

**DL- α -(N-pirrol) FENILACETAMIDOPENICILINA. I.-SINTESIS
Y PROPIEDADES CINETOQUIMICAS**

*Por M.^a T. Alemany
F. Salto*

INTRODUCCION

Las penicilinas semisintéticas resultan de la acilación del grupo amino del ácido 6-aminopenicilánico con diferentes radicales acilo. La búsqueda de nuevas penicilinas es un desafío constante a la imaginación de los químicos para idear nuevos ácidos que permitan conducir a penicilinas con mejores propiedades farmacológicas.

El objeto del presente trabajo es la síntesis y estudio de algunas propiedades cinetoquímicas de la DL- α -(N pirrol)-bencilpenicilina. Hemos elegido esta penicilina porque en la bibliografía no hemos encontrado ninguna penicilina derivada del ácido N-pirrolfenilacético, por la importancia farmacológica de los pirroles, así como por la influencia que sobre el espectro antimicrobiano tiene la introducción de un átomo de N en la cadena lateral de la bencilpenicilina.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos

En general, en las reacciones de síntesis hemos empleado sustancias «químicamente puras», mientras que en las reacciones analíticas, los productos utilizados han sido de la máxima pureza. Se han usado, siempre que ha sido posible, «sustancias para síntesis» o «reactivos puros para análisis», según los casos, de la casa Merk.

Aparatos

Además de los utensilios normales de laboratorio, hemos utilizado los siguientes aparatos: pH-metro «Beckman» GS. Termostato «Kottermann»,

An. Fac. Vet. León, 1979, 25, 19-30.

mod. AP 434/3043. Espectrofotómetro IR «Perkin-Elmer» mod. 157 G. Espectrofotómetro «Beckman» mod. DK 2. Aparato para la determinación de puntos de fusión «Buchi» Pat. n.º 320.388.

Técnicas analíticas

La pureza de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina, se ha determinado por los métodos hidroxámico y yodométrico^{2,6}.

Para la cromatografía en papel con revelado biológico, hemos seguido la técnica de KARNOVSKY y JOHNSON⁵.

Las determinaciones de agua se han realizado por el conocido método de Karl-Fischer.

Estudios cinéticos

Para los estudios cinéticos se sigue el procedimiento general que se describe a continuación: Se disuelven, a la temperatura de 37°C, 218 mg de DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina en 250 ml de la apropiada disolución reguladora. Esta contiene además, la cantidad suficiente de ClNa para que la disolución tenga una fuerza iónica total de 0,5 y está exenta de oxígeno. Se ponen partes alícuotas de 40 cc en ampollas de vidrio, se pasa una corriente de nitrógeno purísimo durante un minuto y a continuación se cierran dichas ampollas. Seguidamente se colocan en el baño, a la temperatura correspondiente.

A intervalos adecuados, se sacan las ampollas del baño y una vez abiertas, se neutraliza la disolución de pH 6,5. Se ajusta el volumen a 50 ml con agua destilada y se guarda a 3°C hasta su posterior análisis por el método iodométrico.

Clorhidrato del cloruro del ácido D (-) α -aminofenilacético

Se ha seguido la técnica de obtención descrita por HARDCASTLE⁴ que se basa en la reacción del clorhidrato de D (-) α -fenilglicina con el pentatetrauro de fósforo. Rendimiento 95 %. P. f. 180°C % cloro (Volhard) 34,1 %.

D (-) α -aminofenilacetato de etilo

Se hacen reaccionar 50 g de clorhidrato del cloruro de la D (-) α -fenilglicina, con 250 cc de etanol absoluto. Seguidamente se evapora el etanol hasta sequedad a presión reducida.

El producto obtenido se disuelve en 100 cc de agua y se neutraliza con NaOH, separándose un aceite que se extrae dos veces con éter etílico (50 cc cada vez). Las fases etéreas se secan con sulfato sódico anhídrico y finalmente se cristalizan mediante clorhídrico gaseoso. Peso obtenido 39 g. P. f. 196°C $[\alpha]^{20}_D = -86^\circ$.

α -(N-pirrol)-fenilacetato de etilo

Hemos empleado la reacción de CLAUSON-KAAS⁵ de aminas primarias con 2,5 dialcoxitetrahidrofurano.

133 cc de ácido acético glacial se mezclan con 52,8 g de D (-) α -fenilglicinato de etilo. Seguidamente se añaden con agitación, en aproximadamente 10-15 minutos, 39 g de 2,5 dietoxitetrahidrofurano. Se calienta a reflujo durante una hora. Transcurrido este tiempo se deja enfriar y se separa a presión reducida, la mayor parte del ácido acético. Finalmente se destila a vacío, recogiéndose una fracción a 160° (5-6 mmHg) correspondiente al α -(N-pirrol)-fenilacetato de etilo. Peso del líquido obtenido 46,5 g (70 %).

Ácido DL- α -(N-pirrol)-fenilacético

Mediante calentamiento, se disuelven 8,7 g de KOH en una mezcla de 65 cc de etilenglicol y 13 cc de agua. Con agitación, se añade sobre la disolución anterior 52,2 g de α -(N-pirrol)-fenilacetato de etilo, calentándose a reflujo (112-120°C) durante 5 horas.

Transcurrido este tiempo, se enfriá la mezcla de reacción y se vierte sobre una disolución formada por 100 cc de agua y 97 cc de etanol del 97 %. Se acidifica con ClH 12N hasta pH 2 aproximadamente. Despues de una hora de agitación, se filtra y seca. El producto seco pesó 36 g lo que representa un rendimiento del 80 %.

El producto obtenido se disuelve en 100 cc de cloroformo, se trata con carbón activo y se filtra. El filtrado se concentra a vacío hasta 1/3 del volumen inicial, añadiéndole seguidamente 70 cc de metilciclohexano. El producto obtenido una vez seco pesó 27 g (75 %). P. f. 126°C. Equivalente de neutralización 204. Composición centesimal 72,10 % C, 5,60 % H, 6,88 % N. (Teórico: 71,64 % C, 5,47 % H, 6,97 % N). No presenta actividad óptica.

DL- α -(N-pirrol)-fenilacetamido penicilina

Se disuelve en 400 cc de tetrahidrofurano, 23,9 g de ácido α -(N-pirrol)-fenilacético y 20,2 g de trietilamina. La mezcla de reacción se enfriá a -8°C. Seguidamente se añade lentamente una disolución formada por 100 cc de tetrahidrofurano y 12 g de cloruro de pivaloilo, cuidando que la temperatura de reacción se mantenga a -8°C. Acabada la adición se enfriá la mezcla de reacción a -12°C. Seguidamente se añade una disolución formada por 22,1 g de ácido 6-aminopenicilánico y 13,3 g de trietilamina en 220 cc de cloroformo, poniéndose especial cuidado en que la temperatura se mantenga a -12°C durante la adición. Terminada ésta, se mantiene la agitación y la temperatura -12°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se deja en nevera hasta el día siguiente.

Se concentra casi a sequedad a presión reducida y temperatura de 10-20°C. El residuo se trata con 200 cc de agua fría, ajustándose inmediatamente la disolución, que se mantiene entre 5-10°C, a pH 7. A la disolución se le añade 200 cc de metilisobutilcetona, se agita la mezcla y se ajusta con sulfúrico a pH 2. A la fase acuosa se le repite el tratamiento anterior con otros 100 cc de metilisobutilcetona. Se mezclan las fases orgánicas y se le añaden 6 g de carbón Darco G-60 y sulfato sódico anhídrico. Después de media hora de agitación a 0/5°C, se filtra. Al filtrado se le añade 18,2 g de 2-etilhexoato potásico disueltos en 80 cc de metilisobutilcetona. No se produce precipitado. Finalmente, se concentra casi a sequedad a presión reducida y el residuo se precipita con un exceso de éter etílico. El producto obtenido, una vez seco, pesó 37,2 g (85 %). P. f. 105°C con descomposición. $[\alpha]_D^{20} = 161,3^\circ$ (C = 0,5 H₂O). Pureza por el método iodométrico 92,6 %. Espectro IR (BrK) 5,65 μ (β -lactama) 5,95-6,25 μ (amida). La humedad del producto resultó ser 3,2 %. Cromatografía en papel tamponado pH 5,5, fase móvil, éter saturado con agua-sulfato amónico y revelado biológico: sólo se detecta un área de inhibición.

Determinación del pK₁ de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina

Se ha realizado por el método potenciométrico¹, neutralizando parcialmente las disoluciones de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina, de molaridad conocida, con varias disoluciones de ácido clorhídrico. En todos los casos se ha empleado agua exenta de CO₂, y corriente de nitrógeno durante la semineutralización. El valor obtenido ha sido: pK₁ = 2,77 ± 0,04 a 37°C e I = 0,5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina

Hemos creído interesante estudiar la influencia que tendría sobre la actividad biológica y/o sobre la estabilidad de la bencilpenicilina, la introducción en su molécula de un grupo pirrol en posición α respecto al enlace de amida, mediante la obtención de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina.

Para la síntesis del ácido α -(N-pirrol)-fenilacético, hemos partido de la D (-) α -fenilglicina, producto fácil de adquirir a precios razonables y con un excelente grado de pureza por ser materia prima para la síntesis de ampicilina.

El grupo α -amino de la fenilglicina debíamos transformarlo en α -(N-pirrol), para lo cual pensamos que podría ser útil la reacción de CLAUSON-KAAS y TYLE⁴, de obtención de pirroles n-sustituidos, mediante la reacción de aminas primarias con el 2,5 dialcoxitetrahidrofurano. Para poder aplicar la mencionada reacción a nuestro caso, transformamos la D (-) α -fenilglicina en su correspondiente ester etílico, a través de la obtención del clorhidrato del cloruro de D (-) α -fenilglicina, según se indica en la parte experimental.

El fenilglicinato de etilo lo hemos hecho reaccionar en medio acético glacial, con el 2,5 dietoxitetrahidrofurano, en las condiciones especificadas en la parte experimental, obteniéndose un rendimiento del 70 % en la obtención de DL- α -(N-pirrol)-fenilacetato de etilo.

Por hidrólisis del DL- α -(N-pirrol)-fenilacetato de etilo con hidróxido potásico-etilenglicol obtuvimos el ácido α -(N-pirrol)-fenilacético, que se recristalizó en cloroformo-metilciclohexano, llegándose a un producto blanco, cristalino, que no presenta actividad óptica.

Como ya se indicó anteriormente, la síntesis de penicilinas se logra mediante acilación del ácido 6-aminopenicilánico con los apropiados ácidos o derivados de ácidos.

En los últimos años, estas reacciones de acilación han sido profundamente estudiadas, habiéndose descrito numerosos métodos de acilación. Los más frecuentes consisten en transformar el ácido en su correspondiente cloruro de ácido y así lograr activar el grupo carboxilo que se une fácilmente al grupo amino del ácido 6-aminopenicilánico. En nuestro caso, desechamos este procedimiento debido a que, durante el proceso de obtención, según las técnicas clásicas de preparación del cloruro de ácido, se descomponía el DL- α -(N-pirrol)-fenilacético, por lo que pensamos que la técnica de acilación «vía anhídrido mixto» utilizada en la síntesis de péptidos, al realizarse a baja temperatura, nos permitiría conseguir la activación del grupo carboxilo sin que sufriera el resto de la molécula.

Para formar el anhídrido mixto con el ácido DL- α -(N-pirrol)-fenilacético, hemos elegido el cloruro de pivaloilo porque su átomo de carbono carbonilo está fuertemente influenciado por los efectos etéricos e inductivo positivos del resto de la molécula, que impiden el ataque nucleofílico del grupo amino del ácido 6-aminopenicilánico y orientan la acilación del ácido DL- α -(N-pirrol)-fenilacético que, por el efecto inductivo negativo debería conducir a buenos rendimientos en la acilación.

Siguiendo las directrices anteriores y tal como se describe en la parte experimental, se obtuvo la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina potásica con un rendimiento desde el ácido DL- α -(N-pirrol)-fenilacético del 85 %.

La DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina obtenida es un polvo blanco, soluble en agua, metanol, etanol, acetona y metilcelosolve, poco soluble en butanol, isopropanol y cloruro de metileno e insoluble en benceno y en éter etílico. La pureza de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina obtenida es del 95,3 % controlada por iodometría y del 96,7 % por el método hidroxámico. Por cromatografía descendente en papel y revelado biológico, sólo se detecta un halo de inhibición. El espectro IR confirma la estructura de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina.

La DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina posee actividad biológica, frente al estafilococo aureus muestra una actividad que representa el 71 % del de la D

(-) α -aminobencilpenicilina y el 108 % del de la DL- α -aminobencilpenicilina. Es de resaltar que la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina obtenida por nosotros es la mezcla de dos diastereoisómeros. Está realizándose el estudio del espectro antimicrobiano de la nueva penicilina, así mismo está proyectado el sintetizar cada uno de los diastereoisómeros por separado y estudiar los espectros antimicrobianos respectivos.

Propiedades cinetoquímicas de la DL-(N-pirrol)-bencilpenicilina

El conocimiento de la estabilidad de una droga es esencial para poder valorar adecuadamente sus posibles aplicaciones farmacológicas y este conocimiento es una consecuencia directa del estudio cinético, el cual debe concretarse en expresiones matemáticas que contengan las distintas variables consideradas.

Constantes de velocidad de degradación

A temperatura, fuerza iónica y pH constantes, la hidrólisis de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina, en el intervalo de pH estudiado, se ajusta a una cinética de primer orden. Para estabilizar el pH se han empleado disoluciones reguladoras de ClH y fosfatos. En cada una de las series realizadas, la constante de velocidad de degradación se calculó como el valor medio de las constantes de velocidad específicas obtenidas para cada tiempo, siguiendo el método de integración.

Los valores de las constantes de velocidad de degradación encontrados en el intervalo de pH 1,8 a 7,9 en disoluciones reguladoras de ClH/ClNa y de fosfatos a diferentes concentraciones de buffer a 37°C y fuerza iónica 0,5, están representados en las figs. 1 y 2.

De los resultados experimentales obtenidos anteriormente se deduce, por una parte, que el pH influye sobre la velocidad de degradación y por otra, que algunas de las disoluciones amortiguadoras empleadas, ejercen un efecto catalítico.

Con objeto de aislar el primero de estos efectos, cuando hay catálisis debido a las especies químicas de las disoluciones reguladoras, se extraña el valor de la constante de velocidad a concentración cero de disolución reguladora.

De esta forma, se han obtenido los valores de k' a cada pH, a 37°C y fuerza iónica 0,5, que están agrupados en la Tabla 1.

TABLA I

pH	2,6	3,1	4,1	5,0	6,0	7,8
$k' \cdot 10^2$	4,3	~ 1,2	0,36	0,16	0,17	1,1

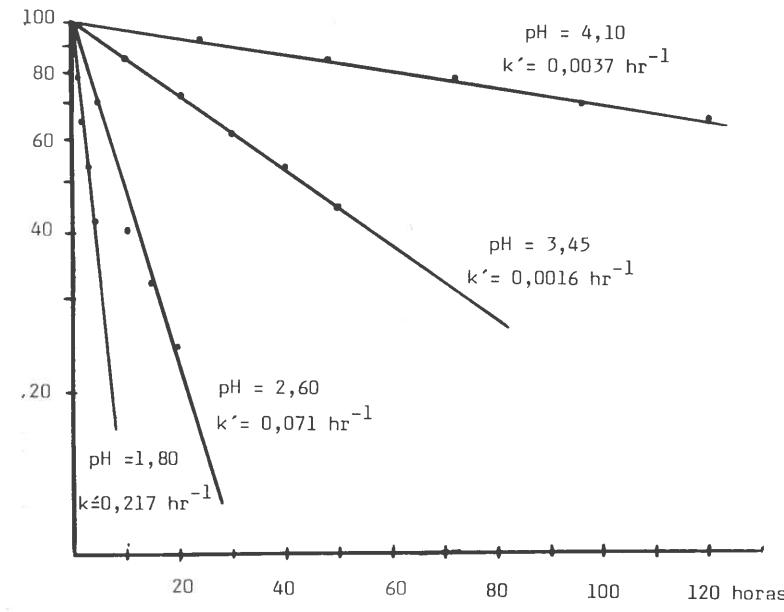


FIGURA 1

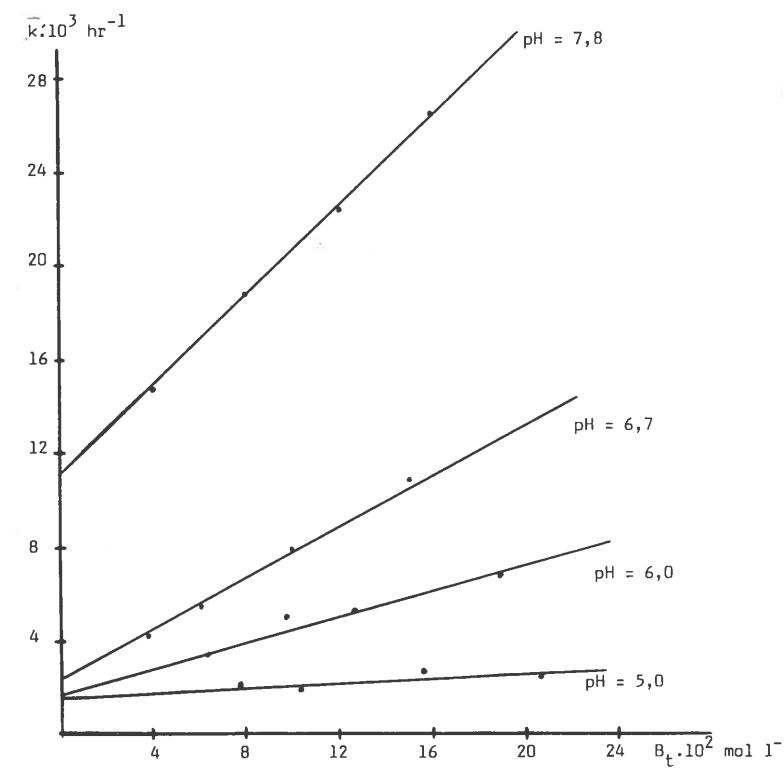
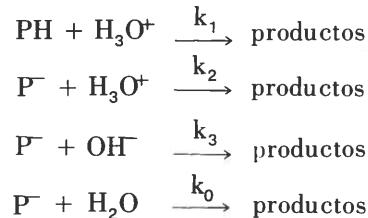


FIGURA 2

Cinética de la hidrólisis de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina en disolución acuosa

Como se deduce de los datos obtenidos anteriormente la degradación hidrolítica de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina en disolución acuosa, está catalizada por los iones H_3O^+ y OH^- . Para poder precisar su estudio comenzemos teniendo en cuenta que dicha sustancia puede presentarse en dos formas, una aniónica (P^-) y otra neutra (PH), cuyas proporciones varían dependiendo del pH. El conocimiento de la constante de disociación, determinada en la parte experimental, permite hallar las fracciones presentes en las distintas formas para cada pH.

La velocidad total de la reacción de hidrólisis vendrá dada por la suma de las velocidades de cada uno de los procesos que tengan lugar en las condiciones que se consideren. La forma indisociada de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina sólo existirá a pH bajos, donde, en principio, podemos considerar, de acuerdo con los resultados obtenidos, que el ataque del agua a dicha forma es despreciable frente al de los iones hidrógeno. Por tanto, solamente debemos considerar los siguientes procesos:



Para pH inferiores a 4, la velocidad de hidrólisis será la suma de las velocidades de ataque de los H_3O^+ a la penicilina en sus formas disociadas e indisociadas, y así podremos escribir:

$$\begin{aligned} -\frac{d[\text{P}_t]}{dt} &= \frac{d\{[\text{PH}] + [\text{P}^-]\}}{dt} = -k_1[\text{H}^+][\text{PH}] - k_2[\text{H}^+][\text{P}^-] = \\ &= -k_{\text{H}^+}[\text{H}^+]\{[\text{PH}] + [\text{P}^-]\} \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta la ecuación correspondiente al equilibrio de disociación de la penicilina, fácilmente se llega a:

$$k_{\text{H}^+} = k_1 \frac{[\text{H}^+]}{K_{a_1} + [\text{H}^+]} + k_2 \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]}$$

En la zona alcalina el único proceso que tiene importancia es el ataque de iones hidróxilos a la forma aniónica, por lo que podemos escribir:

$$\frac{d[\text{P}_t]}{dt} = -k_3[\text{OH}^-][\text{P}^-] = -k_{\text{OH}^-}[\text{OH}^-][\text{P}_t]$$

Teniendo en cuenta ahora todos los procesos, para cualquier zona de pH, resultará que la constante aparente de velocidad vendrá dada por la expresión:

$$k' = k_{\text{H}_2\text{O}} + k_1[\text{H}^+]X_{\text{PH}} + k_2[\text{H}^+]X_{\text{P}^-} + k_{\text{OH}^-}[\text{OH}^-][\text{P}^-]$$

ecuación general que nos permite calcular la constante aparente (k') de velocidad para cualquier valor del pH conociendo $k_{\text{H}_2\text{O}}$, k_1 , k_2 y k_3 .

Determinación de las constantes k_1 , k_2 y k_3

En medio ácido, según se ha dicho, la ecuación cinética viene dada por la expresión

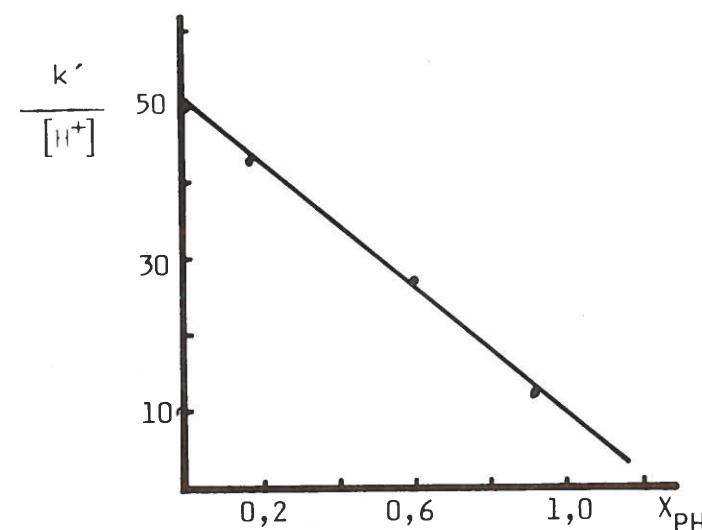
$$k'[\text{P}_t] = k_1[\text{H}^+][\text{PH}] + k_2[\text{H}^+][\text{P}^-]$$

Dividiendo ambos miembros por $[\text{P}_t]$ y reagrupando términos se obtiene

$$\frac{k'}{[\text{H}^+]} = (k_1 - k_2)X_{\text{PH}} + k_2$$

La recta obtenida al representar $k'/[\text{H}^+]$ en función de X_{PH} tiene una pendiente igual a $(k_1 - k_2)$ y una ordenada en el origen igual a k_2 (Fig. 3).

FIGURA 3



En medio alcalino tenemos que $k' [P_t] = k_3 [OH^-] [P^-]$ y por tanto

$$k_3 = \frac{k'}{[OH^-]}$$

Los resultados así obtenidos son:

$$k_1 = 10 \text{ hr}^{-1} \text{mol}^{-1}$$

$$k_2 = 52 \text{ hr}^{-1} \text{mol}^{-1}$$

$$k_3 = 4.200 \text{ hr}^{-1} \text{mol}^{-1}.$$

De donde se deduce que el ataque de los iones hidronio al anión de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina es alrededor de 5 veces mayor que el ataque al ácido indisociado, tal como era de esperar debido a las cargas de distinto signo del anión y del H_3O^+ . Igualmente es de resaltar que la catalisis por iones hidróxilos es considerablemente más intensa que la debida a los iones hidronios y en consecuencia, la velocidad de hidrólisis en medio alcalino será mucho mayor que en medio ácido.

pH de máxima estabilidad

Si tenemos en cuenta que a partir de pH superiores a 4 no existe prácticamente penicilina en forma ácido indisociado podemos suponer que

$$k' = k_2 [H^+] + k_3 [OH^-] = k_2 [H^+] + k_3 \frac{K_w}{[H^+]}$$

Si diferenciamos k' con respecto a H^+ e igualamos a cero, obtenemos la expresión

$$\frac{d k'}{d [H^+]} = k_2 - \frac{K_w k_3}{[H^+]^2} = 0$$

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_w \cdot k_3}{k_2}}$$

que nos permite calcular el pH de máxima estabilidad, sustituyendo los valores de k_2 y k_3 hallados anteriormente y el valor del producto iónico del agua K_w , resultando ser 5,52, en buena concordancia con el valor experimental.

Los resultados obtenidos permiten clasificar la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina entre las penicilinas estables en medio ácido, con una estabilidad comparable a la de la fenoximetilpenicilina, algo menor que la D (-)

α -aminobencilpenicilina y considerablemente mayor que la de la bencilpenicilina⁷.

Es un hecho conocido que el mecanismo de descomposición de una penicilina en medio ácido y neutro, interviene el grupo carbonilo unido a la cadena lateral y por tanto, ésta influye sobre la estabilidad de la penicilina. Luego, el comportamiento de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina, en comparación con otras penicilinas, tiene que justificarse por la introducción del grupo N-pirrol en la cadena lateral. Efectivamente, la presencia del grupo pirrol hace que los electrones sean atraídos hacia la propia cadena lateral, inhibiéndose parcialmente los desplazamientos electrónicos implicados en el reagrupamiento intramolecular subsiguiente o simultáneo al ataque electrofílico de la penicilina por los iones hidronio y haciendo así a la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina, relativamente estable a los ácidos.

RESUMEN

Se describe la síntesis de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina por acilación del ácido 6-aminopenicilánico con el anhídrido mixto formado al reaccionar el ácido DL- α -(N-pirrol)-fenilacetíco con el cloruro de pivaloilo.

Se ha estudiado también la cinética de degradación de la DL- α -(N-pirrol)-bencilpenicilina en disolución acuosa a 37°C y fuerza iónica constante 0,5, en el intervalo de pH 1,80/7,80. El pH de máxima estabilidad es de 5,5. Los resultados obtenidos permiten clasificar a la DL- α -(N-pirrol)-fenilacetamidoopenicilina entre las penicilinas estables a los ácidos, con una estabilidad comparable a la de la fenoximetilpenicilina y algo menor que la de la D (-) α -aminobencilpenicilina.

DL- α -(N-pyrrol) PHENYLACETAMIDE-PENICILLIN. I.-SYNTHESIS AND KINETOCHEMICAL PROPERTIES

SUMMARY

The synthesis of DL- α -(N-pyrrol)-phenylacetamide-penicillin by 6-aminopenicillanic acid acylation using the mixed anhydride formed by the reaction of DL- α -(N-pyrrol)-phenylacetic acid with pivaloid chloride.

The kinetics of DL- α -(N-pyrrol)-phenylacetamide-penicillin degradation in aqueous solution at 37°C and 0,5 constant ionic strength, in the pH range 1,80-7,80. The maximum stability is attained at pH 5,5. The results obtained permit the classification of DL- α -(N-pyrrol)-phenylacetamide-penicillin among the acid stable penicillins, its stability being comparable to that of phenoxymethyl-penicillin, and somewhat lower than that of D (-) α -aminobenzylpenicillin.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALBERT, A. and SERJEANT, E. P. (1971).-The Determination of ionization constants. Chapman and Hall Ltd. London. Cap. 2.^o.
- 2) FORD, J. H. (1947).-Hidroxylamine method of determining Penicillins. *Anal. Chem.*, **19**: 1.004-1.006.
- 3) HARDCastle, C. A., JOHNSON, D. A., PANETTA, C. A., SCOTT, A. I. and SUTHERLAND, S. A. (1966).-The Preparation and Structure of Hetacillin. *J. Org. Chem.*, **31**: 897-899.
- 4) JOSEY, A. D. (1967).-1-(2-Methoxycarbonylphenyl) pyrrole. *Org. Synt.*, **47**: 81-86.
- 5) KARNOVSKY, M. L. and JOHNSON (1949).-Filter paper chromatography of penicillin broths. *Anal. Chem.*, **21/9**: 1.125-1.132.
- 6) OERTENBLADT, B. (1950).-On iodometric and polarimetric determination of penicillin. *Acta. Chem. Scand.*, **4**: 518-538.
- 7) SALTO, F. (1970).-Cinética de la descomposición de la D (-) aminobencilpenicilina. *Rev. Fac. de Ciencias. Oviedo*, **XI/2**: 119-241.