

## Tesis de Posgrado

# Vitamina C en glándulas de secreción interna

Mendive, Jorge R.

1935

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Mendive, Jorge R.. (1935). Vitamina C en glándulas de secreción interna. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0199\\_Mendive.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0199_Mendive.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Mendive, Jorge R.. "Vitamina C en glándulas de secreción interna". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1935.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0199\\_Mendive.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0199_Mendive.pdf)

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

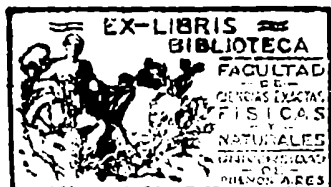
---

VITAMINA C EN GLANDULAS

DE SECRECIÓN INTERNA

T e s i s

por



JORGE R. MENDIVE

*Tesis* 199

PADRINO DE TESIS -

Dr. VERANCIO DEULOCHEN.

Page 02

*[Handwritten signature]*  
*[Handwritten signature]*

La comisión examinadora de tesis del Instituto de Química. Lo considerada la tesis presentada por ex-alumno Jorge R. Meadori y lo resuelto epistolarmente.

Rosalio A. Gulló  
Instituto de Química

*[Handwritten signature]* - I -

LAS VITAMINAS



El hecho de que una dieta a base de proteínas, hidratos de carbono, grasas y sustancias minerales, completa desde el punto de vista energético y material, fuera deficiente para el mantenimiento del estado normal o para el crecimiento de los organismos, ha llevado al conocimiento de las vitaminas.

Estas sustancias están caracterizadas por la desproporción que existe entre la gravedad de los trastornos que produce su ausencia y las pequeñas cantidades requeridas normalmente para evitar esos trastornos.

Su naturaleza ha permanecido desconocida durante largo tiempo, pero el conocimiento de ella ha avanzado mucho en los últimos años y hoy se conoce la fórmula de varias, habiéndose, incluso, realizado la síntesis total de dos de ellas.

El escorbuto, enfermedad conocida desde hace varios siglos entre la gente de mar, había sido atribuida a varios factores, como ser climas fríos, el consumo de carne salada, el agua de mar, etc.

Sin embargo se sabía que aparecía después de la privación, durante largos períodos, de alimentos frescos. Ya Bachstrom en 1734 llama la atención sobre este punto y dice que la verdadera causa es la abstinencia de "vegetales frescos" y que cualquier persona que por necesidad o negligencia se someta durante un período considerable a un régimen en el que se exclu-

yen las frutas y vegetales frescos, enferma de escorbuto cualquiera sea el clima o suelo en que se encuentra, y, que una vez aparecida la enfermedad ésta se cura rápidamente aún en pocos días, si se proporciona al enfermo "vegetales frescos".

Experiencias sobre material humano fueron hechas por Lind en 1747, a bordo de un barco en el que hubo doce enfermos de escorbuto.

Les dió distintas dietas sobre la base de caldo de carne, bizcochos y budín, a unos les agregaba vinagre, a otros "elixir vitriol" a otros agua de mar y dos de ellos tomaban dos naranjas y un limón.

Estos últimos fueron los únicos que sanaron en el espacio de una semana.

Lunin y Socin (1881-1891) hicieron observaciones aisladas sobre lauchas a las que daban dietas sintéticas que eran inadecuadas para mantener la vida y llegaron a la conclusión que en los alimentos deben existir otras sustancias desconocidas que no sean proteínas, grasas o hidratos de carbono. Estos trabajos permanecieron olvidados y los autores, por otra parte no prosiguieron sus investigaciones. Sin embargo a pesar que en el siglo XVIII se hablaba del escorbuto como de una enfermedad de carencia, aunque sin conocer sus causas reales, es necesario llegar hasta Eijkman en 1897 para encontrar la aplicación primera del método experimental moderno al estudio de una enfermedad que luego resultó ser del tipo de lo que hoy llamamos avitaminosis. Eijkman que era médico de las cárceles de Java

descubre que el beri-beri enfermedad que padecían los prisioneros era análoga a otra que presentaban las aves y que llamó - "polineuritis gallinarum". Comprobó que tanto en uno como en otro caso provenía del consumo continuado de arroz decortinado y que era factible curarla si se suministraba a los enfermos arroz entero, y más importante aún; la enfermedad podía reproducirse a voluntad en los animales con solo darles como alimentación arroz decortinado y luego curarla al administrar la cagarrilla del arroz.

Sin embargo Sijkman no supo dar una interpretación correcta a estos hechos, pues supuso que los alimentos, tales como el arroz, muy ricos en almidón, producen en el intestino una sustancia que actúa luego sobre las células nerviosas y que en la corteza del arroz debía existir otra sustancia capaz de neutralizar sus efectos.

C. Funk (1911) preparó luego un extracto con el decortinado del arroz, en el cual el agente activo está mucho más concentrado que en el material original y obtuvo una fracción cristalina, capaz de curar la polineuritis en palomas en dosis de veinte <sup>mili</sup>gramos diarios.

A esta sustancia que contenía nitrógeno, al parecer bajo la forma de amina y que tanta importancia tenía para la vida, Funk (1912) la llamó vitamina, nombre que más tarde se extendió a todas las que tienen función análoga en la nutrición.

Con los clásicos trabajos de Hopkins comienzan una serie de investigaciones sobre nutrición que sirven de base al

estudio de las vitaminas. Este autor escribió en 1906 "que ningún animal puede vivir con una mezcla de proteínas, grasas e hidratos de carbono purificados a los que se agrega la cantidad necesaria de materia mineral" y cree que para una evolución fisiológica adecuada son necesarias otras sustancias, además de los constituyentes de la dieta basal, tales como la lecitina (que ya se sabía que poseía una influencia marcada sobre la nutrición), y otros factores dietéticos insospechados.

Experiencias sistemáticas efectuadas por Holst y Frölich (1907-1912) demuestran que el escorbuto puede ser producido en cobayos a los que se da una alimentación adecuada, constituida por maíz, cebada, arroz y pan de centeno. Esta dieta produce un severo escorbuto que lleva a la muerte de veinte a cuarenta días. Estudian luego la acción de vegetales frescos, frutas, jugos de fruta y encontraron que adicionados a la dieta basal anterior eran capaces de prevenir el escorbuto en cobayos.

Cuando estos materiales escorbúticos se calentaban, disminuía gran parte de su eficacia y lo hacían en cantidad proporcional al tiempo de calentamiento y a la temperatura. Los jugos de vegetales frescos al ser almacenados perdían gran parte de su propiedad antiescorbútica, menos los jugos ácidos, como el de limón, que eran mas estables a este respecto.

Según de los resultados obtenidos por Sijkman (1897) Holst y Frölich (1907-1912) y Hopkins (1906) éste último en Inglaterra, Mc Collum y Davis y Osborne y Mendel en Estados Uni-

dos, prosiguieron sus investigaciones sobre nutrición, que se extendieron un buen número de años, logrando demostrar con certeza la existencia de dos sustancias a las que dieron los nombres de factores "liposoluble A" e "hidrosoluble B". Una dieta desprovista de el primero de estos factores determinaba en los animales sometidos a ella una detención del crecimiento, pérdida de peso y aparición de xeroftalmia, mientras que si la dieta no tenía el factor B los animales enfermaban de beri-beri.

Hace veinte años eran tres las vitaminas reconocibles por medios biológicos: la A, la B, y la C (antiescorbútica).- Durante estos últimos años se ha visto que las vitaminas son mas numerosas de lo que se había supuesto. En 1918 Mellanby descubre la existencia de la vitamina anti-raquítica D. Otros trabajos realizados sobre la vitamina B han demostrado que en realidad se trata de un complejo de vitaminas entre las cuales se caracterizan principalmente la B<sub>1</sub> (anti-beribérica de Nijkman) la B<sub>2</sub> (anti-pelágrica) y otros factores indispensables en las dietas de determinados animales.

Mas recientemente, Evans y Bishop (1922-1923) constatan la existencia de la vitamina que es necesaria para asegurar la reproducción de las ratas.-



QUIMICA DE LA VITAMINA C.

El estudio desde el punto de vista químico, de la vitamina anti-escorbútica comienza en los trabajos de Silva y colaboradores, de Bezssonoff y de Grettie y King.

Silva prepara extractos de jugo de limón decitrata- dos, ricos en vitamina. Estos extractos contenían nitrógeno y poseían propiedades fuertemente reductoras. Bezssonoff (1921) preparó un reactivo molibdo-fosfo-tungstico que daba coloración azul con los extractos de vitamina y demostró que la intensidad de coloración era paralela con la actividad antiescorbútica. Como este reactivo es una modificación del de Folin para determinar fenoles, se creyó que la vitamina debía tener función fenólica.

Esta circunstancia fué una de las causales del error de D. y A. Kygh y Laland (1932) quienes aislaron de jugo de limón un alcaloide, la narcotina, y creyendo encontrar protección antiescorbútica en un derivado de ella, la metil-nor-narcotina. Pero estas observaciones no pudieron ser repetidas por otros autores. Entre ellos: Waugh y King (1932); Grant, Smith y Silva (1932); Harris y Ray (1932). El aislamiento de la vitamina C al estado puro, que permitió mas tarde estudiar su constitución química y finalmente realizar su síntesis, se produjo por un camino indirecto.

Szent Györgyi en 1920, estudiando problemas de respi

ración en tejidos y buscando sistemas de oxidación-reducción, a isla de la corteza de cápsulas supra-renales, de jugo de naranja y de repollo una sustancia cristalina a la que asignó la fórmula  $C_6H_8O_6$ . Esta sustancia poseía carácter ácido, tenía propiedades fuertemente reductoras por ejemplo reducía en frío las sales de plata, el licor de Fehling; reaccionaba con iodo y agua oxigenada, oxidándose; daba coloración azul con el reactivo Bezssonoff y decoloraba el indofenol. Por su carácter ácido y su relación con las exosas la llamó ácido hexurónico.

zent Györgyi llama la atención sobre la similitud de las propiedades de la sustancia por él obtenida y las que presentaban los extractos de vitamina C. Sin embargo ella permaneció olvidada hasta que en 1932 M. Györgyi y Svirbely pudieron ensayar el poder antiescorbútico de la misma y encontraron que en dosis de 1 mg diario evitaba la aparición de síntomas escorbúticos en animales sometidos a dietas adecuadas.

Casi al mismo tiempo Waugh y King (1932) aislaron de jugo de limón una sustancia cuyas propiedades coinciden con las del ácido hexurónico de M. Györgyi y llegaron a la conclusión que ambas eran idénticas, hecho interesante dado el alto poder antiescorbútico que tienen los limones.

Llamó la atención la alta dosis necesaria, de 1 mg diario muy superior a las determinadas para otras vitaminas, pero el hecho que por repetidas cristalizaciones no se altere su actividad como también la circunstancia que transformándolo en un derivado y regenerándolo nuevamente esa actividad perma-

nece constante hizo que los especialistas aceptaran la identidad de la vitamina C y el ácido hexurónico, que por su propiedad antiescorbútica ha sido rebautizado con el nombre de ácido ascórbico (szent Györgyi-Haworth 1933). Esa identidad es hoy universalmente aceptada.

### Constitución del ácido ascórbico

La demostración de la identidad del ácido ascórbico con la vitamina C, hizo que numerosos investigadores trataran de determinar su estructura química. Esto fué realizado gracias a los trabajos de Haworth y Hirst; Micheel y Kraft; Karrer y colaboradores; Reichstein; Euler y Martius; muchos de los cuales fueron realizados simultáneamente. (La extensa bibliografía puede consultarse en los Annual Review of Biochemistry, o en los Annual Reports of the Chemical Society, 1932 y siguientes).

Para evitar una larga enumeración de los mismos, mencionaremos tan solo en forma extensa los realizados bajo la dirección de Haworth y Hirst, que permitieron asignar prontamente una estructura química a la vitamina C y luego realizar su síntesis.

Hirst, Herbert, Percival Reynolds y Smith (1933) confirmaron las primeras observaciones de S. Györgyi, quien asignó al ácido ascórbico la fórmula  $C_6H_8O_6$  (P.R. 176). Se comporta, por titulación, como un ácido orgánico débil que da sales del tipo  $C_6H_7O_6Zn$ .

En solución acuosa no presenta muta-rotación, teniendo  $[\alpha]_{D+20}^{25} + 24^{\circ}$  el que no es afectado apreciablemente por acidificación del medio. En cambio la sal desplaza grandemente este valor (mas de 100%), desplazamiento que varía con la alcalinidad y que alcanza a  $+ 160^{\circ}$  en álcali 2N. Estas variaciones no implican descomposición puesto que por acidificación se vuelve a alcanzar el valor  $[\alpha]_{D+20}^{25} + 24^{\circ}$

El ácido ascórbico es un reductor energético. En solución neutra o ácida es atacado por el yodo, ozono, permanganato de potasio, nitrato de plata y acetato de cobre. Reduce energicamente en frío el licor de Fehling y en medio alcalino es atacado por el oxígeno gaseoso. En atmósfera inerte, su solución alcalina es relativamente estable. Las soluciones ácidas son mucho menos sensibles al oxígeno.

Las propiedades reductoras son, en general, menos acentuadas en soluciones no acuosas, así, en solución alcohólica no es atacado por el yodo.

Con la fenilhidrazina reacciona con facilidad para dar un derivado cristalino de  $m.p. 216^{\circ}$ . Estas propiedades, unidas al espectro de absorción en el ultravioleta, semejantes al dado por muchas cetonas lábiles, y a las reacciones con el cloruro férrico y con el nitroprusiato de sodio, ponen en evidencia la presencia de un carbonilo libre capaz de enlazar-se. La existencia de un grupo aldehído libre es improbable puesto que no colorea el reactivo de Schiff.

El hecho que calentado a ebullición con ácido clorhídrico

drico produzca cuantitativamente, furfuraldehido, nos dice que cinco de los seis carbonos deben estar formando una cadena no ramificada.

Al oxidar con yodo una solución ácida de ácido ascórbico, se utilizan dos átomos de yodo, produciéndose dos moléculas de ácido iodhídrico. La reacción consiste en la adición de dos grupos hidroxilos a una doble ligadura.

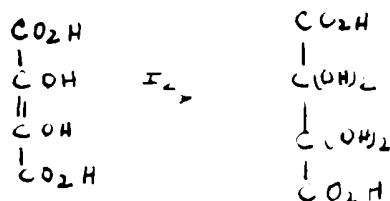
La intervención del agua es esencial, puesto que en solución alcohólica no se efectúa la reacción. El producto formado no desplaza la absorción selectiva y no produce furfuraldehido al ser hervido con ácido clorhídrico.

Es de carácter neutro y con el agua y álcalis se comporta como la lactona de un oxi-ácido monobásico. Durante la oxidación no se produce ruptura de la molécula, como lo demuestra el hecho que al tratar el producto resultante con agentes reductores se transforma cuantitativamente en ácido ascórbico.

Esto indica claramente que en el ácido ascórbico no existe un grupo carboxilo libre y las propiedades ácidas se deben a la presencia de un grupo  $=\text{CH}.\text{OH}$  situado próximo a un grupo  $=\text{C}=\text{O}$ .

El grupo reactivo será pues del tipo  $-\text{C}(\text{H})=\text{C}(\text{OH})-$  el que por oxidación en medio acuoso da  $-(\text{H})_2-\text{C}(\text{OH})_2-$ .

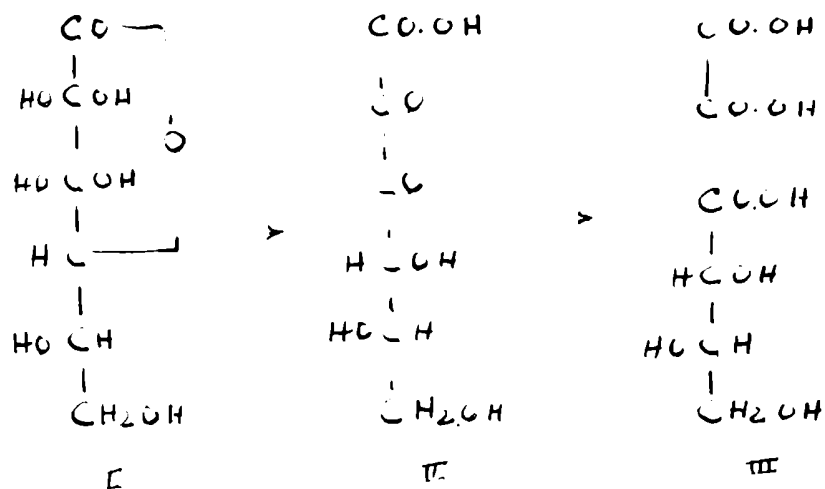
Un sistema semejante lo presenta el ácido dihidroximaleico que reacciona con yodo acuoso para dar el ácido dihidroxitartárico:



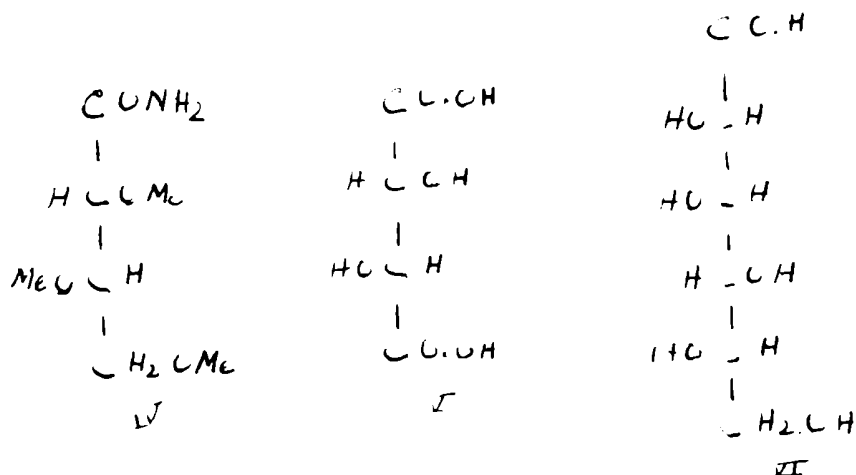
El producto puede ser reducido cuantitativamente con ácido iodhídrico.

Este tipo de ligaduras fué sugerido por Ullrich y Martius en base a la analogía del ácido ascórbico con la gluco-reductona  $\text{CO}_2\text{H}-\text{C}(\text{OH})=\text{CHOH}$  la cual en medio ácido reacciona con yodo, es de carácter ácido sin tener un carboxilo libre y además muestra una intensa banda de absorción en el ultravioleta.

El primer producto de oxidación del ácido ascórbico aún posee poder reductor, especialmente en soluciones alcalinas y por tratamiento con hipiodito de sodio reacciona con un átomo de oxígeno y da cuantitativamente ácido oxálico y trihidroxi-butírico III.

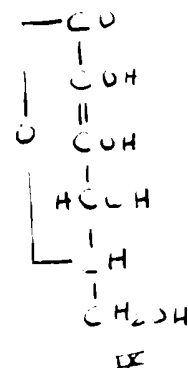
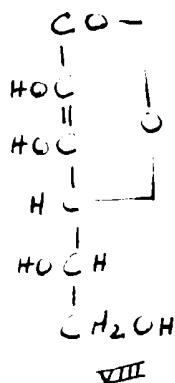
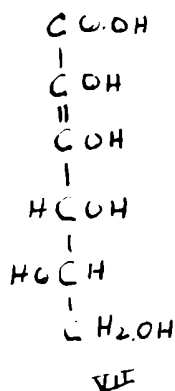


Este último fué reconocido bajo la forma de la amida cristalina de su trimetil derivado IV la cual fué identificada con la amida del ácido trimetil 1-treónico.



La identidad del ácido trinitrobutírico con el ácido 1-treónico fué establecida al convertirlo, por oxidación con ácido nítrico, en ácido  $\alpha$ -tartárico (V). El ácido 1-treónico se obtuvo también al oxidar el ácido - ascórbico con permanganato de potasio. Estas reacciones pueden explicarse admitiendo que el primer producto de la oxidación del ácido ascórbico tiene la estructura (I) y puede reaccionar bajo la forma (II) (ácido 2:3 diceto 1-gulónico ó 2:3 diceto 1-galactónico) y que por lo tanto el ácido ascórbico es un derivado de este azúcar. El primer producto de oxidación sería pues una lactona (I) con los grupos carbonilos probablemente hidratados.

El ácido ascórbico es pues la forma reducida de esta lactona y teniendo en cuenta su carácter enólico, que aparece caracterizado por sus propiedades ácidas, aunque no posea un carboxilo libre, lo podemos representar como la lactona del ácido VII (3 ceto 1-gulono lactona ó 3 ceto 1-galactono lactona).-



De las diversas formas posibles de lactonización la VIII (furanosa) y la IX (piranosas) representan los dos tipos mas probables. La naturaleza del anillo fué determinada mediante el estudio de los derivados metilados del ácido. Los resultados obtenidos indicaban una estructura furanósica para el ácido ascórbico lo cual está además de acuerdo con la tendencia que tiene en los ácidos derivados de los monosacáridos de formar principalmente lactonas en posición 1:4.

Constitución de la  
osazona del ácido ascórbico. (Vi lamosazona)

Ya se ha mencionado que el ácido ascórbico reacciona con la fenilhidrazina dando una osazona bien cristalizada, en forma de agujas de color rojizo, que tiene un punto de fusión de 216° y que por tratamiento con álcali se transforma en un producto amarillo cristalino de punto de fusión 210°-211°.

Estos productos fueron obtenidos por diversos investigadores que se ocuparon de la constitución del ácido ascórbico (Hirst, Ohle, etc.).-



Esta osazona cuya constitución vamos a considerar, resultó idéntica a una obtenida por Kotake y Nishigaki (1933), quienes, independientemente de S. Györgyi, estaban estudiando una sustancia muy reductora que se encontraba en el humor vítreo del ojo y que daba con la fenilhidrazina una osazona que se encontró idéntica a la que da el ácido ascórbico.

El hallazgo de la vitamina C y la similitud de las propiedades de su osazona con la hallada por los investigadores japoneses, quienes la llamaron vitamosazona, indujo a estos a estudiar si la sustancia que la producía se encontraba también en otros órganos y pudieron obtenerla de testículos, pulmones, bazo, cerebro, hígado líquido cerebro-espinal y también de una especie particular de naranja japonesa. En su primera publicación ya sugerían que la vitamosazona era idéntica a la osazona del ácido ascórbico lo que fué confirmado posteriormente.

Estos autores obtenían, al hacer reaccionar los extractos de órganos con clorhidrato de fenilhidrazina y acetato de sodio un líquido rojizo que por enfriamiento cristalizaba.

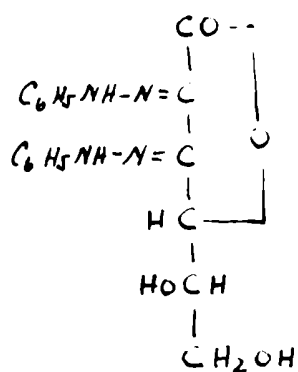
Estos cristales los disolvían en carbonato de sodio al 20 % y por tratamiento de esta solución con ácido acético obtenían un producto amarillo de punto de fusión 205°-206°.

La estructura de las sustancias que resultan de la condensación de la fenilhidrazina con el ácido ascórbico ha sido estudiada y aclarada por Tatematzu, Nogi y Yoneda (1934) y por Ohle (1934).

Estos autores han demostrado que el primer producto de condensación de la fenilhidrazina con el ácido escórbico de punto de fusión  $216^{\circ}$  (Hiret) (los puntos de fusión varían entre  $204^{\circ}$  y  $216^{\circ}$  en la literatura), que se presenta bajo la forma de cristales rojos, tiene la estructura de una verdadera osazona, siendo su fórmula la I.

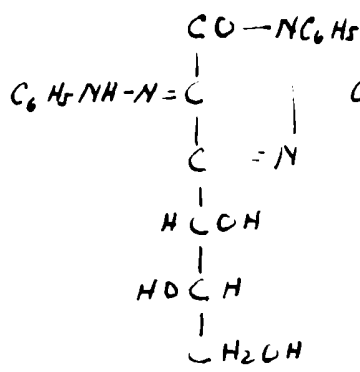
Esta sustancia se solubiliza en álcalis, transformándose en un derivado pirazólico de color amarillo y de punto de fusión  $212^{\circ}$ - $213^{\circ}$ , que corresponde a la sustancia amarilla estudiada por Kotake y Nishigaki la que por contener pequeñas impurezas les fundía a  $205^{\circ}$ - $206^{\circ}$ .

A esta sustancia amarilla le corresponde la fórmula IIa, interpretándose mejor su solubilidad en álcalis admitiendo la fórmula IIb, con formación de un oxhidrilo de tipo enólico, que facilita la disolución. Ambas sustancias pueden considerarse, pues, tautómeras.



I

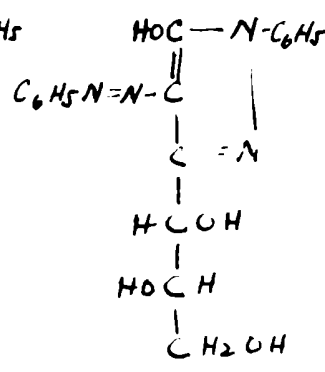
Producto rojo  
Pt  $216^{\circ}$



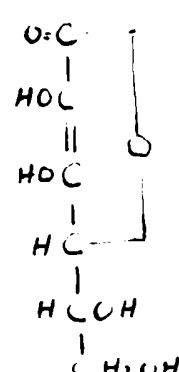
IIa

Producto amarillo

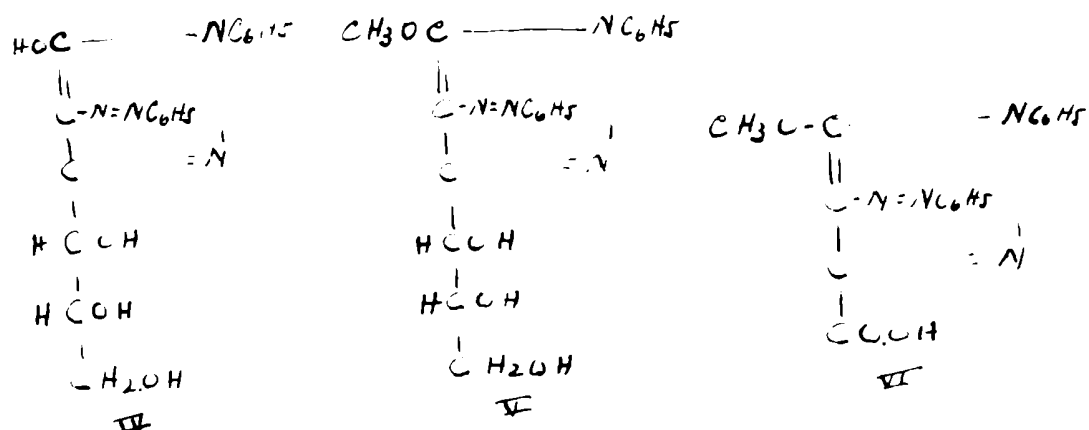
Pt  $212^{\circ}$ - $213^{\circ}$



IIb



III



La estructura de la sustancia II (a y b) ha sido deducida de la comparación con sustancias más simples que poseen una constitución similar como lo han hecho Tatematzu, Nogi y Yoneda y también por el estudio de un compuesto similar que se obtiene en la misma forma del ácido glucosacaráónico (III) como ha hecho Ohle (1934). Este ácido por un método semejante da también un derivado pirazólico IV que tratado con diazometano reacciona bajo la forma enólica dando el eter metílico del enol V. La oxidación de este eter permitió el aislamiento del ácido 1:fenil 4:benzotriazo-5 metoxipirazol 3:carbónico VI, cuya estructura se conoce por síntesis, de donde se deduce que la misma constitución debe asignarse a la parte nitrogenada de los compuestos amarillos tanto a la del ácido glucosacaráónico (compuesto IV) como, por similitud, a la del ácido ascórbico (compuesto IIb).-

MÉTODOS DE VALORACIÓN DE LA VITAMINA C.

Los métodos de valoración de la vitamina C pueden clasificarse en biológicos, o sean los que utilizan animales, y en químicos que son los que aprovechan la propiedad altamente reductora de la vitamina para su titulación volumétrica.

Historicamente los métodos biológicos fueron los primeros y tienen su origen en la obtención del escorbuto experimental por Holst y Frölich (1907-1912). Aunque basados en un mismo principio sus variantes son numerosas por lo que sólo se hablaremos los principales tipos de los mismos.

Métodos Biológicos - Después de la obtención por Holst y Frölich del escorbuto experimental mediante una dieta apropiada que se suministraba a cobayos, se iniciaron en el Instituto Lister en Londres en 1916 una serie de experiencias destinadas a determinar la potencia anti-escorbútica de diversos alimentos. Estas determinaciones se efectuaban en la forma siguiente: Un grupo de cobayos en crecimiento, cuyo peso sea de 250 a 300 gramos, se divide en dos lotes. A uno de estos se le daba la dieta escorbútica constituida por, avena, cebada y leche autoclavada a 120° durante 1 hora y al otro la misma dieta a la que se adicionaba la sustancia cuya actividad anti-escorbútica se deseaba determinar. Para resultados cuantitativos es necesario establecer la dosis mínima de esta sustancia, capaz de mantener libre de escorbuto a los animales.

Los animales sometidos a la dieta basal solamente, continúan su crecimiento normal hasta los 15 a 20 primeros días, luego comienzan los signos de escorbuto y el animal disminuye de peso y muere en 30 a 40 días. En cambio los que reciben los alimentos que contienen la vitamina C, continúan su crecimiento normal sin presentar síntomas de escorbuto. Es conveniente mantener a los animales en observación durante tres meses.

La mayor parte de los métodos utilizados son variantes del anterior, con ligeras modificaciones, sobre todo a la dieta.

Höjer (1926) propuso una modificación en la técnica de observación y diagnóstico del escorbuto, sustituyendo los signos macroscópicos por un examen histológico de los dientes, después de 10 a 14 días de someter a los animales a la dieta mencionada abreviando así el tiempo de observación a tres semanas. Estos dos métodos son esencialmente del tipo preventivo.

Recientemente Harris y Kay (1932) y Harris, Mills é Innes (1932) han propuesto un método curativo consistente en producir escorbuto en los animales y en ese momento incorporar a la dieta el alimento donde se desea posar la vitamina C.

Métodos químicos - Todos los métodos químicos propuestos están basados en la gran capacidad de reducción que posee el ácido ascórbico.

En 1921 Bezssonoff afirmó que la capacidad antiescor

bútica de los extractos de vitamina C era paralela a la intensidad de coloración que daba con el reactivo molibdo-fosfo-tungstico.

Tillmans en 1932 propone el uso de un indicador de óxido-reducción, el 2:6 diclorofenol-indofenol, preparado por Clark, cuya solución en medio neutro es decolorada al añadirla a una solución de ácido ascórbico.

También se ha aplicado al doaje la reacción del ácido ascórbico con el iodo en medio ácido. Consiste en adicionar a una solución de vitamina C en medio ácido, otra exactamente titulada de iodo. El punto final se obtiene haciendo to que en solución de almidón.

Harris y Kay (1933) encuentran al trabajar con cortezas de suprarrenales, que las titulaciones hechas con iodo en medio ácido y con el 2:6 diclorofenol-indofenol en medio neutro no dan valores satisfactorios. Hallan una mayor concordancia entre su método biológico curativo y la titulación hecha con el 2:6 diclorofenol-indofenol en medio ácido, a pH 2,5. Otra diferencia con el método de Tillmans consiste en que añade la solución de ácido ascórbico sobre una cantidad medida de indicador, lo que permite apreciar mejor el punto final de la titulación. Estas afirmaciones fueron confirmadas poco mas tarde por Virbely (1933) y Birch, Harris y Kay (1933).

Bezssonoff en 1934 preparó un nuevo reactivo monomolibdo-fosfotúngstico, el que da una coloración azul-violeta estable con el ácido ascórbico, debido a la función dienólica que posee éste.

Con éste reactivo determina curvas de reducción para distintas concentraciones de ácido ascórbico, curvas que corren paralelas con las determinadas electrometricamente (potenciales de óxido-reducción) y por el 2:6 diclorofenol-indofenol. Esto le permite el dosaje del ácido ascórbico en medios biológicos.

Tanto en el método de Tillmans como en el de Harris y Kay era necesario titular previamente la solución del 2:6 diclorofenol-indofenol con una solución de ácido ascórbico recientemente preparada, la que a su vez debía titularse con iodo en medio ácido. Hoy se evita el uso del ácido ascórbico, que siempre resulta oneroso, mediante el empleo de una solución de glucosa-reductona preparada por la técnica de Kertesz (1934).

Esta, que consiste en una solución de glucosa calentada en condiciones standard, es capaz de desarrollar un poder reductor hacia el 2:6 diclorofenol-indofenol que se reproduce perfectamente en distintas preparaciones, lo que hemos podido confirmar en nuestras experiencias.

#### Parte Experimental

El método utilizado por nosotros es el de Birch, Harris y Kay. Los reactivos necesarios son los siguientes:

Ácido tricloracético al 20 %.

Solución de 2:6 diclorofenol-indofenol (0,01M aproximadamente) que se prepara disolviendo 0,1g. de dicho indicador en agua hirviendo, se filtra y el residuo se vuelve a extraer con agua hirviendo y se filtra nuevamente. Los filtrados se -

unen y se llevan a 50 cm<sup>3</sup>. con agua. Esta solución se titula con la reductona.

Solución de reductona. Se prepara en la siguiente forma: se colocan en un tubo, provisto de válvula de Bunsen, 5 cm<sup>3</sup>. de una solución de glucosa al 0,5 % y 0,5 cm<sup>3</sup> de hidróxido de sodio N/2, calentándose a baño maría a 80° durante doce minutos exactos, al cabo de los cuales se enfría y se le agrega 1 cm<sup>3</sup>. de ácido clorhídrico al 10 %. La solución se usa inmediatamente para titular el 2:6 diclorofenol-indofenol. Un cm<sup>3</sup>. de la reductona equivale a 0,25 mg. de ácido ascórbico.

Técnica. El órgano cuya riqueza en vitamina se desea determinar, se corta en trozos pequeños y se pesan alrededor de 5 a 10 gramos según el contenido en ácido ascórbico. Se coloca en un mortero y se tritura con arena fina, lavada y calcinada. Se añaden 5 cc. de ácido tricloroacético al 20 %, moliendo el órgano continuamente y luego un poco de agua, pasándose solución y órgano a un tubo graduado, completándose con agua destilada hasta un volumen exacto, habitualmente 25 cc. Se centrifuga y se obtiene así un extracto límpido que debe enrojecer debilmente el Azul de timol.

Una cantidad medida de 2:6 diclorofenol-indofenol (de 0,2 a 0,5 cc.), se coloca en un tubo pequeño y sobre ella se deja caer desde una bureta de 1 c.c. el extracto de órgano. El indicador, azul en medio neutro vira al rojo al caer las primeras gotas ácidas del extracto y el punto final de la titulación está dado por el pasaje del rojo al amarillo pálido. Juan



do la solución de colorante es vieja, el color final es el marrón en lugar del amarillo.

El cálculo se hace en la forma habitual.

Realizadas las titulaciones en la forma descripta se ve que la cisteína que prácticamente no se encuentra en la mayor parte de los tejidos, puede reducir el indicador, mientras que si se efectúa en medio neutro (método de Tillmans) existen otros reductores, como el glutatión, que también lo hacen (Harris y Day 1933). Hammerie (1934) ha propuesto un método para la separación previa de la cisteína con acetato de mercurio.

Con la técnica descripta anteriormente se ha estudiado la repartición de la vitamina C en los órganos de secreción interna de bovinos argentinos habiéndose encontrado cifras que concuerdan en general con las obtenidas por autores extranjeros.

A continuación damos los valores máximo y mínimos y el promedio obtenidos para los distintos órganos:

Órganos	Valor Mínimo 0,00	Valor Máximo 0,00	Promedio	Determi- naciones
Cápsulas suprarrenales	1,1	1,48	1,25	29
Hipófisis(				
(Lóbulo anterior	1,1	1,6	1,23	17
(Lóbulo posterior	0,9	1,2	0,92	17
Cuerpo amarillo	1,2	1,9	1,36	17
Timo	0,5	0,6	0,53	3
Bazo	0,35	0,45	0,40	6
Tiroides	0,16	0,23	0,20	7
Testículos	0,29	0,36	0,34	4
pancreas	0,17	0,27	0,22	5
Líquido folicular	Menos de	0,20		3

Tinción de tejidos por el nitrato de plata.

Cuando se coloca un corte de glándula suprarrenal en una solución de nitrato de plata la parte cortical queda intensamente teñida de negro (reducción de la sal de plata), no así la médula que permanece sin cambio alguno apreciable. La reducción de las sales de plata por los tejidos glandulares se había tomado como guía (Gough y Silva 1933) para demostrar la presencia de ácido ascórbico en ellos, pues esta reducción se atribuía al contenido en dicho ácido de los órganos estudiados. Sin embargo Harris y Fay (1933) encontraron que esta guía no era segura, pues dosando tanto por medios biológicos como químicos, el contenido en ácido ascórbico de la corteza y la médula suprarrenal encontraron que el valor en esta última era tan solo un poco menor que en la primera.

La causa de la no reducción de las sales de plata por la médula se debe a la presencia en ella, de una sustancia que impide dicha reducción. Esto fué demostrado por Kuczak (1933), quien colocando unos minutos, un corte de suprarrenal en una solución de acetato de plomo al 20 %, lavando luego con agua y sumergiéndolo luego en una solución de nitrato de plata nota que el corte se tñe homogéneamente de negro. Una demostración más clara la da Kuczak al hacer un extracto de la parte medular de suprarrenal con ácido tricloroacético al 20 %. Este extracto no reduce el nitrato de plata (pero si el 2:6 diclorofenol-indo

fenol.) Si a este extracto se le agrega ácido ascórbico puro, tampoco reduce la sal de plata. Pero si al extracto de médula se le añade acetato de plomo y se centrifuga el precipitado, el líquido sobrenadante reduce enérgicamente el nitrato de plata. De estas experiencias se reduce la presencia de una sustancia que impide la reducción.

#### PARTE EXPERIMENTAL

##### Tinción de la hipófisis.-

En hipófisis hemos encontrado que sucede una cosa análoga. Cuando un corte transversal de dicha glándula, se sumerge en una solución de nitrato de plata, se tiñe de negro solamente el lóbulo anterior. Si se trata primeramente, con una solución de acetato de plomo y luego con la solución de sal de plata, como en el caso de la suprarenal, se obtiene una tinción homogénea. Los extractos hechos con ácido tricloracético al 10 % de lóbulo posterior tampoco reducen el nitrato de plata. La reducción se lleva a cabo si se elimina la sustancia inhibidora con acetato de plomo. Esto indica la presencia en el lóbulo posterior de hipófisis de una sustancia análoga a la que se encuentra en la médula de suprarenal.

- V -

ALGUNOS DATOS DEL ACÍDICO ÁCIDO ASCÓRICO EN LOS TEJIDOS ANIMAL Y VEGETAL.

A pesar de haberse dosado en gran número de tejidos vegetales y animales, el contenido en vitamina C. tanto por métodos biológicos como químicos, sólo se ha aislado el ácido ascórbico al estado puro de un reducido número de tejidos vegetales y animales.

Damos a continuación un cuadro en el cual se enumeran las fuentes de donde esta vitamina ha sido aislada al estado puro.

Aislamiento de ácido ascórbico al estado puro.

<u>Origen de vegetales</u>	<u>Autor</u>	<u>Bibliografía</u>
Hepollo	Szent Györgyi	Bioch. J. 72-1927-19. 8
Naranja	" "	idem.
Melón	Smith y Fog	J. Biol. Chem. 97-265-1931
Iris germánica	Bauman-Betzger	Proc. Exp. Biol. Méd. 33-1263-1933.
Symplocarpus foetidus	Bauman-Betzger	Proc. Exp. Biol. Méd. 33-1268-1933.
Ajónjolico (Sesuvium portu- straca)	Vishely y S. Györgyi	Bioch. Jour. 27-270-1933
Hagebutten (Rosal sil- vestris ? (Lizyphus ? (vulgaris ?)	Hillmann, Hirsch Vaubel	Z. Unters. - Lebenam. 66-145-1933.
Jugo de Daikon (Rhapanus sativus)	S. Maruyama	Scient. papers Inst. Physi chem Research 4-227-1934.
Jugo de Natumican (Citrus aurantiun) y de verde japonés	idem. idem.	

<u>Origen</u> <u>de animales:</u>	<u>Autor</u>	<u>Bibliografía</u>
Corteza de suprarenal	S. Györgyi.	Bioch.J.22-1387-1928 -
Corteza de suprarenal	S. Haruyama.	Scient.paper.Inst. Physi.Chem. Research-24-287-1934.
Hipófisis	Endive	

Aislamiento como vitaminasona.

Testículos, pulmones )		Hoppe Seyler .f.Phy-
Cerebro, base, hipófisis )		siel Chemie- 219-225-
humor vítreo y lí- )	Matsumoto-Kitahara.	1933.-
Quido cerebro-espi- )		
nal. )		
Cuerpo amarillo	Endive.	

Los métodos utilizados por estos autores están basados en el original de S. Györgyi (1928) al que se le introducen las modificaciones adecuadas a cada caso.

EXPERIMENTAL

Aislamiento de ácido ascórbico de la hipófisis.

Los otros tratamos de aislar el ácido ascórbico de hipófisis y cuerpo amarillo, por lo que en estas glándulas, conjuntamente con los otros tejidos, se encuentran en él.

El método empleado para aislar el ácido ascórbico es el de S. Györgyi

yi y la técnica usada fué la siguiente:

1.200 kg. hipófisis se desmenuzan bien con una máquina picadora de carne, y se le agregan 1.000 cc. de ácido tricloroacético al 20 o/o y 500 cc. de agua. Esta suspensión se mantiene en un baño de hielo durante media hora agitándola de tiempo en tiempo mediante una fuerte corriente de anhídrido carbónico. Al cabo de ese tiempo se filtra la suspensión y el residuo se vuelve a suspender en 400 cc. de agua acidulada con 200 cc. ácido tricloroacético al 20 o/o, repitiéndose en esta forma la operación anterior, dos veces más. Los filtrados reunidos, mantenidos siempre en baño de hielo, se tratan con una solución saturada en caliente de acetato de plomo hasta obtener una concentración final de 5 % de dicha sal. Se alcaliniza luego con hidrato de sodio al 1 % hasta obtener color azul del azul de timol, y se deja así media hora en el hielo, filtrándose luego por Büchner. El precipitado se lava con agua y luego se suspende en la menor cantidad de agua posible, descomponiéndose con ácido sulfúrico al 10 %, el que se agrega en pequeñas cantidades hasta color rosa debil del azul de timol. En caso de pasarse al acidular se trata con bicarbonato de sodio hasta obtener dicho tinte. Se filtra (o se centrifuga), y el líquido se concentra a vacío (20°-30°) y se guarda en desecador a vacío sobre sulfúrico.

El residuo se extrae con 10 cc. de alcohol metílico anhidro se separa el precipitado y se vuelve a extraer dos veces más en la misma forma. (En total se usan 30 cc.). Los líquidos

alcohólicos se reúnen y se les añade 5 volúmenes de eter seco sobre sodio.

Se separa el precipitado y el líquido alcohólico etero se evapora a sequedad a baja temperatura. El precipitado que contiene aún mucha vitamina, se guarda, pudiendo utilizarse en una extracción posterior.

El residuo de la evaporación se disuelve en agua, se neutraliza y se le agrega acetato de plomo al 2% . El precipitado se centrifuga y al líquido sobrenadante se le añade tres veces su volumen de alcohol etílico de 96°. Precipita así la sal de plomo de la vitamina. Se filtra por Büchner y el precipitado de plomo se seca a vacío sobre ácido sulfúrico.

Una vez seco lo suspende en acetona anhidra y se hace pasar una corriente de hidrógeno-sulfurado. Se filtra el sulfuro de plomo y la acetona se evapora a baja temperatura. Se obtiene un aceite que cristaliza parcialmente.- Las sustancias resinosas que quedan se eliminan lavando con acetona anhidra y fría.

Esta acetona de lavado se añade igual volumen de eter anhidro y exceso de eter de petroleo y se deja a 0°. En esta forma cristaliza más vitamina.

Los cristales obtenidos son de forma de agujas agrupadas a rosetas. El rendimiento fué de 15 mg. tan solo.

Fundar a 183°5, -185° y mezclados con una muestra de vitamina pura natural, de punto de fusión 187.- 188°5 dan un punto de fusión mixto d 184°5 - 185°5.-

Los cristales reducen el nitrato de plata, el iodo y soluciones de 2:6 diclorofenol indofenol.

Debido a la pequeña cantidad obtenida, se creyó más conveniente realizar la identificación transformándola en el derivado cetónico correspondiente.

12 mg. de cristales se trataron con 2 cc. de acetona y 150 mg. de sulfato de cobre anhidro, agitándolos durante 40 horas. Se filtra luego y se evapora la acetona a vacío.

El residuo cristalino obtenido funde a 210° - 211° y recristalizado de acetona por adición de eter de petróleo da un punto de fusión de 217° - 218° y mezclado con un compuesto mono-cetónico preparado con vitamina pura y que funde a 218° - 220° da un punto de fusión de 217° - 219°.

#### Caracterización de vitamina C en cuerpo amarillo.

Aplicado el método utilizado con la hipófisis, y algunas variaciones del mismo, para la obtención del ácido ascórbico cristalizado, al cuerpo amarillo no dió resultado debido a la presencia de sustancias que dificultaban dicho aislamiento.

Se trató, entonces, de caracterizar la presencia de dicho ácido, mediante la preparación de un derivado suyo, aprovechando la facilidad con que reacciona con la fenil-hidrazina para dar una osazona: la vitamosazona.

Para ello se partió de 250 gr. de cuerpo amarillo los que se trituran con la máquina de picar carne y se extrae el ácido ascórbico con ácido tricloracético al 20 % como se hizo



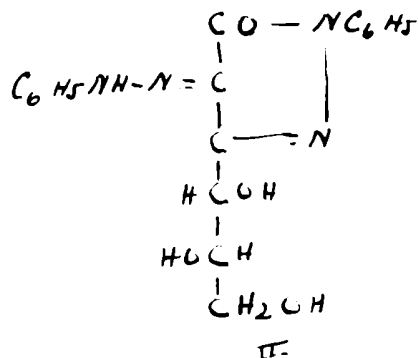
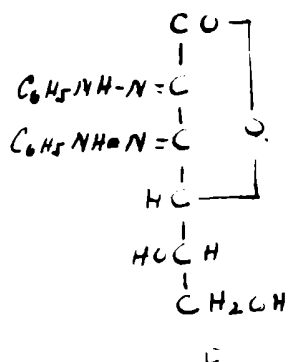
con la hipófisis, siguiendo el mismo tratamiento que en esta hasta obtener la sal de plomo de la vitamina, la que luego es descompuesta con ácido sulfúrico al 20 %. Se centrifuga el sulfato de plomo y en el líquido sobrenadante queda disuelto el ácido ascórbico. Se oxida éste con solución N de iodo hasta débil exceso de iodo (toque en almidón) se alcaliniza luego con hidrato de sodio normal y luego se acidifica con ácido acético. A esta solución se le añade otra de fenilhidrazina y se lleva a 100-120 cm<sup>3</sup> con agua calentándose luego en B.M. a 70° durante 15 minutos. Se forma un precipitado rojo de vitamosa-zona el que aumenta al dejarlo durante 1 noche en el frío. Se filtra y se lava el precipitado primero con agua acética y luego con agua destilada.

Se disuelve el precipitado así obtenido en hidrato de sodio normal en caliente, se diluye con agua hasta obtener un volumen de 100 - 120 cm<sup>3</sup> y se acidifica con ácido acético. Se obtiene un precipitado amarillo que se filtra, lava con agua y se seca. Se recristaliza dos veces con alcohol metílico, obteniéndose así un producto cristalizado, de color amarillo que funde a 210°. Este producto mezclado con el que se obtuvo de vitamina pura y que funde a 211°-212° da un punto de fusión de 210°.

PREPARACION DE LA VITAMINA A PARTIR DE ACIDO ASCORBICO PURO.

A fin de obtener un producto con el cual se pudiera comparar las propiedades de la vitamosazona obtenida de cuerpo amarillo, se preparó dicho compuesto a partir de ácido ascórbico puro de la casa "Hoffmann La Roche", siguiendo la técnica de tallad. a continuación. Tres gramos de ácido ascórbico se disuelven en 20 cc. de agua y luego se oxidan con una solución de iodo normal hasta debil exceso de iodo (toque en almidón).

Se alcaliniza luego con hidrato de sodio normal hasta rojo del fenol-ros, acidificándose a continuación con ácido acético y llevándose la solución hasta 50 cc. con agua. Se prepara aparte, una solución de 5 gr. de clorhidrato de fenilhidrazina y 10 gr. de acetato de sodio en 30-40 cc. de agua. Se filtra esta solución y se le añade a la anterior, calentándose todo a baño maría a 70° grados durante 15 minutos. Se obtiene así un precipitado rojo voluminoso, que aumenta con el tiempo. Se deja en el frío durante 24 horas y se filtra. El precipitado se lava con agua acética primero y luego con agua. A este cuerpo le corresponde la fórmula I.



El precipitado rojo así obtenido se trata con hidrato de sodio normal en caliente hasta que se disuelva. Se filtra la solución si es necesario, se diluye hasta 200 cc. con agua y se acidifica con ácido acético concentrado. Se obtiene un precipitado amarillo (fórmula II) que se deja a 0° durante 24 horas al cabo de las cuales se filtra y lava con agua y se seca. Rendimiento 4,75 g. Este precipitado se digiere en frío con poco alcohol metílico y se filtra. Se obtiene un producto que funde a 213° - 215°. Este producto recristalizado una vez de alcohol metílico da 1,9 g. de cristales amarillos de punto de fusión 212-213°. De las aguas madres se obtienen luego 1,85 g. de cristales que funden a 211°.

Hemos encontrado con esta técnica que se puede obtener el derivado pirazólico (fórmula I) muy puro, sin purificar el compuesto rojo, lográndose además un buen rendimiento pues de tres gramos de ácido ascórbico se obtienen 2,75 g. de un producto que funde a 211-212°, mientras que si se purifica el compuesto rojo el rendimiento disminuye mucho como lo comprueba - hle, (1934), quien partiendo de 5,40 g. de ácido ascórbico obtiene 3 g. del producto rojo bruto del que por sucesivas cristalizaciones de alcohol para purificarlo sólo recoge 0,55 g. de agujas rojas que luego transforma en el derivado pirazólico que funde a 211° para el que obtiene un punto de fusión de 210° no dando rendimiento del mismo, aunque este debe ser del mismo orden del de las agujas rojas.

- VII -

SISTEMA DE ACCIÓN FISIOLÓGICA DE LA VITAMINA C.

Tenemos muy pocas indicaciones sobre la manera de actuar de la vitamina C. en el organismo. El alto poder reductor característico de esa sustancia hace pensar que a él esté vinculada alguna función importante. De su capacidad de oxidarse y reducirse en forma reversible, se podría pensar en la posibilidad que actuara como un transportador de oxígeno. Euler y Klusmann (1933) demostraron efectivamente que los cortes de tejidos normales tienen un consumo mayor de oxígeno que los de tejidos de animales escorbúticos, y en esa enfermedad la cantidad de vitamina presente en los tejidos disminuye en forma marcada (Harris y Fay, 1933). Llaman también la atención que el ácido ascórbico se encuentra en el organismo acumulado como indican las cifras encontradas en bovinos y citadas en el capítulo III en órganos donde hay sustancias fácilmente oxidables o que pueden actuar como sistemas de óxido-reducción. Así en las suprarrenales se lo encuentra junto a la adrenalina y al caroteno, en el cuerpo amarillo también con el caroteno y en la hipófisis con un complejo de enzimas de naturaleza desconocida, una de las cuales tiene los caracteres de un sistema óxido-reductor Gulland y Randall (1935). Ninguna de estas glándulas puede considerarse un depósito de la vitamina, pues las necesidades diarias del organismo, calculadas para el hombre entre 19 y 27 mg. diarios, son tales, que esa reserva desaparecería en muy pocos

días, y lo mismo puede decirse de diversas especies animales. Son poco conocidas las condiciones de formación del ácido ascórbico en los organismos capaces de hacerlo. Con el método volumétrico de dosaje, se ha podido demostrar que en el embrión de pollo (Pay, 1934) se produce ya en los primeros días de su desarrollo un aumento de la sustancia reductora.

Lo mismo ocurre con ciertas semillas al germinar, y en estos casos se puede demostrar que de entre varios azúcares tan solo la adición de manosa al medio nutritivo produce un aumento muy superior a los demás. Hay que tener sin embargo en cuenta los resultados de S.J. Johnson (1933), quien encuentra que las arvejas sin germinar a pesar de no tener propiedades antiescorbúticas, reducen el 2:6 diclorofenol-indofenol y además que los extractos de arvejas en germinación tienen gran poder de reducción hacia este colorante y sólo poseen la mitad del poder antiescorbútico. Guha y Gosh (1934-1935) han encontrado que la manosa es también el único azúcar que aumenta el poder reductor cuando se lo añade a una pacilla de hígado, riñón o bazo de ratas. Luego Guha y Gosh (1935,2) hallaron que la inyección intravenosa de manosa a las ratas produce un aumento notable en el poder reductor de varios órganos especialmente suprarenales e hígado. Además de la manosa, Mosonyi (1934) ha señalado que el cetol, una substancia de constitución  $\text{CH}_3\text{-CO-CHOH-CH}_2\text{-CO-CH}_3$  y que según Henze sería un producto del metabolismo intermedio de grasas e hidratos de carbono, puesto que estaría formado por una condensación de la acetona y metilglioxal, también produce,

cuando es inyectado, un aumento en el poder reductor de las suprarrenales de las ratas, aunque no evita el escorbuto en el chanchito de la india.

Más, a pesar de estas experiencias no puede tampoco afirmarse donde se realiza la formación del ácido ascórbico.

Que no es en las suprarrenales lo han demostrado Vars y Pfiffner (1934) al encontrar que en los perros suprarrenoprivos la formación de ácido ascórbico es tan rápida como en los normales. Al igual resultado llegaron Harris y Fay (1933) para las ratas.

Harde y Gelff (1934) encontraron luego que en las lauchas se encuentran cantidades considerables de ácido ascórbico en las paredes del intestino delgado, y plantearon la hipótesis que ese podía ser el lugar de formación. Hopkins (1934) ha demostrado que esa proporción alta se mantiene aunque se suministre a los animales dietas carentes de vitamina C.

El ácido ascórbico tiene además una acción diversa sobre varias enzimas del organismo, acción que podría calificarse de no específica.

Karrer y Lehender (1933) Euler Karrer y Lehender -- (1934) y Karrer y Lehender (1934), han demostrado que el ácido ascórbico es un activador de la catepsina intracelular, con la misma intensidad que lo hacen el ácido sulfhídrico y otros compuestos conteniendo el grupo SH. Esta activación aumenta por la adición de iones ferrosos ó férricos. Estos fenómenos de activación han sido confirmados por otros autores. (Bersin, 1933). Maschmann y Helmert (1933) han añadido que la papaína es inacti

vada por la presencia de ácido ascórbico pero que la presencia de este y sales de hierro la activa lo mismo que la cistatrina.

Una de las enzimas sobre las cuales actúa el ácido ascórbico es la arginasa. Gurr (1933) ha encontrado que el complejo ascórbico-sales de hierro la activa. Una observación han hecho Edlbacher y Leuthardt (1933) sobre el complejo ascórbico-sales de cobre. Gurr y Schender (1934) han podido confirmar la activación de la arginasa por ascórbico-sales de hierro, no así por ascórbico-sales de cobre. Respecto otras enzimas los datos son menos numerosos. Edlbacher y Leuthardt (1933) han encontrado que el complejo ascórbico sales de cobre inactiva la ureasa, Gurr (1934) ha determinado que la vitamina C. es un activador específico para la amilasa animal de tipo  $\beta$ . pero produce más bien un efecto inhibitor sobre la amilasa vegetal del mismo tipo. Finalmente Adberhalden (1934) ha encontrado que la adición de pequeñas cantidades de ácido ascórbico protege la dioxifenilalanina ó la adrenalina de la oxidación directa ó por acción de la tirosinasa.

### Parte experimental.

#### Acción del ácido ascórbico sobre la insulina.

La acción similar sobre las enzimas del ácido ascórbico y varias sustancias conteniendo el grupo SH. incluyendo el ácido sulfhídrico nos indujo en una experiencia realizada con la colaboración de los Dres. Lara y Torino a probar si el ácido

ascórbico era capaz de inactivar la insulina, como lo hace la citreína, el ácido tioglicólico ó el tioláctico de acuerdo a las experiencias de Interstainer (1933).

Para ello se prepararon 3 tubos disponiéndose la experiencia en las siguiente formas:

Tubo.	1	2	3
Ácido ascórbico mg.			
Insulina cristalizada mg.	5		
Agua cc.	2	2	2
pH	2,5	2,5	2,5

Se dejaron los tres tubos durante 24 horas a la temperatura ambiente al cabo de las cuales se dosó el ácido ascórbico de los tubos 1 y 3. La cantidad de dicho ácido era la misma en ambos tubos. Luego se dosó la insulina de los tubos 1 y 3, sobre 25 lauchas por la óptica de convulsiones. La insulina del tubo 1 dió convulsión a 16 lauchas, mientras que la del tubo 3 dió en 17 de ellas. Como se vé no hubo inactivación de la insulina por la diferencia de un laucha no puede ser tomada en cuenta en este método.

Estas experiencias se proseguirán, variando factores tales como el pH y la concentración.



## U M A R I

---

- 1º - Se determinó el contenido en ácido ascórbico en glándulas y órganos de bovinos argentinos, encontrándose valores que en general concuerdan con los obtenidos por otros autores.
- 2º - Se demostró la presencia, en el lóbulo posterior de hipófisis, de una sustancia análoga a la encontrada en la médula de suprarrenal, que impide la reducción del nitrato de plata por el ácido ascórbico.
- 3º - Se aisló, por primera vez, el ácido ascórbico a partir de hipófisis, aplicando el método de V. Gyorgyi, modificado.
- 4º - Aplicado el método anterior al cuerpo amarillo no dió resultado, caracterizándose la presencia del ácido ascórbico mediante la preparación de la vitamosazona.
- 5º - Se comprobó que el ácido ascórbico no inactiva la insulina, en forma apreciable, cuando se dejan en contacto durante 24 horas y a un pH 2,5.

- 1 -

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Venancio Peuloseu, director de este trabajo, por la ayuda y consejos recibidos y el interés puesto para la feliz terminación del mismo.

Al Dr. Alfredo Cordelli, Director del Instituto Bacteriológico, mi sincero agradecimiento al poner, gentilmente, a mi disposición, los laboratorios de dicho Instituto y el material necesario para la mejor realización de esta tesis.

A los Sres. Torino y Lara mi reconocimiento por su colaboración.

## BIBLIOGRAFÍA

La bibliografía correspondiente al primer capítulo ha sido tomada del excelente resumen contenido en el libro *Vitamins A. Survey of Present Knowledge* publicado por el medical Research Council (Londres.)

--:--

Evans y Bishop (1923) *J. Am. Med. Ass.* 31, 889 y *J. Metab. Res.* 3, 100.

Bijkman (1897) *Virchows Arch.* 142, 187.

Funk (1912) *J. State Med.* 21, 341.

Hölst y Frölich (1907-1912) *J. Hyg. Cam.* 7, 634 y *Z. Hig. Infek.* Kr. 72, 1.

Hopkins (1906) *Analist* 31, 395

Höjer (1926) *Brit. J. Exp. Nat.* 7, 356.

Lind (1747) *A treatise on the scurvy* (1757).

Lunin (1881) *Hoppe Seylers* 5, 31

Mellanby (1918) *J. Physiol.* 52, xi y liii.

Socin (1891) *Hoppe Seylers* 15, 93

-----:-----

Abderhalden (1934) *Fermentforschung* 14, 367 (según *Cem Abst.* 28, 6791, 1934).

Bersin (1933) *J. Physiol. chem.* 222, 177.

Bezssonoff (1921) *C. R. Acad. Scien. Paris* 173, 466.

    id. id. (1934) *Bull. Soc. Chem. Biol.* 16, 1107.

Birch, Harris y Hay (1933) *Biochem. J.* 27, 590.

Edlbacher y Leuthardt (1933) *Klin. Wochen* 12, 1843.

Emmerie (1934) *Biochem. J.* 28, 268.

- Euler, Karrer y Lehender (1934) *Helv Chim. Act.* 17, 157
- Euler y Klusmann (1933) *J. Physiol. Chem.* 219, 215.
- Gough y Silva (1933) *Biochem. J.* 27, 1279
- Grant, Smith y Silva (1932) *Biochem. J.* 26, 1628.
- Saha y Gosh (1934 y 1935) *Nature* 134, 739 y 135, 234.
- Saha y Gosh (1935,2) *Nature* 135, 871.
- Gullone y Randall (1935) *Biochem. J.* 29, 378.
- Harde y Wolff (1934) *C.P. Soc. Biol.* 116, 288.
- Harris, Mills é Innes (1932) *Lancet* ii 835.
- Harris y Ray (1932) *Biochem. J.* 26, 267.
- Harris y Ray (1933,1) *Biochem. J.* 27, 303.
- Harris y Ray (1933,2) *Biochem. J.* 27, 207.
- Hirst, Herbert, Percival etc. (1933) *J. of Chem. Soc.* 1270.
- Hopkins (1934) *Chem and Indus.* 53, 874.
- Huczak (1933) *J. Physiol. Chem.* 222, 229.
- Johnson (1933) *Biochem. J.* 27, 1943.
- Karrer y Lehender (1933) *Helv. chim. act.* 16, 701.
- id. id. (1934) id. id. 17, 737.
- Kertesz (1934) *J. Biol. Chem.* 104, 483.
- Kotake y Hishigaki (1933) *Hoppe Seyl. Physiol. Chem.* 219, 205.
- Maschmann y Helmert (1933) *J. Physiol. chem.* 222, 267.
- id. id. (1934) id. id. 224, 56.
- Mosonyi (1934) *J. Physiol. chem.* 231, 240.
- Ohle (1934) *Ber.* 67, 1750.
- Furr (1933) *Biochem. J.* 27, 1703.
- Furr (1934) *Biochem. J.* 28, 114.

(1 . . . . . 1 . . . . . )  
 . . . . . 183 . . . . . 1 4, 1 5.  
 v . . . . . 2, 3 . . . . .  
 v . . . . . 121, 57 . . . . .  
 . . . . . 183 . . . . . 5.  
 . . . . . 183 . . . . .  
 . . . . . 181, 84.  
 . . . . . 1 . . . . . 221,  
 . . . . . 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1,  
 . . . . . 1 . . . . . 1 . . . . .  
 . . . . . 2, 386.  
 . . . . . 11, 470.

