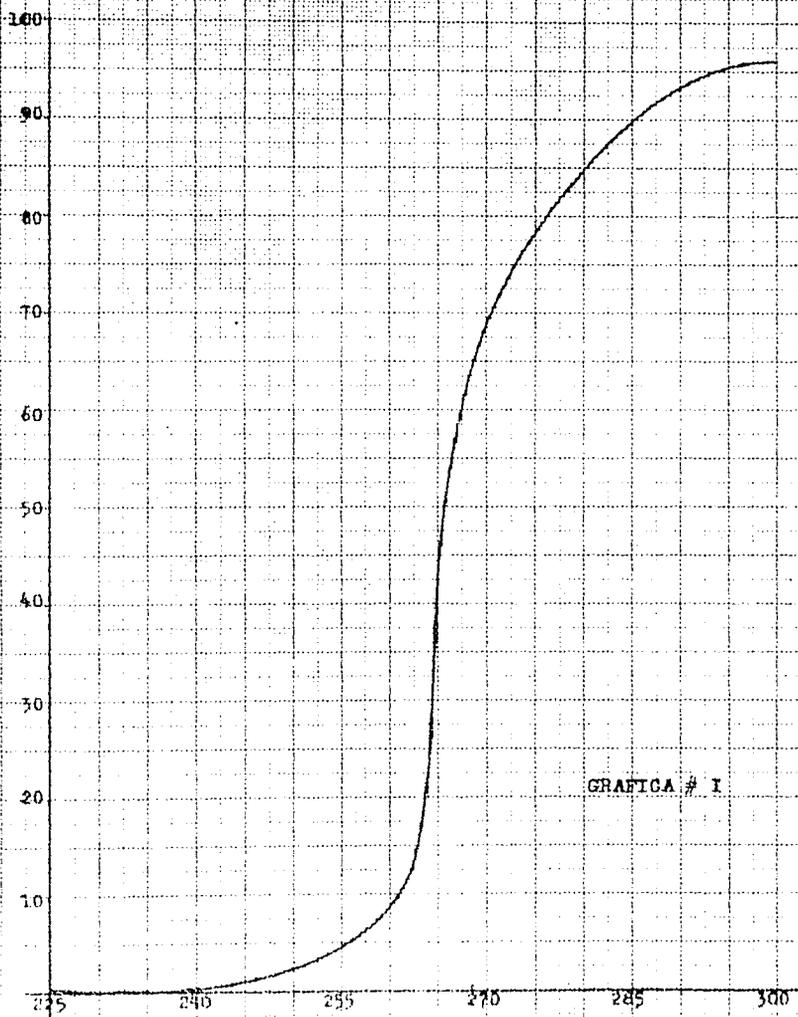
Estos datos se representan en forma gráfica considerando en el eje de las abscisas la longitud de onda y en el de las ordenadas el % de transmisión, en ellas se observa la variación de la transmisión de los diferentes solventes de 225 a 300 $m\mu$.

T A B L A # 1

Longitud de Onda	% D E T R A N S M I S I O N					
	$C_4H_8O_2$	CCl_4	$CHCl_3$	$(CH_3)_2CHOH$	CH_3COCH_3	CH_3OH
285	.2	.1	.2	.1	.1	55
30	.25	.2	.3	.05	.2	67
35	.05	.5	.55	.1	.2	71
40	.05	.4	.25	.1	.25	75.5
45	1.05	.45	11.5	.15	.25	79.5
50	3	.5	44.5	.15	.25	80.5
55	5	1.1	60	.15	.25	78
60	8	10.5	65	.15	.25	77
65	40.5	11.5	50.5	.2	.25	81
70	45	67	74	.5	.25	84
75	75.5	84	79.5	1.1	.25	95
80	84	93	83	2.2	.4	97.5
85	89.5	97	87	3.3	.5	98.5
90	93.5	99	91	5.5	.5	98.5
95	98.5	101	93.5	10	.5	100
100	96	102	97.1	19	.55	101

Variación de la Transmisión
a diferentes longitudes de onda.
BIORANC

TRANSMISIÓN

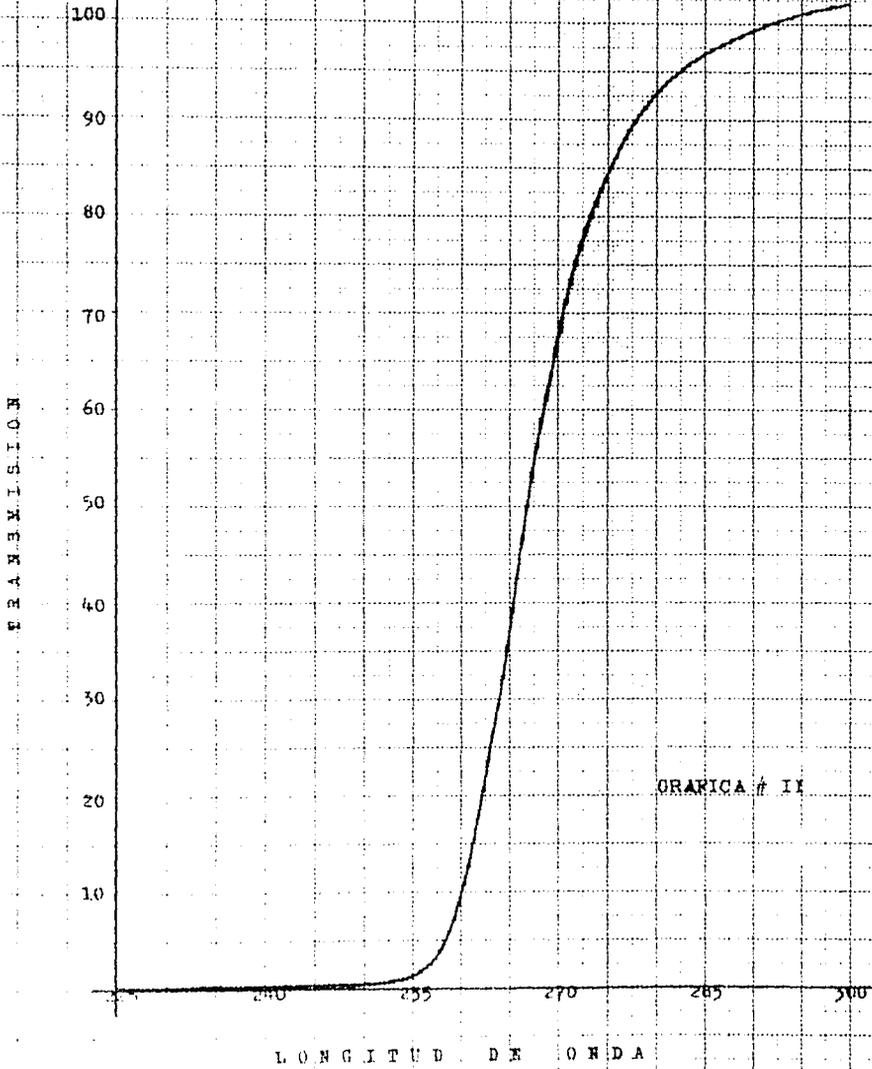


GRAFICA # I

LONGITUD DE ONDA

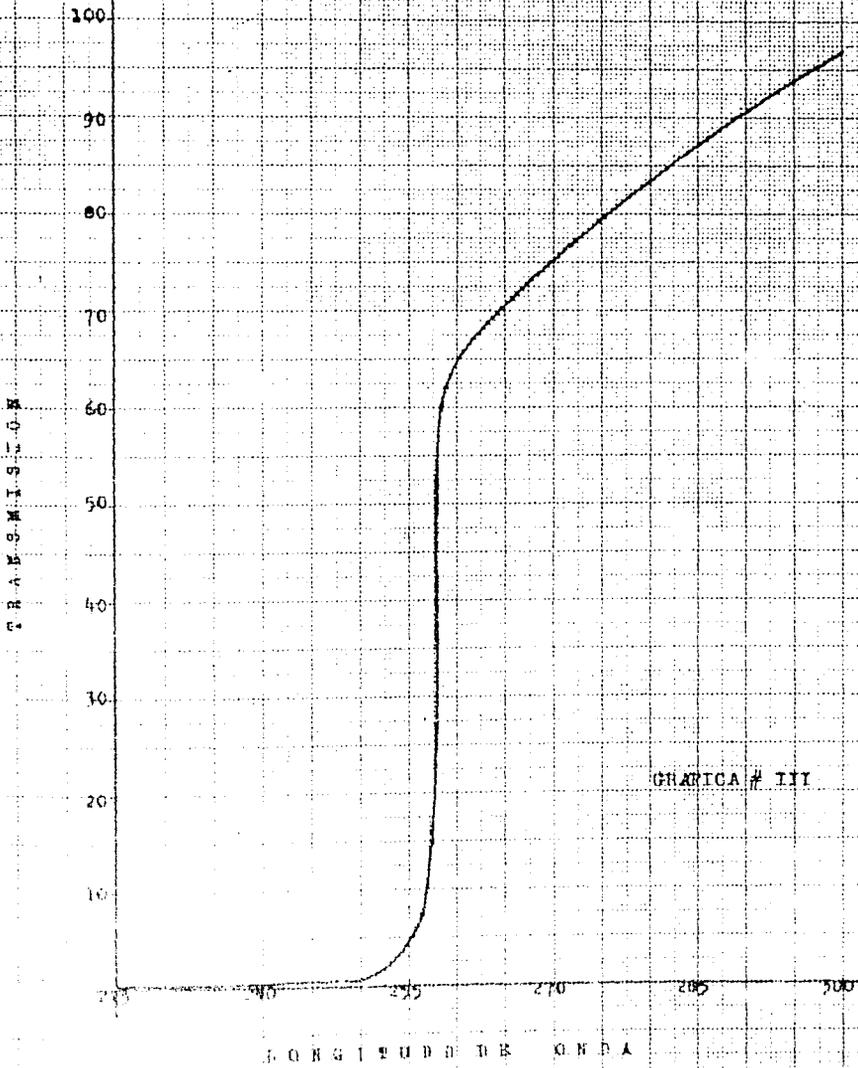
Variación de la Transmisión
a diferentes longitudes de onda.

TETRACLORENO DE CARBONO.



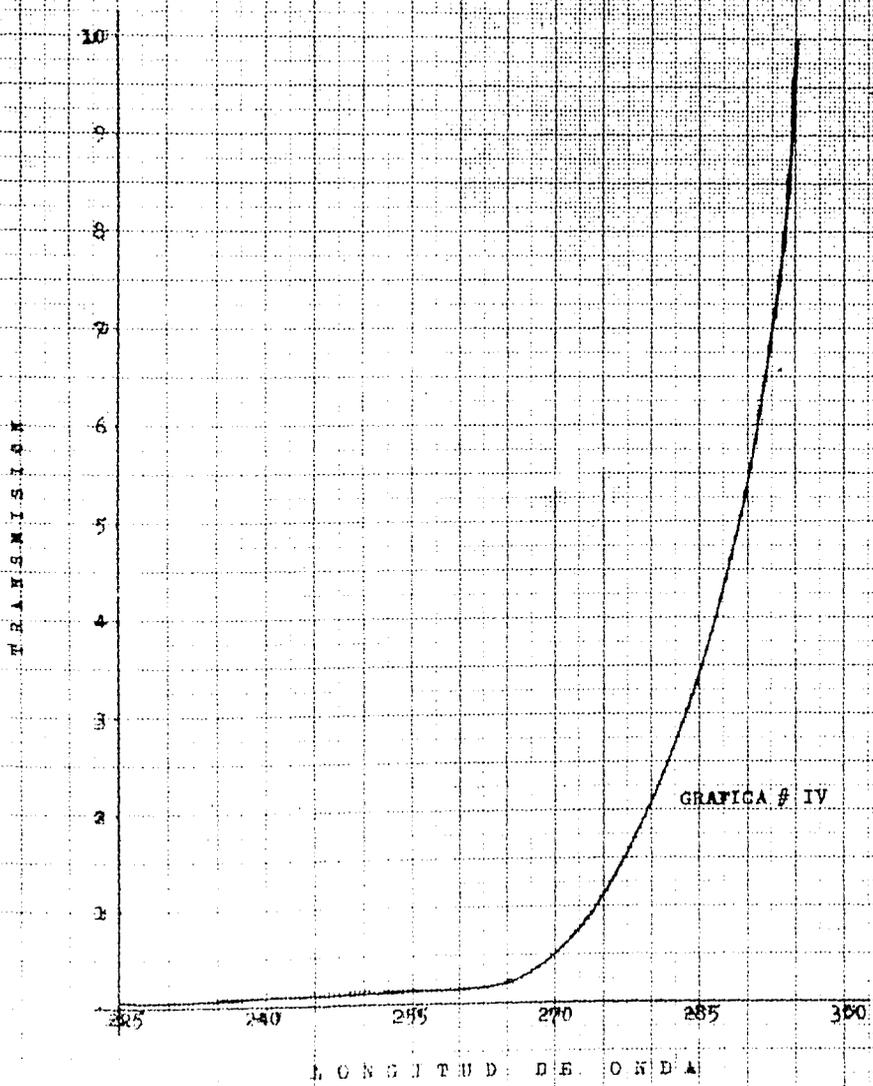
Variación de la Transmisión
a diferentes longitudes de onda.

CLOROFORMO



GRAFICA # III

Variación de la Transmisión a
diferentes longitudes de onda.
ALCOHOL ISOPROPILICO.



GRAFICA # IV

Variación de la Transmisión a
diferentes longitudes de onda.
ACETONA

TRANSMISIÓN

0.5

0.4

0.3

0.2

0.1

225

240

255

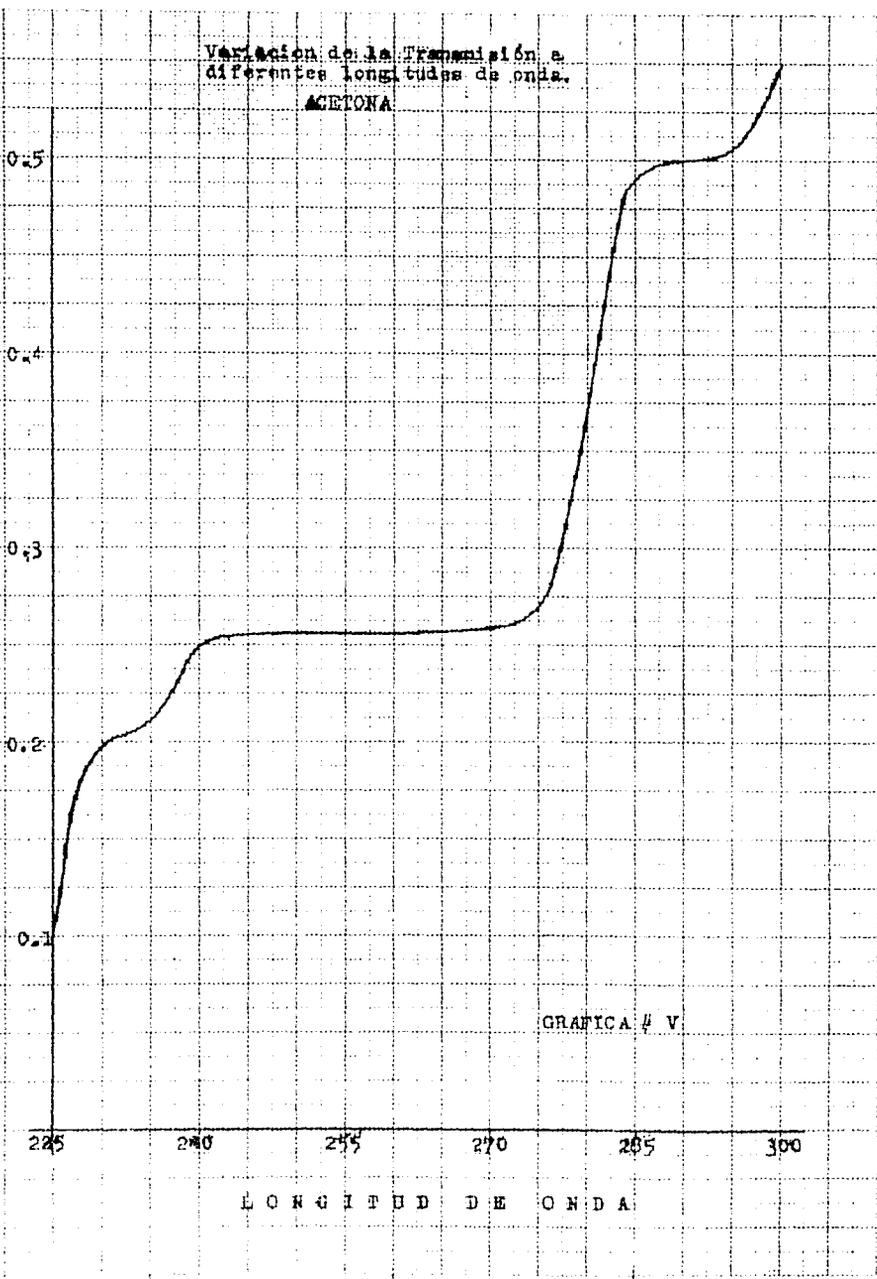
270

285

300

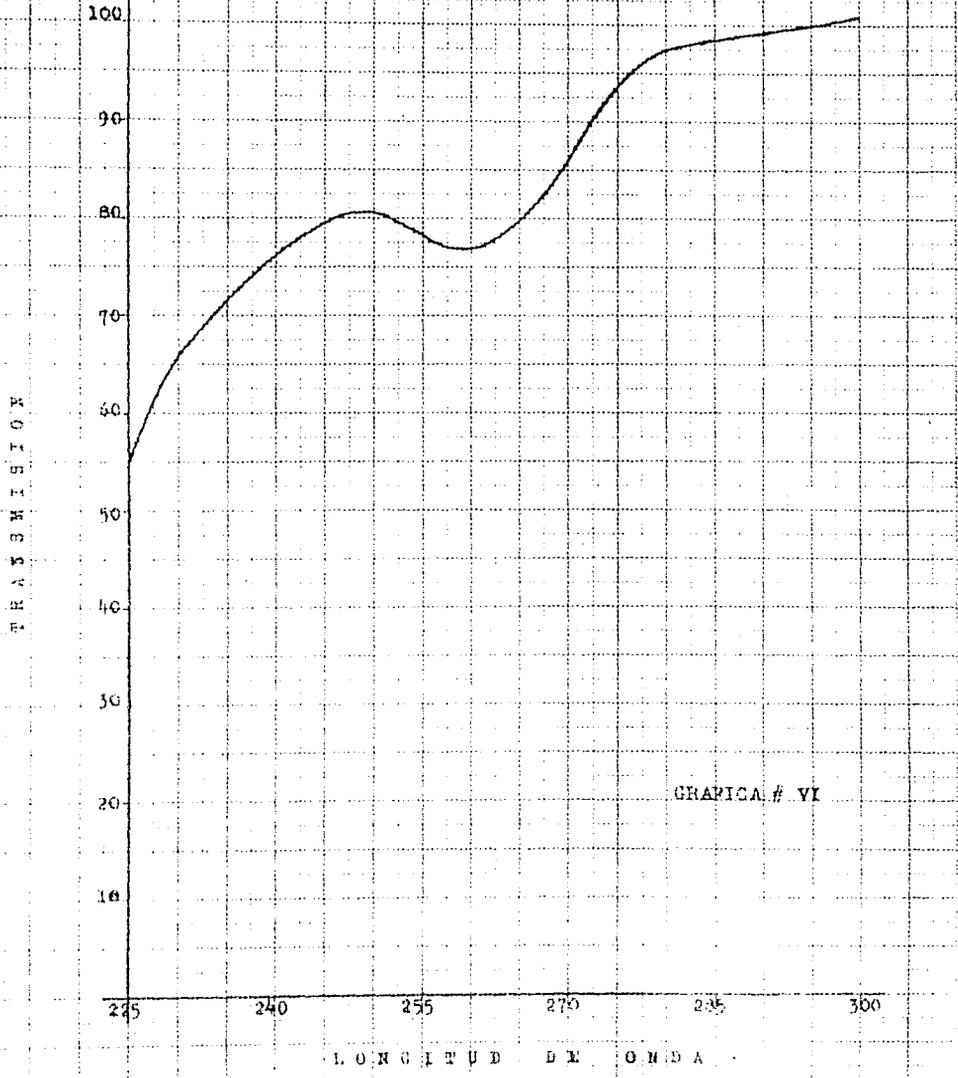
LONGITUD DE ONDA

GRAFICA # V



Variación de la Transmisión
a diferentes longitudes de onda.

METALOI



GRAFICA # VI

La Tabla # 2 muestra las constantes físicas: punto de fusión y rotación óptica de cada una de las muestras que se escogieron para trabajar.

T A B L A # 2

Muestra	Punto de Fusión	Rotación
I	217 - 218 - 219	-35.2
II	216 - 217 - 218	-39.6
III	216 - 217 - 218	-34.0
IV	216 - 217 - 219	-35.9
V	217 - 218 - 219	-35.8

Para determinar la longitud de onda se escogieron varias concentraciones, siendo la de 1 mg por 100 ml la que permitió una sensibilidad suficiente para hacer lecturas de densidad óptica a longitudes de onda de 225 a 265 $m\mu$.

El resultado de esta determinación fué que la longitud de onda a la cual la 16 dehidropregnenolona presenta su máxima absorción es a 239 $m\mu$.

Esta prueba se repitió usando diferentes muestras y todas coincidieron.

La tabla # 3 indica los resultados que se obtuvieron en estas determinaciones.

En la gráfica se observa la variación de la densidad óptica a las longitudes de onda de 225 a 265 $m\mu$ -- siendo la máxima a 239 $m\mu$.

T A B L A # 3

Longitud de Onda	D E N S I D A D O P T I C A				
	Muestra I	Muestra II	Muestra III	Muestra IV	Muestra V
225	.195	.180	.155	.174	.220
30	.240	.235	.205	.220	.230
35	.290	.255	.235	.255	.308
36	.295	.265	.255	.265	.312
37	.305	.270	.260	.266	.315
38	.308	.275	.270	.267	.318
39	.310	.276	.273	.275	.325
40	.308	.275	.271	.270	.314
41	.305	.270	.263	.266	.310
42	.297	.268	.260	.265	.308
43	.292	.265	.253	.260	.300
44	.285	.255	.247	.250	.293
45	.275	.245	.233	.243	.285
50	.200	.178	.165	.175	.208
55	.115	.092	.067	.090	.125
60	.050	.025	.030	.030	.055
65	.007	.005	.0	.005	.015

Variación de la Densidad Óptica
a diferentes longitudes de onda.
Concentración: 1. Mgr./100 ML.

Muestra # 1

DENSIDAD ÓPTICA

0.30

0.25

0.20

0.15

225

230

235

240

245

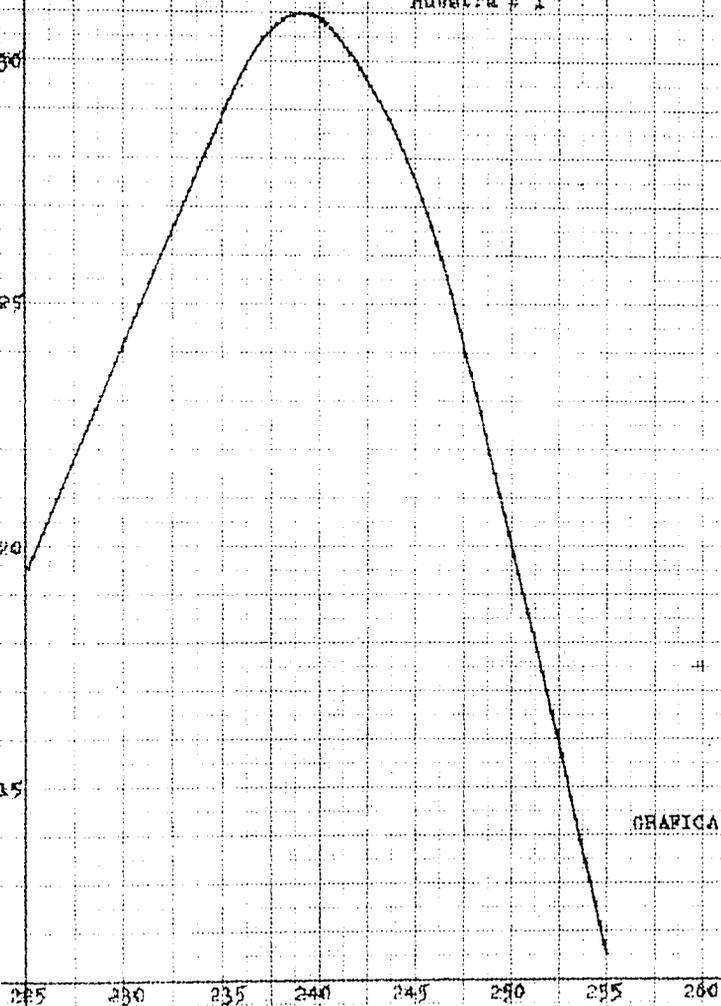
250

255

260

LONGITUD DE ONDA

GRAFICA # VII



Los resultados obtenidos para determinar la concentración óptima se muestran en la Tabla # 4.

En esta determinación se escogieron varias concentraciones: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mg por 100 ml. A la concentración de 2.5 mg por 100 ml las lecturas de Densidad óptica fueron más precisas, lo cual indicó que con esta concentración la sensibilidad que se tiene es suficiente para obtener datos uniformes y seguros.

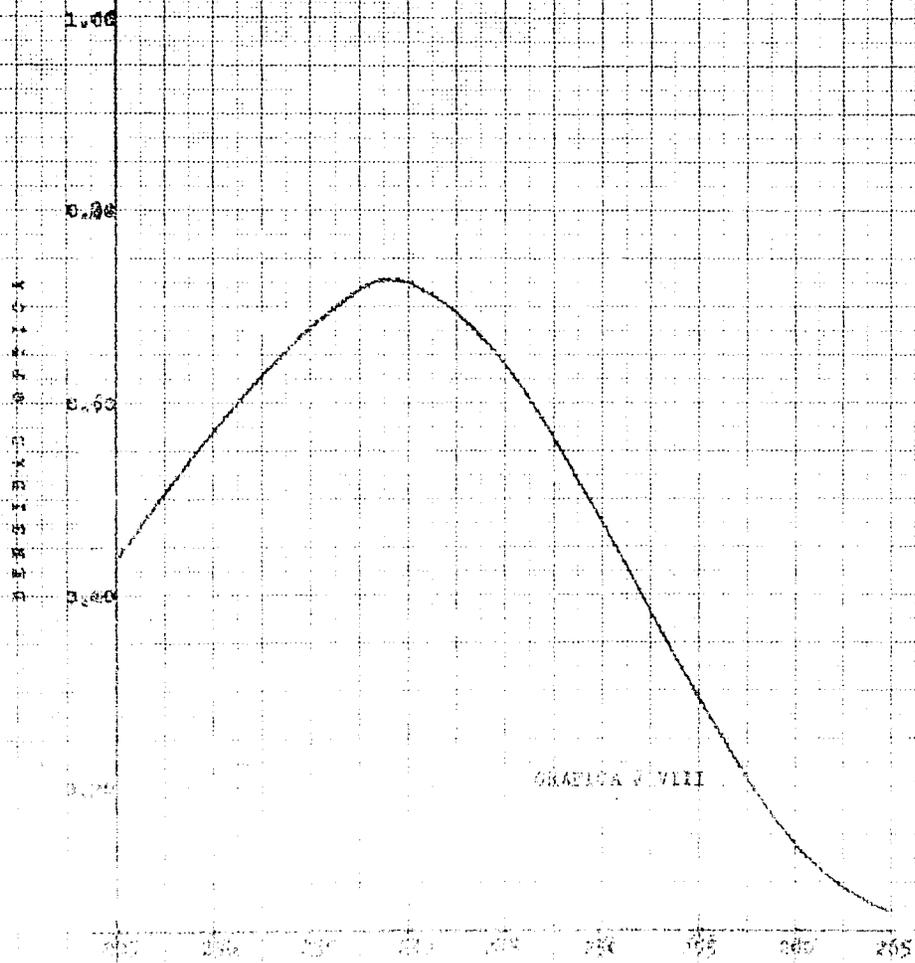
En la gráfica se observa el tipo de curva, que es similar al de 1 mg por 100 ml en ella varía la densidad óptica a las longitudes de onda de 225 a 265 $m\mu$, siendo la máxima absorción a 239 $m\mu$.

T A B L A # 4

Longitud de Onda	D E N S I D A D O P T I C A				
	Muestra I	Muestra II	Muestra III	Muestra IV	Muestra V
225	.440	.430	.410	.418	.445
30	.570	.555	.470	.540	.585
35	.680	.675	.698	.660	.700
36	.698	.690	.668	.669	.710
37	.710	.700	.675	.675	.721
38	.718	.710	.688	.700	.722
39	.730	.725	.725	.720	.732
40	.720	.715	.690	.690	.725
41	.715	.710	.680	.680	.721
42	.700	.695	.675	.672	.718
43	.690	.680	.660	.660	.698
44	.670	.665	.640	.640	.678
45	.645	.638	.620	.620	.660
50	.480	.480	.450	.455	.488
55	.297	.285	.255	.268	.293
60	.140	.063	.085	.108	.137
55	.040	.027	.025	.015	.040

Variación de la Densidad Óptica
a diferentes longitudes de onda.
Concentración: 2.5 Gr/100 ml.

Muestra # 1



GRAFICA V VIII

LABORATORIO DE QUÍMICA

La tabla # 5 indica las lecturas de densidad óptica, de diferentes muestras, a longitud de onda de 239m y a concentraciones de 0.5 a 3.5 mg por 100 ml.

En estas determinaciones se usaron 6 muestras de las cuales la # VI era una muestra de mala calidad. A la concentración de 1 mg por 100 ml no hay ninguna diferencia entre un producto de buena calidad y uno de mala calidad, la sensibilidad que permite esta concentración no es suficiente para distinguir un producto de otro; - en cambio la concentración de 2.5 mg por 100 ml permite una sensibilidad mejor de tal manera que los resultados obtenidos así, son precisos y dan la diferencia clara - entre una muestra de buena calidad y una de mala calidad. Por todo esto se decidió que la concentración debía ser de 2.5 mg por 100 ml.

Como se dijo en el capítulo anterior se establecieron ciertos límites de concentración porque resultaba - muy estrecho 2.5 mg por 100 ml y para establecer estos límites de concentración se hicieron varias determinaciones escogiéndose concentraciones de 2.3 a 2.7 mg por 100 ml.

Los resultados que se obtuvieron en esta prueba indicaron que los límites de concentración están entre -- 2.3 y 2.6 mg porque a 2.7 mg la sensibilidad ya disminuye.

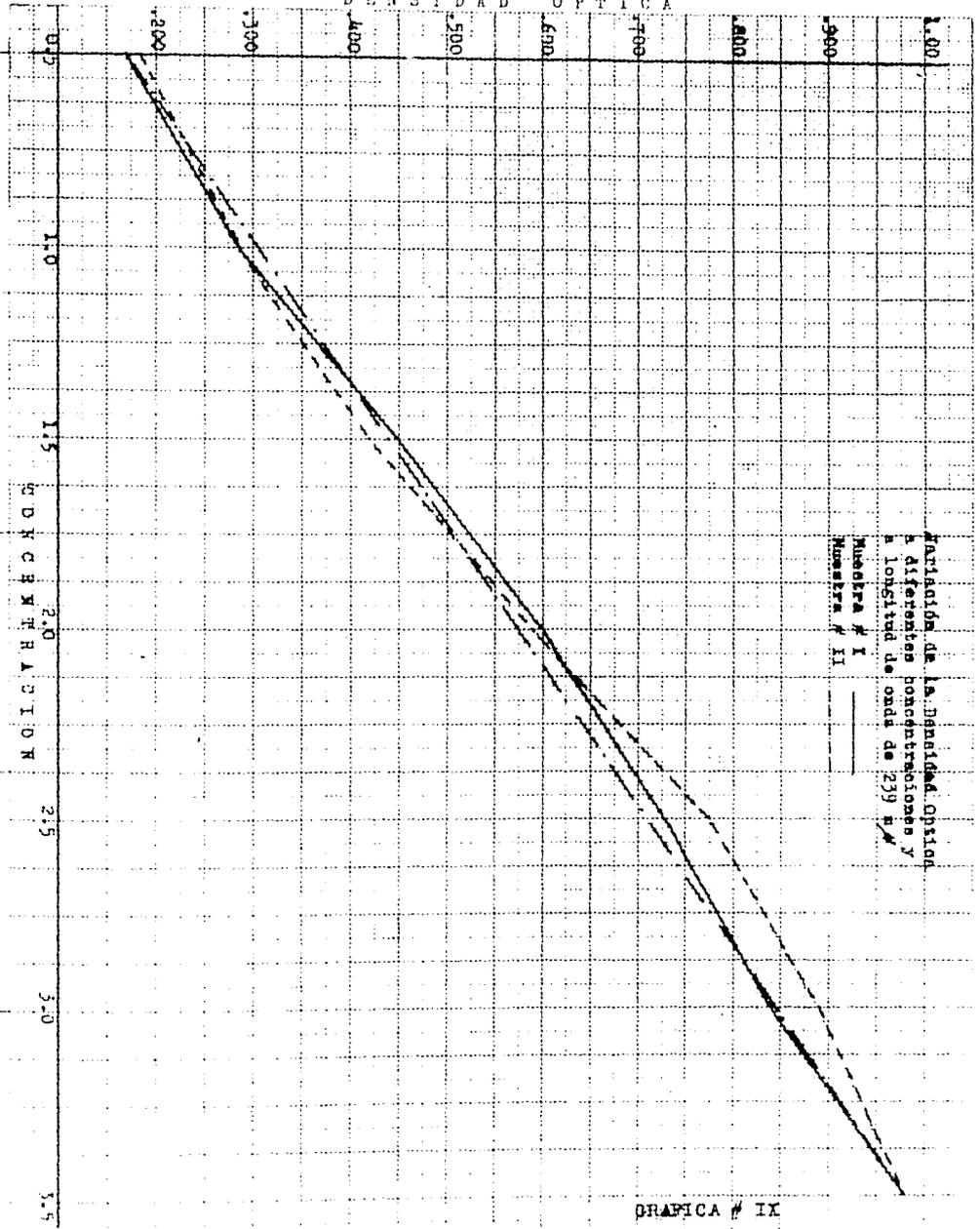
Las gráficas indican la variación de la densidad óptica a las diferentes concentraciones y a longitud de onda de 239 m μ .

La tercera gráfica representa claramente la diferencia entre un producto de buena calidad y uno de mala calidad, la densidad óptica para este último es muy baja a 2.5 mg por 100 ml.

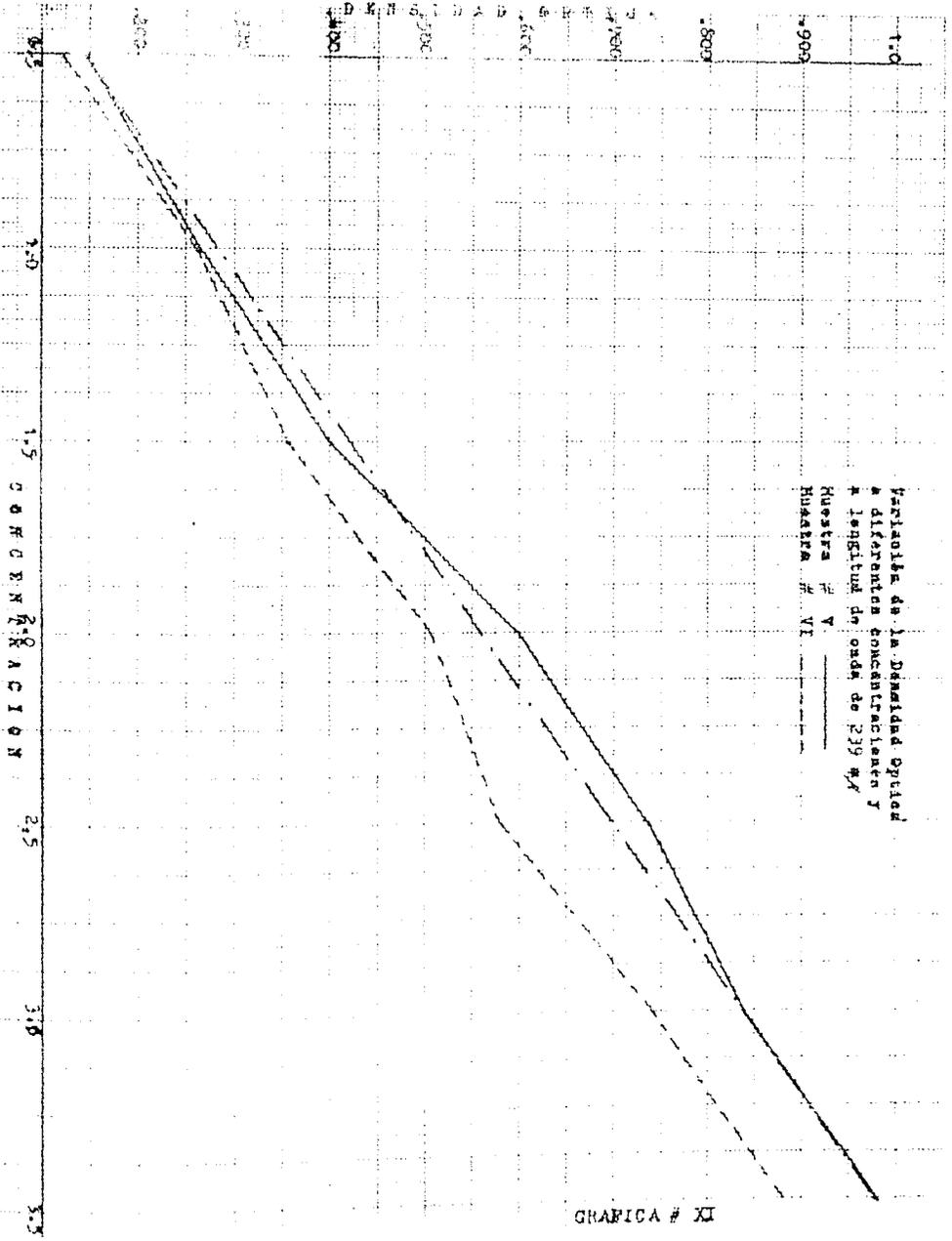
T A B L A # 5

Concen- tración	D E N S I D A D O P T I C A					
	Mues- tra I	Mues- tra II	Mues- tra III	Mues- tra IV	Mues- tra V	Mues- tra VI
0.5	.167	.185	.150	.145	.145	.120
1.0	.285	.285	.272	.265	.263	.260
1.5	.450	.420	.400	.398	.400	.355
2.0	.600	.590	.582	.573	.598	.505
2.5	.730	.725	.725	.720	.732	.578
3.0	.840	.840	.840	.842	.840	.740
3.5	.980	.980	.975	1.00	.980	.880

DENSIDAD OPTICA



GRAFICA # IX



GRAFICA # XI

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

El sistema de dobles ligaduras conjugadas que existe en la molécula de la 16 dehidropregnenolona, es una propiedad que se aprovecha para determinar su absorción en la banda ultravioleta.

Desde el punto de vista espectrofotométrico el metanol es el solvente más adecuado para determinar la absorción de la 16 dehidropregnenolona.

La longitud de onda a la cual la 16 dehidropregnenolona presenta su máxima absorción es a 239 m μ .

La concentración óptima es la de 2.5 mg por 100 ml de solución, porque a esta concentración la sensibilidad es suficiente para obtener datos seguros y uniformes y poder distinguir entre un producto de buena calidad y una de mala calidad.

Los límites de concentración son: 2.3, a 2.6 mg -- por 100 ml de solución.

Las formas generales de expresar el resultado en espectrofotometría son las siguientes:

TERMINOS				DEFINICIONES	
Sociedad Nacional de Física (1934)	Sec. (1934) Int. Conf. (1934)	Nac. Bun. Et. Int. (1934)	Un. S.I. C.G.S.	En palabras	En Símbolos
Intensidad de radiación Incidente.			I_0		
Intensidad de Radiación Transmitida (o reflectada)			I		
Transmisión o Transmiten- cia.	Trans- miten- cia	Trans- miten- cia	t	Relación en tre la radia- ción transmi- tida y la -- incidente	$t = I/I_0$
Densidad Op- tica δ (Ex- tinción)	Absor- bancia	Absor- bancia	d	Logaritmo co- mún de la re- cíproca de -- la transmi- sión.	$d = \log_{10}(I_0/I)$ δ $d = \log_{10}(I_0/I)$
Coefficiente de Extinción		Indice de Absor- ban- cia	K	Densidad Op- tica por uni- dad de longi- tud.	$K = d/l$ δ $I = I_0 10^{-Kl}$
Coefficiente de Extinción específico	Absor- tibili- dad	Indice de Absor- ban- cia	E	Densidad Op- tica por uni- dad de longi- tud y concen- tración.	$E = \frac{d}{c l}$
Coefficiente de Extinción molecular	Absor- tibili- dad mo- lar	Indice de Absor- ban- cia mo- lar	ϵ	Coefficiente de extinción específico - por concen- tración: lg. mol por l	$\epsilon = \frac{d}{c l}$
Coefficiente de Absorción			μ	Logaritmo na- tural de la recíproca de la transmi- sión.	$\mu = \log_e I_0/I$ δ $I = I_0 e^{-\mu l}$
Indice de Absorción			k	Coefficiente de Absorción multiplicado por longitud de onda y di- vidido entre 4.	$k = \frac{\mu \lambda}{4 \pi}$ δ $I = I_0 e^{-4\pi k l / \lambda}$

En el caso de la lámina fotográfica el resultado no se expresa como densidad óptica porque los resultados no son uniformes.

El coeficiente de extinción molecular no se usa porque el peso molecular de la sustancia problema es desconocido. Así, que lo más conveniente fue usar el coeficiente de extinción específico y dar el resultado en absorción unitaria, porque en esta forma, los resultados son uniformes.

En este caso la densidad óptica la da la lectura directamente ya que el aparato está calibrado en densidad óptica.

La concentración, en absorción unitaria es siempre 1% y la longitud 1 cm.

Resumiendo venimos a continuación la fórmula siguiente:

$$E_{1\%} = \frac{L}{C \cdot l}$$

donde:

$E_{1\%}$ = Absorción unitaria

L = Lectura expresada en densidad óptica

C = Concentración

l = Longitud

METODO ANALITICO ESTABLECIDO PARA DETERMINAR
LA ABSORCION DE LA 16 DEHIDROPREGNEOLONA.

De la muestra perfectamente molida se pesan en un vidrio de reloj de 46 a 52 mg en balanza analítica, se pasa a un matras de 100 ml aforado se disuelve con metanol Q. P. libre de acetona y se afora.

De esta solución se toman 5 ml. con pipeta y se - pasa a otro matraz de 100 ml aforado y se afora con me tanol; esta solución se usa para llenar la celda.

Al hacer la determinación siempre se pone una cel da con metanol Q. P. como testigo.

Ejemplo:

Para determinada muestra se obtuvo una lectura de densidad óptica de .730 a una concentración de 2.5 mg por 100 ml aplicando la fórmula:

$$E_{1\%} = \frac{L}{c \cdot l}$$

Tenemos

$$E_{1\%} = \frac{.730}{.0025} = 292$$

CAPITULO V

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

- 1.- Fieser, F. L. y Fieser, M. Natural Products Related to Phenantrene. 3a.Ed. Cap. VIII pág. 184-198, 390-396, 579-586. Reinhold Publishing Co.; Nueva York - (1949).
- 2.- Fieser, F. L. y Fieser, M. Steroids.Cap.XXI pág. -- 810-816. Reinhold Publishing Corporation; Nueva -- York (1959)
- 3.- Gilman, H. Organic Chemistry. 2a. Ed. Cap. XIX pág. 1454-1468. John Wiley and Sons, Inc. Nueva York --- (1943).
- 4.- Fieser, F. L. y Fieser, M. Organic Chemistry. 2a. - Ed. pág 978-1008. Reinhold Publishing Co. Nueva York (1950).
- 5.- Klyne, W. The Chemistry of the Steroids. Cap. I --- Methuen and Co. Ltd. Londres (1958).
John Wiley and Sons Inc. Nueva York (1958).
- 6.- Scientific American Vol. 192 No. 1 January, 1955 --- Steroids por Fieser, L.F. pág. 32, 53, 56 - 60.
- 7.- Scientific American Vol. 182, No. 3 March, 1950. -- Cortisona y ACTH por Gray, W. G. pág. 31-33.
- 8.- Evans, R.M. An introduction To Color. pág. 59, 72,- 73. John Wiley and Sons. Nueva York (1948).
- 9.- Kolthoff, I. M. y Sandell, E.B. Textbook of --- ---- Quantitative Inorganic Analysis. pág. 647 y 648. -- The Macmillan Company. Nueva York (1946).

- 10.- Mellon, M.G. Analytical Absorption Spectroscopy, pag. 83-90, 234-237. John Wiley and Sons, Inc. - Nueva York (1950).
- 11.- Lothian, G.F. Absorption Spectrophotometry, pág. 89-92, 209-210. The Macmillan Company. Nueva York (1958).
- 12.- Meites, L. y Thomas C. H. Advanced Analytical -- Chemistry, pág. 232-240. Mac. Graw-Hill Book --- Company, Inc. Nueva York, Toronto, Londres (1958)