

Tesis de Posgrado

Determinación de vitaminas en algas argentinas

Corneli, Oscar J. J.

1959

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

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

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

Cita tipo APA:

Corneli, Oscar J. J.. (1959). Determinación de vitaminas en algas argentinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1016_Corneli.pdf

Cita tipo Chicago:

Corneli, Oscar J. J.. "Determinación de vitaminas en algas argentinas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1016_Corneli.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

*Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales*

///nos Aires, noviembre 27 de 1959.

Presentada en la fecha,

Acupur
ALBERTO CHIBBAR
PROSECTOR
A CARGO DE LA SECRETARÍA

Buenos Aires, noviembre 27 de 1959.

Por disposición del Señor Decano pase a la Comisión Examinadora Grupo VI, para que se sirva considerar la tesis presentada por el ex-alumno de la carrera del Doctorado en Química Dn. Oscar J. Corneli.
ot.

Alberto Chibbar
ALBERTO CHIBBAR
PROSECTOR
A CARGO DE LA SECRETARÍA

TESIS: 101.

Buenos Aires, diciembre

En la fecha la Comisión Examinadora respectiva procedió a considerar la tesis presentada por el ex-alumno Dn. Oscar J. Corneli, resolviendo aceptarla.-----

Alberto Chibbar
Adolfo J. Prates
Arnoldo Lupini
Ing. J. M. ...

Resumen de Tesis

Oscar Corneli- 1959

Se ha determinado, por métodos físicos y/o químicos, el contenido de provitaminas A y vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, D y PP de cinco especies de algas del litoral atlántico argentino: *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia flavicans*, *Lessonia fassia*- pardas- e *Iridea laminaroides* e *Iridea cordata* - rojas- numeradas respectivamente I, II, III, IV y V.

Las muestras corresponden a cosechas del período Marzo-Abril y han sido secadas por exposición al aire, a la sombra, en el lugar de su recolección.

En la Introducción (parte I) se ha dado una idea general de los conceptos ~~elementales~~ necesarios para la comprensión del trabajo y de las razones que lo motivaron; y una relación somera de los antecedentes sobre el tema.

En la Determinación (parte II) se ha hecho, para cada vitamina, un breve resumen de las propiedades biológicas, físicas y químicas que las caracterizan; del panorama analítico en general y de los métodos utilizados.- Estos últimos han sido tratados con mayor detenimiento, y se acompañan además de una descripción detallada de la técnica, cálculos, resultados y comentarios.

Los métodos utilizados son los consagrados por la práctica analítica corriente, excepción hecha de la vitamina D sobre la cual no existe aún un criterio definido en cuanto a su dosaje químico.

Se ha determinado el contenido en vitamina A por colorimetría según la reacción de Carr y Price, y espectrofotométricamente; en ambos métodos la determinación sigue a la saponificación y extracción etérea del insaponificable.

La concordancia obtenida entre los dos métodos fué satisfactoria.

Los resultados obtenidos fueron:

	I	II	III	IV	V
Método colorimétrico	94,3	53,6	52,8	32,6	28,7 U.I./gr. anh.
Método espectrofotométrico					

En el método colorimétrico se efectuó una lectura adicional para eli-

-Res. de Tesis: 1616

minar la influencia del color producido por los carotenos, cuyo valor fué despreciable.

En el método espectrofotométrico se descontó el valor de la absorción de las interferencias por destrucción fotoquímica de la vitamina A (irradiación con lámpara de mercurio).- Antes de la irradiación los resultados obtenidos según la fórmula de Morton y Stubbs fueron negativos, lo cual pone en evidencia la eficacia de la técnica de irradiación destructiva de Demarest.- la mayor interferencia se encontró a 310 m μ . en todos los casos.

Se ha determinado el contenido en provitaminas A colorimetricamente, por el método de Guilbert, según una modificación de Peterson; los carotenos se extrajeron con Skellysolve, previa hidrólisis alcalina; la interferencia de las xantofilas se eliminó por extracción metanólica de las mismas.- los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
3,0	1,8	9,3	0,3	1,1

mcgr./gr. anh. como β -caroteno.

Para las muestras I y III sobre todo, los valores obtenidos difieren de la apreciación de carotenos hecha por lectura residual en la determinación colorimétrica de vitamina A.- Cabe la salvedad de que la sensibilidad del método aquí empleado es mucho mayor que la que ofrecí la reacción con cloruro de antimonio, pero que la especificidad es mucho menor.

Se ha determinado el contenido en vitamina B₁ por el método de Jansen, según una modificación de Hennessy y Cerecedo que incluye el dosaje de la tiamina combinada como cocarboxilasa y el uso de Decalso activado para la eliminación de las interferencias.- El rendimiento de la adsorción en columna fué del 96 %.-

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
0,68	0,41	0,01	1,46	0,36

mcgr./gr. ann.

Se ha determinado fluorometricamente el contenido en vitamina B₂.

La eliminación de las interferencias se realizó por oxidación de los hidrolizados con permanganato de potasio y adsorción de la vitamina en una columna de Florisil: el rendimiento de esta operación fué del 97,5%.

Tanto en la determinación de la vitamina B₂ como en la de B₁, los extractos acuosos fueron hidrolizados vía ataque ácido y enzimático; es-

te último se revela como muy eficaz en la destrucción de los geles que forman principalmente las muestras IV y V.

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
13,5	4,8	7,6	38,3	17,9 mcgr./gr. anh.

Se ha determinado el contenido en vitamina B₆ por el método de Scudi, previa eliminación de proteínas, grasas e interferencias en general, respectivamente por precipitación, extracción etérea y oxidación.

En lo que respecta a la extracción e hidrólisis caben las mismas consideraciones que para vitaminas B₁ y B₂.

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
17,6	9,9	11,9	1,8	8,1 mcgr./gr anh.

Se ha determinado vitamina C por colorimetría según dos métodos: reducción de 2,6-diclorofenolindofenol y medición del color de la osazona solubilizada en medio sulfúrico.- En ambos casos se han utilizado técnicas que proveen un sistema adecuado de eliminación de interferencias.

Los resultados obtenidos fueron:

	I	II	III	IV	V
Método indofenol	132	175	192	130	242 mcgr./gr. anh.
Método osazona	200	127	116	428	209 " " "

Pese a las diferencias existentes, puede afirmarse que -excepción hecha de la muestra IV- los valores obtenidos en ambos métodos se corresponden satisfactoriamente, dado que valores correctos para una misma muestra diferirán según el equilibrio redox en que se encuentre la vitamina.

Se ha determinado el contenido en vitamina D colorimetricamente según el método de Brockmann y Chen.- Esta determinación se ha hecho -según se desprende de un párrafo anterior- solamente con carácter exploratorio.

Se eliminó la interferencia de la vitamina A y esteroides utilizando anhídrido maleico para destruir la primera y precipitando los esteroides de la solución metanólica, a baja temperatura, según una técnica de Milas, Heggie y Raynolds.- Se demostró que la modificación realmente elimina la vitamina A.- Se introdujeron blancos de reactivos según técnica de Wilkie, Jones y Kline (adaptada) por inhibición del color producido, por

acción de anhídrido acético.

El uso de ambas técnicas evidenció la presencia de interferencias que fueron eliminadas por ellas.

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
680	937	690	672	623 U.I./gr. anh., como vit. D ₃

Si bien las técnicas antedichas eliminaron una interferencia que hubiese dado lugar a resultados mucho más elevados, los obtenidos indican resultados de vitamina D mucho más altos de los que era dable esperar, máxime si se tiene en cuenta que por tratarse de tejidos vegetales sólo puede encontrarse en ellos vitamina D proveniente de irradiación natural.

Un intento de dosar la vitamina espectrofotométricamente sobre los mismos extractos indicó la presencia de una gran interferencia, introducida evidentemente por los métodos de purificación.

Se ha determinado el contenido en vitamina PP colorimetricamente, por el método de Mueller y Fox: lectura de la absorción del bromocianocompuesto del ácido nicotínico y comparación.

La nicotinamida se transformó en ácido nicotínico por hidrólisis ácida y éste se extrajo por adsorción en reactivo de Lloyd y elución alcalina: las proteínas se eliminaron del eluido por precipitación con sales de plomo.- Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
51,9	8,6	15,3	18,8	12,5 mcgr./gr. anh. como ác. nicotínico

En la expresión de resultados de cada vitamina se expuso un comentario sobre los mismos.

En la parte III se ofreció un cuadro general de resultados y una compilación de valores referentes a otras especies de algas y a vegetales habituales en la alimentación humana y animal.

En Conclusiones y Discusión (parte IV) se discuten los resultados obtenidos y se concluyó que, exceptuando los datos de vitamina D - por otra parte objetables, las especies tratadas pueden equipararse como conjunto vitamínico a muchos vegetales actualmente considerados como básicos en la alimentación humana directa e indirecta, y a otras algas ya utilizadas con esa finalidad.- En lo que respecta a los valores de la vitamina D, se propuso una confirmación biológica e investigación posterior sobre los mismos.

*Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales*

///nos Aires, noviembre 27 de 1959.

Presentada en la fecha,

Alcázar

Buenos Aires, noviembre 27 de 1959.

Por disposición del Señor Decano pase a la Comisión Examinadora Grupo VI, para que se sirva considerar la tesis presentada por el ex-alumno de la carrera del Doctorado en Química Dn. Oscar J. Corneli.

ot.

Alberto Schabar
ALBERTO SCHBAR
PROSECTOR
A CARGO DE LA SECRETARÍA

TESIS: 101.

Buenos Aires, diciembre

En la fecha la Comisión Examinadora respectiva procedió a considerar la tesis presentada por el ex-alumno Dn. Oscar J. Corneli, resolviendo aceptarla.-----

Alcázar
Adolfo J. Prates
Arnoldo Riquelme



AGRADECIMIENTO

Al Doctor A. Montes, por haber patrocinado y orientado mi labor.

Al Doctor A. Fortunato, por su colaboración en todo lo referente a las algas.

A J. R. Squibb & Sons, Argentina, en las autoridades de la División Control de Calidad, por el uso de sus laboratorios.

O. Corneli

Septiembre de 1959

RESUMEN

Se ha determinado, por métodos físicos y/o químicos, el contenido de provitaminas A y vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, D y FF de cinco especies de algas del litoral atlántico argentino: *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia flavicans*, *Lessonia fassia* -pardas- e *Iridaea laminarioides* e *Iridaea cordata* -rojas- numeradas respectivamente I, II, III, IV y V.

Las muestras corresponden a cosechas del período Marzo-Abril y han sido secadas por exposición al aire, a la sombra, en el lugar de su recolección.

En la introducción (parte I) se ha dado una idea general de los conceptos elementales necesarios para la comprensión del trabajo y de las razones que lo motivaron; y una somera relación de los antecedentes sobre el tema.

En la determinación (parte II) se ha hecho para cada vitamina un breve resumen de las propiedades biológicas, físicas y químicas; del panorama analítico en general y de los métodos utilizados.- Estos últimos han sido tratados con mayor detenimiento y se acompañan además de una descripción detallada de la técnica, cálculos, resultados y comentarios.

Los métodos utilizados son los consagrados por la práctica analítica corriente, excepción hecha de la determinación de vitamina D, sobre la cual no existe aún un criterio definido en cuanto a su dosaje químico.

Se ha determinado el contenido en vitamina A por colorimetría (según Carr y Price) y espectrofotométricamente.

En ambos métodos la determinación sigue a la saponificación y extracción étera del insaponificable.

La concordancia obtenida entre los dos métodos fué satisfactoria.

Los resultados hallados fueron:

	I	II	III	IV	V	
Método colorimétrico	94,3	53,6	52,8	32,6	28,7	U.I./gr. anh.
Método espectrofotométrico	99,5	56,4	59,7	25,1	28,7	" " "

En el método colorimétrico se efectuó una lectura adicional para eliminar la influencia del color producido por los carotenos, cuyo valor fué despreciable.

En el método espectrofotométrico se descontó el valor de absorción de las interferencias por destrucción fotoquímica de la vitamina A (irr

diación con lámpara de mercurio durante tres horas).- Antes de la irradiación, los resultados obtenidos según la corrección de Horton y Stubbs fueron negativos, lo cual pone en evidencia la eficacia de la técnica de irradiación destructiva de Demarest.- La mayor interferencia se encontró a 310 m.μ. en todos los casos.

Se ha determinado el contenido en provitaminas A colorimétricamente, por el método de Guilbert, según una modificación de Peterson; los carotenos se extrajeron, previa hidrólisis alcalina, con Skellysolve; la interferencia de las xantofilas se eliminó por extracción metanólica de las mismas.- Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
3,0	1,8	9,3	0,3	1,1 mgr./gr. anh. como β-caroteno.

Para las muestras I y III sobretodo, los valores obtenidos difieren de la apreciación de carotenos hecha por lectura residual en la determinación colorimétrica de vitamina A.- Cabe al respecto la salvedad de que la sensibilidad del método aquí empleado es mucho mayor que la que ofrece la reacción con cloruro de antimonio, pero que no debe descartarse la posibilidad de que, al ser mucho menos específico, esté evidenciando algún colorante amarillo no eliminable por él.

Se ha determinado el contenido en vitamina B₁ por el método de Jansen, según una modificación de Hennessy y Cerecedo que incluye el dosaje de la tiamina combinada como co-carboxilasa y el uso de Decalco activado para la eliminación de interferencias.- El rendimiento de la adsorción en columna fué del 96 %.- Los extractos purificados fueron transformados por oxidación y determinado fluorimétricamente el tiocromo formado.

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
0,68	0,41	0,01	1,46	0,36 mgr./gr. anh.

Se ha determinado el contenido de vitamina B₂ fluorimétricamente.- La eliminación de las interferencias se realizó por oxidación de los hidrolizados con permanganato de potasio y adsorción de la vitamina en una columna de Florisil; el rendimiento de esta operación fué del 97,5%.

Tanto en esta determinación como en la de vitamina B₁, los extractos fueron hidrolizados vía ataque ácido y enzimático; éste último se revela como muy eficaz en la destrucción de los geles que forman sobre todo las muestras IV y V.

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
13,5	4,8	7,6	38,3	17,9

mogr./gr. anh.

Se ha determinado el contenido en vitamina B₆ por el método de Scudl. previa eliminación de proteínas, grasas e interferentes en general, respectivamente por precipitación, extracción éterea y oxidación.

En lo que respecta a la extracción e hidrólisis caben las mismas consideraciones que para las vitaminas B₁ y B₂.

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
17,6	9,9	11,9	1,8	8,1

mogr./gr. anh.

Se ha determinado vitamina C por colorimetría según dos métodos: reducción de 2,6-diclorofenol-indofenol y medición del color de la osazona solubilizada en medio sulfúrico.- La razón de la duplicación es la relativamente pobre especificidad de las reacciones utilizadas, si bien en ambos casos se han utilizado técnicas que proveen un sistema adecuado de eliminación de interferentes o de sus efectos.

Los resultados obtenidos fueron:

	I	II	III	IV	V
Método indofenol	132	175	192	130	242
Método osazona	200	127	116	426	209

mogr./gr. anh.

En general los valores obtenidos se corresponden, con excepción de la muestra IV, con algunas limitaciones.

El primero de los métodos mencionados determina reductores en general, eliminándose del sistema los que no son ácido ascórbico por medio de una rápida extracción éterea; el segundo determina sustancias osazonizables en general (ácido dehidroascórbico).- En consecuencia, resultados correctos para una misma muestra diferirán según el equilibrio redox en que se encuentre la vitamina.

Con respecto a la muestra IV, los resultados sugieren la presencia de una mayor cantidad de vitamina en forma de ácido dehidroascórbico y en cuanto a las restantes, existiría un equilibrio mayor.

Se ha determinado el contenido de vitamina D espectrofotométricamente, y colorimétricamente según el método de Broekmann y Chen.

Se eliminó la interferencia de la vitamina A y otras (esteroles) según la técnica de Milas, Heggie y Reynolds por destrucción de la primera con anhídrido maleico y precipitación de los segundos a baja temperatura.- Se corrió un standard de vitamina D adicionado de vitamina A, en proporciones analíticas comunes, y se comprobó por las lecturas que la eliminación de la vitamina A es satisfactoria; un standard ~~agregado~~ corrido solamente en la colorimetría indicó que la vitamina A eleva las lecturas.

Se introdujeron blancos de reactivos según técnica de Wilkie, Jones y Kline, por inhibición del color producido por la vitamina D por acción de anhídrido acético.

Si bien en los standards internos se notó el efecto de la vitamina A agregada, este se mostró con mayor intensidad en las lecturas de las muestras, que hubiesen sido mucho mayores de no mediar las correcciones introducidas.

Se intentó dosar espectrofotométricamente la vitamina D de los extractos por medición de la absorción a 265 m μ ., obteniéndose resultados satisfactorios sólo para los standards externos.- Evidentemente el tratamiento de purificación- que se revela eficaz para el método colorimétrico- introduce interferencias a la espectrofotometría.

Los resultados obtenidos por el método colorimétrico fueron:

I	II	III	IV	V
680	937	690	672	623 U.I/gr. anh.

Estos resultados indican cantidades de vitamina D más altos de los que era dable esperar, máxime si tenemos en cuenta que por tratarse de tejidos vegetales sólo podemos encontrar en ellos vitamina producida por irradiación.

Se ha determinado el contenido de vitamina PP colorimétricamente, por el método de Mueller y Fox- lectura de la absorción del bromocianocompuesto del ácido nicotínico y comparación.

La vitamina PP (ácido nicotínico) se extrajo de los hidrolizados ácidos por adsorción en reactivo de Lloyd y elución alcalina.

Las proteínas se eliminaron del eluido por precipitación con sales de plomo; el rendimiento de la adsorción-elución fué 93,5 %.

Los resultados obtenidos fueron:

I	II	III	IV	V
51,9	8,6	15,3	18,8	12,5

mcgr./gr anh.

En la expresión de resultados de cada vitamina se expone un comentario de los resultados obtenidos.

En la parte III se ofrece un cuadro general de resultados y una compilación de valores referentes a otras especies de algas y a vegetales habituales en la alimentación humana y animal.

En la parte IV (Conclusiones y discusión) se ofrece una discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones que de ellos se derivan.

DISTRIBUCION

I Introducción

- a) Prólogo.
- b) Conceptos generales sobre vitaminas.
- c) Conceptos generales sobre algas.
- d) Antecedentes sobre el tema.

II Determinación de vitaminas en algas argentinas.

Se refiere a:

- Vitamina A
- Provitaminas A
- Vitamina B₁
- Vitamina B₂
- Vitamina B₆
- Vitamina C
- Vitamina D
- Vitamina PP

Para cada vitamina se consideran los siguientes temas:

- A) Antecedentes:
 - a) Características biológicas.
 - b) Características químicas y físicas.
- B) Desarrollo del método de determinación:
 - a) Determinación química y/o física en general y elección del método.
 - b) Método; fundamento y comentarios.
 - c) Técnica.
 - d) Resultados obtenidos y comentarios.
 - e) Bibliografía.

III Cuadro de resultados y comparación con otros valores alimenticios.

IV Conclusiones y discusión.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	IV
DISTRIBUCION.....	IX
INTRODUCCION.....	1
Prólogo, 1.- Conceptos generales sobre vitaminas, 4.- (Bibliografía, 5).- Conceptos generales sobre algas, 6 (Bibliografía, 11).- Antecedentes sobre el tema, 12.	
DETERMINACION DE VITAMINAS EN ALGAS ARGENTINAS.....	16
(Bibliografía general, 17.).-	
VITAMINA A.....	18
Antecedentes: Características biológicas, 18.- Características químicas y físicas, 19.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 22.- Método colorimétrico según Carr y Price, fundamento y comentarios, 24.- Técnica, 27 (Reactivos, 27.- Extracción y purificación, 27.- Reacción y colorimetría, 29.- Cálculos, 29.- Experimental, 31).- Método espectrofotométrico, fundamento y comentarios, 32.- Técnica, 35 (Reactivos, 35.- Extracción y purificación, 35.- Espectrofotometría, 36.- Cálculos, 37.- Experimental, 38).- Resultados obtenidos y comentarios, 40.- Bibliografía, 41.	
PROVITAMINAS A.....	44
Antecedentes: Características biológicas, 44.- Características químicas y físicas, 44.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 48.- Determinación por el método de Guilbert, modificado por Petersen, fundamento y comentarios, 49.- Técnica, 50 (Reactivos, 50.- Extracción y purificación, 50.- Colorimetría, 52.- Cálculos, 52.- Experimental, 53).- Resultados obtenidos y comentarios, 53.- Bibliografía, 54.	
VITAMINA B ₁	55
Antecedentes: Características biológicas, 55.- Características químicas y físicas, 57.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 60.- Determinación por el método del tiocromo, 61.- Técnica, 64 (Reactivos, 64.- Extracción e hidrólisis,	

- 65.- Purificación, 65.- Conversión en tioromo, 66.-
Fluorimetría, 66.- Cálculos, 66.- Experimental, 66)
.- Resultados obtenidos y comentarios, 68.-
Bibliografía, 70.

VITAMINA B₂..... 72

Antecedentes: Características biológicas, 72.- Características químicas y físicas, 74.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 76.- Método fluorimétrico, fundamento y comentarios, 79.- Técnica, 82 (Reactivos, 82.- Hidrólisis y extracción, 82.- Purificación, 83.- Fluorimetría, 83.- Cálculos, 84.- Experimental, 85).- Resultados obtenidos y comentarios, 86.- Bibliografía, 87.

VITAMINA B₆..... 88

Antecedentes: Características biológicas, 88.- Características químicas y físicas, 90.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 92.- Método colorimétrico de Seudi, fundamento y comentarios, 94.- Técnica, 96 (Reactivos, 96.- Reacción e hidrólisis, 97.- Purificación, 97.- Reacción, 98.- Colorimetría, 98.- Cálculos, 98.- Experimental, 101).- Resultados obtenidos y comentarios, 101.- Bibliografía, 102.

VITAMINA C.....104

Antecedentes: Características biológicas, 104.- Características químicas y físicas, 106.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 108.- Método colorimétrico por oxidación con 2,6-diclorofenolindofenol, fundamento y comentarios, 110.- Técnica, 111 (Reactivos, 111.- Extracción y purificación, 112.- Colorimetría, 112.- Cálculos, 113).- Resultados obtenidos 116.- Determinación colorimétrica por formación de la osazona, fundamento y comentarios, 117.- Técnica, 119 (Reactivos, 119.- Extracción y oxidación, 119.- Copulación, 120.- Colorimetría, 120.- Cálculos, 120.- Experimental, 123.- Resultados obtenidos, 123.- Comentarios, 124.- Bibliografía, 125.

VITAMINA D.....127

Antecedentes: Características biológicas, 127.- Características químicas y físicas, 128.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 130.-

Técnica, 138 (Reactivos, 138.- Saponificación y extracción, 139.- Purificación, 140.- Segunda saponificación y extracción, 140.- Preparación de los standards, 140.- Espectrofotometría, 141.- Colorimetría, 141.- Cálculos, 141.- Experimental 143).- Resultados obtenidos y comentarios, 144.- Bibliografía, 145.

VITAMINA PP..... 146

Antecedentes: Características biológicas, 146.- Características químicas y físicas, 147.- Desarrollo del método de determinación: Determinación química y/o física en general y elección del método, 149.- Determinación colorimétrica por el bromocianuro-compuesto, fundamento y comentarios, 151.- Técnica, 154 (Reactivos, 154.- Extracción e hidrólisis, 155.- Purificación, 155.- Reacción y colorimetría, 156.- Cálculos, 157.- Experimental, 158).- Resultados obtenidos y comentarios, 160.- Bibliografía, 161

CUADRO DE RESULTADOS Y COMPARACION CON OTROS VALORES..... 163

CONCLUSIONES Y DISCUSION.....164

I INTRODUCCION

a) Prólogo

Se trata de determinar en este trabajo, por métodos químicos y/o físicos, la cantidad de vitaminas que concurren en ciertos tipos de algas del litoral atlántico argentino.

Los métodos de dosaje utilizados, o las adaptaciones que de ellos derivan, son los consagrados por la práctica analítica corriente en su aplicación a otros materiales polivitamínicos más o menos complejos.

Es muy posible que ellos sean susceptibles de una mayor disquisición y adaptación en cuanto a su aplicabilidad a las algas, tarea que el autor considera fuera del alcance del presente trabajo, a causa del actual estado de conocimientos sobre este material, relativamente nuevo en la tecnología.

El autor ha experimentado con anterioridad, y encontrado satisfactorios, los métodos de determinación usados para las vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C (indofenol) y PP; no así los restantes, que han sido seleccionados bibliográficamente.

Con este trabajo el autor entiende contribuir al conocimiento de un grupo de vegetales de grandes posibilidades energéticas, en momentos en que se contempla la situación alimenticia mundial con la preocupación derivada de que la población de la tierra aumenta en una proporción mayor que sus recursos alimenticios (*).

El aprovechamiento de los vegetales que crecen en el mar es un enorme recurso cuya magnitud no es actualmente del todo valorada, aún cuando en muchas partes del mundo se están realizando serios estudios sobre sus posibilidades.

En lo que se refiere a la utilización de las algas marinas en la alimentación de animales- alimentación humana indirecta- se puede mencionar que en las islas Orkney e Iceland las ovejás se alimentan exclusivamente de algas marinas durante la mayor parte del año.

En algunos países se va difundiendo el uso de harina de algas mezcladas con harinas de pescado y cereales, para la alimentación de animales domésticos.

En los Estados Unidos de Norteamérica se elaboran, con algas pardas,

productos concentrados como "Algit", "lanamar" y "neptuno" que se utilizan en la alimentación de aves de corral y mamíferos domésticos.

Las experiencias realizadas con cerdos, vacas, gatos y ovejas demostraron que las algas pardas pueden incorporarse a las dietas de estos animales durante meses sin que alteraciones en su salud, producción de lana, huevos o leche hayan sido notadas.

Experiencias posteriores parecen confirmar estas observaciones, siempre que se utilicen algas de bajo contenido en yodo, otros minerales y fibra cruda e incorporándolos a la dieta en proporciones no mayores del 15 %.

La utilización directa de las algas marinas como alimento del hombre data de muy antiguo, pero nunca ha alcanzado otra expresión que el consumo local, en escala relativamente reducida.

Sin embargo, en regiones densamente pobladas como Japón y otras islas del Océano Pacífico las cifras de consumo son elevadas.

En la costa de China, Filipinas e Indochina, Hawái e islas del Archipiélago Malayo más de 75 especies de algas forman parte de la dieta alimenticia, al estado fresco, desecadas, como extractos preparados con diversos condimentos o como productos obtenidos por fermentación.

En el Japón se consumen como alimentos diversas especies de *Porphyria*, *Gloiopeltis*, *Gracilaria*, *Laminaria*, *Undaria*, etc.

De algunas especies de *Laminaria* y *Alaria* se obtiene un producto desecado, el "kombu" o "koti", que se consume como las legumbres.

Otro alimento importante es el "wakame", obtenido de la *Undaria* primitiva.

En Europa y América el consumo directo de algas en la alimentación humana alcanza sólo expresiones reducidas: en Noruega, la harina de algas pardas se consume mezclada con harina de cereales en la fabricación del pan.- En la costa N.O. de Europa (la de Escocia, Irlanda, Francia, Islandia, etc.) se consumen diversas especies en ensaladas y sopas, o como legumbres o condimentos.

En el hemisferio sur el consumo también es reducido, teniendo importancia local en la alimentación de las poblaciones costeras de Australia, Nueva Zelanda y Chile.- La *Durvillea* (alga muy rica en alginatos) se vende en Chile con el nombre de "Ochoyuye", y de la utiliza como legumbre.

Según Chapman- "Seaweeds and their uses"- esto revela, más que la posi-

bilidad de la utilización de las algas como alimento, el hecho de que en esas regiones hay escasez de otros productos nutritivos.

No puede despreciarse sin embargo esta experiencia, ya que aún considerando que ello es efectivamente así demuestra que ante la necesidad de obtener alimentos las algas pueden ser una importante contribución a la resolución del problema.

(*) Los conceptos que siguen han sido extractados de " Las algas en la alimentación del hombre " (A. Fortunato, Ciencia e Investigación, Nº 12, 1958).

b) Conceptos generales sobre vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos que intervienen en la alimentación en cantidades mínimas, y son indispensables para regular el crecimiento, mantenimiento y reproducción normal de los organismos animales (se conocen algunas vitaminas vegetales), los cuales- sin excepción- son incapaces de sintetizarlas mediante procesos anabólicos que sean independientes del ambiente, con la excepción del aire.

No desempeñan papel energético o plástico, y deben considerarse como reguladores de las funciones normales- por mecanismos todavía desconocidos para algunas de ellas.

Todas las vitaminas conocidas, con la posible excepción de las vitaminas D, son sintetizadas por los vegetales y, hasta donde se sabe, son utilizadas por ellas para los mismos fines que los organismos animales.

Por otra parte, los compuestos producidos anabólicamente o catabólicamente por éstos, y que cumplen con las características que definen a las vitaminas, se clasifican como hormonas.

La aparente independencia del ganado para ciertos miembros del complejo B y para vitaminas K, es debido a la síntesis bacteriana en el rumen, lo cual no constituye un proceso anabólico.

Desde tiempos remotos arrancan observaciones de distintas enfermedades que, pasando los siglos, habrían de reconocerse como avitaminosis.

Las primeras observaciones dignas de ser tenidas en cuenta se deben a Casal y datan del año 1735.

El verdadero concepto de vitamina se debe a Hopkins quien, en 1907, se refirió al concepto catalítico de la acción vitamínica.

La iniciación del período químico, o el avance de la química en la vitaminología, se produce en 1911, en que Funk aisló lo que describió como la antiberiberi-vitamina.- Describió además la existencia segura de tres vitaminas (la nombrada, la antipelagrosa y la antiescorbútica) y una probable (la antirraquítica).

A partir de 1911, hasta 1925, se produce la diferenciación biológica de la mayoría de los factores liposolubles e hidrosolubles.

Entre los años 1931 y 1941- con los trabajos de las escuelas químicas de Kuhn (alemana), de Karrer (suiza) y de Williams (americana)- se llega a obtener sintéticamente la mayoría de las vitaminas que interesan

desde el punto de vista humano y a descubrirse una gran cantidad de factores vitamínicos aún no caracterizados químicamente, de importancia fundamental en el desarrollo de organismos de animales inferiores.

Actualmente, en que la industria provee vitaminas cristalinas químicamente puras, se tiende a demostrar que ese no es todo el camino a seguir, dado que en este estado no tienen la calidad biológica que aparece con frecuencia en los productos naturales en que se encuentran.

Hechos de esta índole son los siguientes:

Después de haberse localizado el factor vitamínico del crecimiento en la vitamina A, ha tenido que considerarse que la B₂, la D y la C son necesarias para que dicho desarrollo se realice.

Si para la visión es fundamental la vitamina A, se sabe también hoy que es de primer orden en esta función visual la presencia de lactoflavina, y que esta se comporta como sustancia fotodinámica solamente en presencia de vitamina C.

La vitamina K, que figura como antihemorrágica, se asocia a la C para una mayor eficacia.

Muchas vitaminas en estado natural poseen actividades mucho mayores, cuantitativamente; tal es el caso de la vitamina D obtenida por irradiación directa de la leche, la cual adquiere propiedades antirraquíticas superiores a la cantidad de vitamina D que en ella puede demostrarse.

Bibliografía

- Chemistry and Physiology of the Vitamins- Rosenberg H. R.- 1942.
 Vitaminas, métodos de dosificación- Villela G. G.- 1948.
 Vitaminas, farmacología y terapéutica- Velazquez L. B.- 1941.
 Curso de química biológica- Delefeu V. y Marenzi A.- 1953.

c) Comentarios generales sobre algas

Las algas son vegetales criptógamos, celulares, que viven en aguas dulces o salobres, o por lo menos en lugares muy húmedos.

Muchas veces son parásitos; con vegetación terminal o perisférica; de reproducción sexual o no.

Se las ubica en el mundo vegetal según criterios diversos.

Los antiguos consideraban como algas a todas las plantas que vivían en el mar.

Linneo reunió bajo el nombre de algas a las algas verdaderas, hongos y líquenes.

Su situación en el límite entre los reinos vegetal y animal ha sufrido desde entonces numerosas variaciones, y el dudoso conocimiento que aún se tiene acerca del desarrollo y reproducción de muchas especies hace muy difícil su clasificación en grupos secundarios.

En 1824 Agardh las dividió según su color en una forma que aún subsiste: hialinas, verdes, rojas y oliváceas.

En el sistema filogenético de Engler las algas se ubican en 5 divisiones de las 13 que incluyen a todo el reino vegetal:

División V : Conjugadas (Algas unicelulares, verdes, que crecen en pantanos y lagunas)

División VI: Olorofíceas (Algas uni y pluricelulares, verdes)

División VII: Carófitas (Algas pluricelulares, verdes, de agua salada o dulce)

División VIII: Feoíceas (Algas pluricelulares, pardas)

División IX: Rodofíceas (Algas pluricelulares, rojas, casi todas marinas)

Las algas se agrupan en ellas sucesivamente en órdenes, subclases, clases, familias, etc..

No presentan estructura diferenciada; sus organismos se hallan constituidos por células con clorofila y otros pigmentos, denominándose "talo" al vegetal completo.

El talo de las algas superiores se divide morfológicamente en: órganos de fijación o bulbo (especie de raíz adherida a la roca), estipe o varilla (especie de tallo) y lámina o fronda, que constituye el órgano de reproducción y absorción, elaboración y acumulación de sustancias nutritivas

En algunas especies se encuentran además los flotadores, órganos en forma de saco, llenos de gas, que se hallan implantados en la base de la fronda.

Están distribuidas a lo largo de las costas de los continentes; el desarrollo de las distintas especies está condicionado principalmente a la temperatura mínima media de las aguas superficiales, a las corrientes marinas, al grado de alcalinidad del agua, a la existencia de materiales nutrientes específicos de la especie, a la profundidad y, en menor grado, a las condiciones climáticas y geográficas de la zona.

En términos generales, en las zonas próximas a la superficie predominan las algas verdes y rojas de talla menuda, con una capacidad de adhesión muy desarrollada, y resistentes a la evaporación y bajas temperaturas.- En la región intercotidal predominan las algas pardas, acompañadas por algunas especies de algas verdes.- Es la zona de mayor importancia para la explotación.

En la zona eulitoral (línea de baja marea hasta profundidad de 15 metros) se encuentran principalmente algas pardas y rojas.

El crecimiento de las algas se efectúa ordinariamente por una sola célula terminal.

Las dimensiones varían extraordinariamente: desde ciertas *Bacterium* que miden micrones hasta las *Laminarias*, que llegan a tener 400 y 500 metros de longitud.

La composición química de las algas es muy variable, dependiente fundamentalmente del alga, de la época del año, de la profundidad del hábitat y de la parte del alga que se considere.

Como ejemplo de la gran variación a que está sometida la composición, véase la tabla que aporta H. Milner sobre el tema(1).

		Algas marinas	Algas agua dulce
Cenizas	% a seco	17,82-46,24	3,45-11,24
Sobre el resto:	" "	42,90-49,97	47,46-70,17
N	" "	6,09- 6,82	6,78- 9,96
N	" "	4,87- 8,80	1,43- 9,92
Proteínas	fd	30,4-55,0	7,3 -88,2
Carbohidr.	"	43,7 -69,6	5,7 -58,2
Lípidos	"	trans- 9,1	4,5 -85,6

Las algas pardas, que junto con las verdes son las más importantes desde el punto de vista humano, poseen como pigmento predominante la fucoxantina, además de clorofila, carotenos y xantofilas.

Las sustancias de reserva son la laminarina- polímero de glucosa y manitol que se absorbe perfectamente en los tractos digestivos animal y humano- y el manitol.

El contenido en laminarina (2 a 25 %) es máximo en los meses de primavera y mínimo en los de otoño e invierno.- El manitol varía también estacionalmente y con la especie (3 a 25 %), encontrándose los valores máximos en los meses de verano.- Existen además variaciones cuantitativas según las distintas partes del talo y de la estipa.

Entre los componentes de la pared celular existen la fucoídina, el ácido alginico, pentosanos y celulosa.- La fucoídina es un polímero de la fucosa (galactocelulosa), y su contenido varía entre 4 y 9 %, con los valores máximos en otoño.- El ácido alginico es un polímero del ácido D-manurónico.- Las variantes del contenido son también de gran amplitud: 2 a 25 %; varía estacionalmente en forma inversa a la laminarina y su magnitud está estrechamente vinculada a la profundidad.

Las algas verdes poseen clorofila a y b, xantofila y carotenos.- La sustancia principal de reserva es el almidón.- Infortunadamente son muy pocos los datos que provee la literatura sobre la composición química de este grupo que, por sus características, es el más semejante a los vegetales terrestres.

Las algas rojas en cambio han sido objeto de serios estudios.- Poseen los mismos pigmentos que las algas verdes y además ficoocianina y ficoeritrina.- Son algas de profundidad.

Las sustancias predominantes en este grupo son los ficooceloides, polímeros sulfatados de la galactosa como el agar-agar, la carragena y la iridomucina.

El contenido en ficooceloides es del 60 al 80 %, y como estos no se absorben en el organismo, estas algas son de poco interés alimenticio, si bien muy interesantes desde el punto de vista industrial.

El agar-agar se encuentra en una proporción del 15 a 35 %, siempre como componente de la pared celular.

Las algas azules son organismos microscópicos de escaso interés humano. Además de los productos mencionados, las algas contienen sustancias

proteicas y grasas en proporciones variables.

Las proteínas oscilan entre 7 y 8% sobre la sustancia seca orgánica, pero en general los valores son más bajos que el dato superior.- Lo mismo ocurre con los lípidos, que varían en las algas comestibles (enteras) entre 0,5 y 4% sobre seco.

Los aceites extraídos tienen por componentes principales los ácidos palmítico, esteárico, mirístico y oléico.- De la composición total de los aceites de algunas algas pardas (*Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*) los ácidos grasos representan el 50 al 72 %.

Una característica distintiva de la composición de las algas es su alto contenido en materias minerales; entre estas las más importantes son las que contienen potasio, sodio, iodo y bromo.

El contenido en potasio varía entre 0,5 y 2 %, presentándose cantidades mayores en la estipa que en la lámina.- El contenido en iodo llega en algunas especies al 0,5 % de la materia seca.

Por último, en las algas marinas se encuentran todos los complejos vitamínicos que son de importancia en la nutrición del hombre.

El contenido vitamínico varía en general con la especie, la estación y la profundidad del hábitat; el contenido de vitaminas B₁ y C disminuye con la profundidad.

La vitamina C llega a su máximo en los meses de primavera, verano y otoño, y en la mayoría de las algas comestibles el contenido varía entre 3 y 03 mgr./100 gr. de material fresco.

La vitamina B₁ se encuentra comúnmente en las especies verdes y pardas en cantidad que oscila entre 2 y 6 unidades Sherman/gr. de material fresco.

El ácido nicotínico alcanza en las algas pardas una mayor proporción que en otros organismos marinos: 60 a 85 mgr./gr. seco.

Para dar una idea global del estado actual de los conocimientos sobre las algas, se transcriben a continuación las conclusiones del artículo "Las algas en la alimentación del hombre" (A. Fortunato, Ciencia e Investigación, N° 12, 1958):

- 1º) Algunas especies de algas marinas se utilizan en la alimentación humana en su zona de producción.
- 2º) El valor nutritivo de las algas marinas varía grandemente según la especie, la época de cosecha y la zona de crecimiento del vegetal.
- 3º) El conocimiento de la composición química de las numerosas espe-

cies conocidas y su variación estacional está en desarrollo, y se trabaja activamente en diversos institutos en todo el mundo.

4º) la selección de las especies más aptas para la alimentación, y el momento oportuno para su cosecha, deberá hacerse en base a los resultados de estos estudios.

5º) Será necesario, además, tener en cuenta las investigaciones realizadas sobre el aprovechamiento por el organismo humano de los componentes hidrocarbonados y proteicos de las algas, dado que la naturaleza de las sustancias de esos grupos es en general diferente de las que utiliza el hombre en su alimentación corriente.

6º) Los conocimientos en este aspecto hasta ahora reunidos sobre la fracción nitrogenada de las algas son insuficientes para extraer conclusiones.

7º) En cuanto a la fracción hidratos de carbono, se sabe que las sustancias que son polímeros de la galactosa sulfatada (agar-agar, carragenina e iridoficina) no son similares, mientras que si lo son, en diferentes grados, la laminarina, nemital y alginatos.

8º) Como complemento de dietas, muchas especies de algas tienen valor por su riqueza en ciertos elementos minerales, que sobrepasa en mucho a la de otros alimentos conocidos.

9º) En la alimentación de animales domésticos, utilizadas en proporciones adecuadas, ofrecen mayores posibilidades que en la alimentación humana.

10º) Como abonos para la tierra, son utilizadas localmente desde hace mucho tiempo, pero las posibilidades reales son, a nuestro juicio, mucho mayores que las actuales, y faltan estudios más completos para determinar sus posibilidades de una mayor aplicación.

11º) Uno de los factores negativos para el desarrollo de la industria de las algas marinas, lo constituyen las dificultades de recolección, resueltas hasta el momento únicamente para la cosecha de algas pardas, gigantes.

12º) El cultivo de las algas no ha pasado por el momento de la etapa experimental y a lo sumo de manifestaciones locales como en el Japón.

13º) Deberán intensificarse los estudios relativos a la forma de vida y evolución de estos vegetales, para poder realizar su explotación racional y preservarlos de su destrucción.

14º) Las algas desecadas se conservan sin inconvenientes durante mucho tiempo y la desecación puede hacerse en condiciones poco rigurosas.

15º) En cuanto a las algas microscópicas cultivadas, constituyen un interesante motivo de estudio, ya que abren una nueva posibilidad de obtención de proteínas en lugares donde las condiciones locales no permiten obtenerlas de otros alimentos, pero habrá que resolver los problemas técnicos para su utilización en gran escala. "

Bibliografía

- La economía del mar.- Popovici Z. y Angelescu V.
(Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales, 1954, Tomo II.)
- Las algas en la alimentación del hombre.- Fortunato A.
(Ciencia e Investigación Nº12, 1958)
- Curso de Botánica General y Aplicada.- Gilg E. y Schürhoff P. M.
(Editorial Labor, 1942)

d) Antecedentes sobre el tema

La gran diversidad de especies, unida a la también grande individualidad de estos organismos en cuanto a composición química, impiden ofrecer este tópico en forma generalizada.

Los trabajos realizados, si bien numerosos, no llegan a configurar aún un cuadro general completo.

El autor ha creído conveniente ofrecer en cambio una escueta referencia bibliográfica de lo publicado por la revista Chemical Abstracts en los últimos 20 años que, como se verá, no es mucho.

1) "Contenido de vitamina B y C en algas marinas"

Norris E. R., Simeon M. K. y Williams M. B.
J. Nutrition 13, 425-33 (1937).

Se analizan varias especies de algas rojas, marrones y verdes, antes y después de secado y almacenaje.- Ciertas unidades de Porfiria, de la familia Rhacophyceae, tienen 0,30-0,60 mgr. de vit. C por gramo y 5,0-5,5 unidades Sherman de vit. B₁.- Casi todas las especies examinadas tenían 2,0-5,5 U. Sherman de vit. B₁, pero muchas sólo tenían trazas de vit. C.- Las algas que crecen en el litoral o en la superficie tienden a poseer un contenido de vitamina C mayor que las cosechadas a 5-10 brazas de profundidad.

2) "Vitamina C en algas marinas"

Lunde G. y Lie J.
Z. physiol. Chem. 254, 227 (1938).

La cantidad de vit. C determinada por actividad biológica y por titulación es la misma excepto para Rhodymania palmata (en este caso el valor biológico es 1/10 del químico).- El poder reductor total es sin embargo destruido por ascórbico-oxidasa.- Varias especies contienen entre 5 y 140 mgr./100 gr. seco.- Las cantidades dependen de la especie y de la estación.- Algunas de ellas son una buena fuente de ácido ascórbico.

3) "Utilización de las algas como alimento"

Lunde G.
Tek. Ukeblad 86, 549-553 (1939).- O.A. 35-2996⁶.

Se discute la distribución y características químicas de algas marrones de Noruega (O. A. 31-8747⁷)..- El contenido en caroteno es generalmen-

te de 100 mgr./mgr.; en *Fucus* y *Ascophyllum* más de 300 mgr./mgr..- Se encontró en *Laminaria saccharina* y *Alaria* entre 60 y 75 U.I./100 gr. fresco y 3000-4000 U.I./mgr. seco.- Otras algas contienen menos.- En cuanto a vit. B₂, *Laminaria* contiene 6-10 mgr./mgr. desec; otras especies, más.- De vit. C se encontró generalmente 20-60 mgr./100 gr. en *Fucus*, pero ocasionalmente más de 100.- La cantidad de vitamina D es insignificante.

- 4) "Crecimiento y vitamina B₁ en algas de agua dulce, en distintas condiciones".- Witsch H.V. (Univ. Gottingen).
Naturwissenschaften 33, 221 (1946).

El contenido de vitamina B₁ varía entre 1 y 18 mgr./mgr. seco.

- 5) "La producción de vitamina D en el mar"
Johnson N. G. y Levring T.
Svenske Hydrografisk Biol. Komm. Skrifter.- Ser.3,1,Nº 3, pág 7
(1947).-(en inglés).

Fue determinado el contenido de vitamina D en algas superiores.- *Enteromorpha intestinalis* y *Laminaria saccharina* no produjeron efecto antirraquítico alguno; *Fucus vesiculosus* correspondiente sólo a 5 U.I.- Algunas algas que crecen cerca de la superficie, y son irradiadas, tienen actividad moderada.

- 6) "Vitamina C en plantas"

Takaoka M., Ishihara Y., Matsubara R. y Samie K., Ando Y. y Ono T.
Science (Japón) 18, 368 (1948).- O.A. 42-6949 b.

Se usa ascorbico-oxídase como blanco.- El contenido de vitamina fue paralelo al de fucoxán y de un aceite esencial de olor especial, en algas marrones.

- 7) "Estudio fisiológico del contenido de vitamina C en algas marinas"
Tsuchiya Y.
Tohoku J. Agr. Research.- 1, 97 (1950).

El contenido en vit. C de algas marinas es influenciado por el ambiente físico-químico exterior en la misma forma que las plantas verdes superiores.

- 8) "Vitamina C aparente en algas (y hojas de plantas alpinas)"

Takaoka M., Matsubara R. y Nakamura T.
Science (Japón) 19, 182 (1949).

Se usa el método con indofenol y el potenciométrico con IO_3K 0,001 N.- Ambos métodos coinciden.- Se analizaron 18 especies de algas.- Para 12 de ellas, en cambio, los datos potenciométricos son aproximadamente la mitad de los datos obtenidos por indofenol (*Dictyopteris divaricata*, *Dictyota dichotoma*, *Sargassum thumbergii*, etc.).

9) "Contenido de vitamina C de algas marinas de Hokkaido"

Ishihara Y., Umamoto H. y Matsubara Y.

Mem. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 1, 83 (1951)

Se utiliza el método del indofenol.- Es poco en 2 especies de Chlorophyceae y en 15 especies de Rhodophyceae (4-65 mgr. %), y mucho más en 14 especies de Phaeophyceae (*Dictyopteris divaricata* 808, *Sargassum miyabei* 422, *S. confusum* 388 y *S. thumbergii* 309 mgr. %).- El contenido cambia marcadamente si las algas han estado en agua marina, pero disminuye rápidamente cuando son expuestas a la lluvia y al aire, y alcanza un máximo en el día hacia mediodía y tarde, y un mínimo en la mañana y noche.

10) "La composición de las algas.- I El contenido en vitamina B_2 "

Tanjinia M., Tabei K y Wada T.

J. Agr. Chem. Soc. Japan 26, 11-13 (1952).

Se usó el método por formación de lumiflavina.- Se remueven mecánicamente las sales de la superficie, se seca a 100 °0., se pulveriza, se extrae con agua caliente (o MeOH 30 % o SO_2 0,25 N) y se diluye hasta 0,1-0,3 mgr./ml., luego de lo cual se fotoliza durante 2 horas.

<i>Hijikia fusiformis</i>	100 mgr.	% a/seco.	
<i>Undaria pinnatifida</i>	210 y 1000	" " "	, s/2 muestras.
<i>Alaria crassifolia</i>	1000	" " "	
<i>Laminaria japonica</i>	810 y 94	" " "	" "
<i>L. ochotensis</i>	690	" " "	
<i>L. fragilis</i>	1000	" " "	
<i>L. religiosa</i>	360	" " "	
<i>L. angustata</i>	860	" " "	
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	450	" " "	
<i>Porphyria tenera</i>	2300-2800-3700	" " "	" 3
<i>Enteromorpha linza</i>	2500	" " "	
<i>E. intestinalis</i>	270	" " "	

11) "Ascórbico total en algas"marinas"

Cresc'h P. y Barand J.

Comp. rend. soc. biol. 148, 105-7 (1954).

Se basa en la combinación del ácido dicetogulónico con p-sulfofenilhidrazina.- Se discute la efectividad del método indofenol.- Se analizan 17 especies de algas verdes, marrones y rojas, en sus partes constitutivas, y se encuentran valores que van de 3 a 135 mgr./ 100 gr. frescos.

12) "Cambios de vitamina B₁ en algas, según condiciones fisiológicas, luz, etc."

Gerds G.

Arch. Microbiol. 16, 53 (1951).- Chem. Z. 1952, pág 1209.

Se encuentra 0,3- 10,5 mgr./gr. seco en 6 especies de agua dulce; 31 especies de los mares del Norte y Báltico y 10 cultivos puros; un 70 % de todos los valores osciló entre 1 y 6 mgr./gr. seco.- No hay variación entre Mayo y Agosto.- Algas jóvenes y tejido meristemático son ricas en vitamina B₁.- En Fusus hay un decrecimiento uniforme en el contenido de vitamina por 5-9 días, seguido de un decrecimiento, con un máximo correspondiendo aproximadamente al punto de inflexión de la curva de crecimiento.

En general la iluminación tiene efecto negativo, y la oscuridad positivo, en el contenido de B₁.

--0--

Un buen cuadro de valores se ofrece en J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 36, 196 (1949), por Mc Outcheon R., Arrigoni L. y Fisher L.- Los métodos son microbiológicos excepto para vitamina B₁ y C, y carotenos.- Estos resultados, para tres especies de algas, han sido tabulados en la parte III de este trabajo como valores de comparación.

II DETERMINACION DE VITAMINAS EN ALGAS ARGENTINAS

Las algas tratadas en este trabajo han sido seleccionadas entre la gran variedad de especies que existen naturalmente en el litoral atlántico argentino, en base a su accesibilidad y profusión.

Con ellas:

I *Macrocistis pyrifera*

II *Lessonia flavicans*

III *Lessonia fassia*

IV *Irídica laminaroides*

V *Irídica cordata*

En lo sucesivo serán mencionadas según el número romano aquí adjudicado.

El producto ha sido cosechado en el bimestre Abril-Mayo del año 1954, en la zona de Puerto Deseado, por obra del Instituto Tecnológico Nacional; el tratamiento al cual fueron sometidas las muestras es: secado en la zona de recolección por exposición al aire, a la sombra, y envasado posterior.

Si bien dicho tratamiento no es el más adecuado para una ulterior determinación cuantitativa de vitaminas, el autor entiende que es de gran valor práctico la obtención de datos que configuren una idea del contenido vitamínico del material, en la forma en que éste puede ser obtenido en el país en cantidad y a bajo costo.

Los datos se ofrecen sobre muestra "tal cual" y sobre muestra "anhidra", entendiéndose por la segunda expresión el material secado al vacío, a 45 ° C., durante 24 horas.

Por este método, los valores de humedad obtenidos fueron: I 18,0 % II 11,0 %; III 9,9 %; IV 11,9 %; V 12,1 %.

Para cada una de las vitaminas se sigue el siguiente desarrollo:

- A) Antecedentes
 - a) Características biológicas.
 - b) Características químicas y físicas.
- B) Desarrollo del método de determinación.
 - a) Determinación química y/o física en general y elección

del método.

- b) Método: fundamento y comentarios.
- c) Técnica.
- d) Resultados obtenidos y comentarios.
- e) Bibliografía.

Bibliografía general:

Chemistry and Physiology of the Vitamins; Rosenberg H. R.- 1942.
 Vitaminas, métodos de dosificación; Villela G. G.- 1946.
 Vitamin Methods; ed. by P. György, Tomo I,-1950.
 Vitaminas, Farmacología y Terapéutica; Velasquez L. B.- 1941.
 Farmacopea de los Estados Unidos de América XIV.
 Análisis de Alimentos; Winton A. L y Winton K. B.- 1958.
 Colorimetric methods of analysis; Snell F. D. y Snell C. T.(III) 1953.
 Colorimetric Analysis; Allport N. L. y Keyser J. W.- 1957.
 British Pharmacopeia; 1953).
 Methods of Vitamin Assay; The Ass. of Vit. Chem. Inc.- 1947.
 The Vitamins in Medicine; Bicknell F. y Prescott F.- 1948.

VITAMINA A

La vitamina A se llama también antixeroftálmica, anti-infecciosa, axerofтол, epitelio-protectora, biosterol, oftalamina, y otros.

A) Antecedentesa) Características biológicas.

Su acción en el organismo puede ser apreciada cuando se estudian estados de carencia.

En general, se observan lesiones y manifestaciones tisulares típicas.

Los epitelios de origen endodérmico o ectodérmico, como la piel, el sistema nervioso y la retina, son afectados primordialmente.

Esos tejidos son sustituidos por epitelio queratinizado, estratificado, sin modificación de las células basales, las cuales—por administración de la vitamina—proceden a sustituir al epitelio queratinizado.

También integran el síndrome de privación algunas alteraciones en el aparato digestivo, de tipo rápido, caracterizadas por la casi anulación de la secreción clorhídrica y la aparición —hacia el sexto u octavo mes de carencia, en ratas—de un cuadro de distrofia general.

La nemiropia, ceguera nocturna a la cual acompañan siempre alteraciones en la adaptación visual, es cronológicamente el primer síntoma de carencia.

La vitamina A desempeña además un importante papel en la protección contra las infecciones, probablemente a causa de que en avitaminosis, los trastornos epiteliales disminuyen la resistencia local a los gérmenes.

Otro tipo de alteraciones se pone de manifiesto en la disminución del crecimiento, del sentido genésico y de la fecundidad.

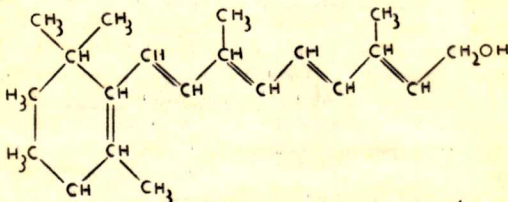
La necesidad diaria de un organismo normal ha sido estimada en 5 mgr., expresados como β -caroteno. Ello equivale a 8.330 Unidades Internacionales (U. I.).

La hipervitaminosis (10 a 15 mgr. diarios) dá lugar a un cuadro general de adelgazamiento, caída del pelo, degeneración grasa del tejido pulmonar y del hepático, desmineralización y otros.

b) Características químicas y físicas.-

La fórmula química ha sido establecida por Karrer, Morf y Schöpp en 1931 (1) (2).- Poco mas tarde Holmes y Corbert la obtienen sintéticamente, en forma cristalizada (3).-

La fórmula, que fué posteriormente confirmada (4), corresponde a un polieno alcohol:



Esta constitución química se denomina: 6-(2-2-6-trimetil Δ^6 ciclohexenil)-3,7-dimetil- $\Delta^{1,3,5,7}$ octatetraen- α -carbinol; o 3-7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-4-6-8-nonatetraen-1-ol.-

El núcleo cíclico es una β -ionona, en la cual la variación de la ubicación de la doble ligadura determina la pérdida de las propiedades vitamínicas.-

La cadena larga lateral, de tipo fitólico, le confiere la liposolubilidad.- La gran capacidad de reacción de esta cadena no saturada determina su labilidad a la oxidación.-

Se presenta como un aceite amarillo pálido y viscoso.- En los concentrados el color es rojizo por la presencia de impurezas.-

Es soluble en aceites vegetales y animales, alcohol y éter etílicos, cloroformo, sulfuro de carbono, isopropanol, hexano y en general en los solventes de las grasas.- En agua es insoluble.-

Recientemente se han producido formas esterificadas hidrosolubles.- Cristaliza de metanol en placas color amarillo pálido, conteniendo solvente de cristalización, que funden a 8 $^{\circ}\text{C}$., ebullen a 120-130 $^{\circ}\text{C}$. a 0,001 mm Hg..-

Tiene una densidad de 0,948 25/4 gr./ml.-

Posterior cristalización de formiato de etilo o propilenglicol produce cristales puros de P.F. = 63-64 $^{\circ}\text{C}$ y P.Eb. = 120-125 $^{\circ}\text{C}$ 5x10³ mmHg.-

Es muy sensible a la luz y a los agentes oxidantes, siendo estable en atmósfera inerte y en soluciones oleosas.-

Los ésteres son mucho mas estables que la forma alcohólica.-

La vitamina natural es estable al calor en atmósfera inerte, no así la cristalina, que se destruye.-

No posee actividad óptica.-

Tiene un máximo de absorción en la zona ultravioleta del espectro, a 325-328 mμ, con un $E_1^{1\%}$ de 1.725.- Al tratarse el dosaje espectrofotométrico se verán mas detalles sobre este particular.-

Por acción de la luz ultravioleta (Hg.) produce fluorescencia verde (5), que ha sido usada como método de dosaje (6).-

Por acción del Cl_3Sb en medio clorofórmico, produce una coloración azul fugaz, que absorbe en el espectro visible, a 620 mμ.- Esta reacción es la base del método de Carr-Price para su determinación cuantitativa, y será tratada mas adelante.-

Reacciona con otros elementos para dar una gama variada de colores: Cl_3Sb y Cl_3Sn producen color azul; Cl_3Fe rojo fluorescente; Cl_3Al rojo violado; Cl_3Si rosado y Cl_3PO un azul fugaz que pasa al rojo.-

Produce también color azul con ácido fosfomolibdico y con glicerina 1-3 diclorohidrina (7).-

La vitamina A se presenta también bajo otras formas.-

La vitamina A_1 , en los pescos marinos, es la más conocida; algunos aceites de pescado contienen hasta 700,000 USP-unidades/gr. (1 unidad USP = 1 unidad internacional -U.I.- que equivalen a 0,6 mgr. de β -caroteno).-

La vitamina A_2 (8), en los pescos de agua dulce, tiene dos carbonos más en la cadena lateral.- Posee un máximo de absorción entre 345-350 mμ y el color con Cl_3Sb tiene el máximo a 691 mμ.-

La vitamina A_3 (9) ha sido encontrada en aceites de pescados, mamíferos preferencialmente.-

Una cuarta forma de vitamina A ha sido aislada del aceite de hígado de tiburón y se denomina sub-vitamina A, con un máximo de absorción a 290 mμ.- (10)

Robeson y Baxter (11) han demostrado que existe un isómero natural de la vitamina A -estéreo isómero-, llamado neo-vitamina A cuya única diferencia es de orden físico (P.F. = 59-60 °C.).-

Se supone que se trata de la forma cis de la más conocida, y existirían juntas en una relación mae A/A de 30/70.-

Se ha aislado además la anhidro-vitamina A, en forma cristalina, por tratamiento de la vitamina A con ácido oleumírico o Cl_3SO_2 .- Tiene un máximo de absorción a 371 m/ μ con $\text{E}_{1\%}^{1\text{cm}}$ 3650; además tiene alguna actividad biológica (12).-

Todas ellas tienen anchas bandas de absorción con máximos en las siguientes longitudes de onda:

Vitamina A	328 m/ μ	(13)(14)(15)
Vitamina A ₂	345-350 m/ μ	(16)(17)
Vitamina A ₃	285-290 m/ μ	(16)(17)
Subvitamina A	290 m/ μ	(18)(19)
Neovitamina A	328 m/ μ	(20)

También se han descrito otras dos formas que se encuentran en el mismo animal: la hepatovitamina, forma de reserva estable, y la hemovitamina, forma inestable de circulación, que resulta por liberación progresiva de la primera.- (21)

La unidad internacional es la actividad biológica de 0,6 mgr. de β -caroteno.- (*)

1 U.I. equivale a 1 unidad U.S.P. y a 1,5-2 unidades Sherman.-

Un gramo de vitamina A corresponde a 4,500,000 U.I.

Diez unidades biológicas equivalen a 125 mgr. de β -caroteno y a 206 unidades internacionales.-

Una Unidad Anul equivale a 60 U.I.-

B) Desarrollo del método de determinación.-a) Determinación química y/o física en general y elección del método.-

Existe una gran cantidad de reacciones coloradas que han sido usadas para la determinación cuantitativa, en los últimos 25 años.-

En general se basan en tres tipos de reacciones: con fenoles, con ácidos y con cloruros inorgánicos.-

Las reacciones con fenoles se circunscriben fundamentalmente al color azul producido por los aceites de pescado, que contienen vitamina A, con picrogalol (22).- La reacción fúndica ha sido en general utilizada en combinación con las otras dos (23).-

En cuanto a las reacciones con ácidos, ya la Farmacopea Alemana de 1882, indicaba la coloración azulada que desarrollan los aceites de pescado con ácido sulfúrico, pero solo en 1920 el hecho fué relacionado con la presencia de vitamina A en ellos.-

Se ha investigado el efecto de otros ácidos: PO_4H_3 (24), molibdeno-rearftingsticos (25) y clóricos, en presencia de fúmel y guayacol (23).-

La reacción con cloruros inorgánicos ha sido aplicada a Cl_3As , y otros cloruros citados precedentemente (26)(27), y ensayada por Carr-Pries en 1925.-

El uso de Cl_3Sb en medio clorofórmico provee el método más utilizado actualmente, al cual se adoptó en el presente trabajo, junto con el método espectrofotométrico.-

Uno de los mayores inconvenientes del mismo, la fugacidad del color, condujo a la búsqueda de otro método a Sobel y Werbin (7), quienes comprobaron que la vitamina A produce una coloración azul con 1-3 diclorohidrina activada, que pasa a un violeta estable entre los 2 y 10 minutos de producción; no obstante esa gran ventaja tiene el inconveniente de ser poco sensible y requerir corrección para el caroteno.-

Entre los métodos físicos se incluye la medición de la absorción de las soluciones de vitamina A, a 325-328 $m\mu$, cuyas características serán comentadas más adelante al tratarse el mismo.-

Esta técnica sólo puede usarse en soluciones puras o en extractos convenientemente purificados.-

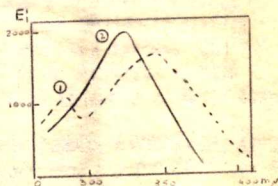
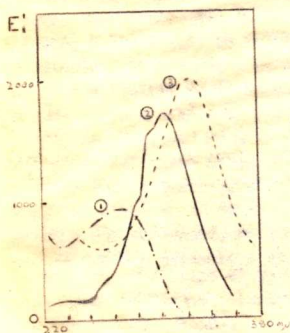
El método fluorimétrico mide la fluorescencia que se produce cuan-

do la vitamina A es excitada por luz ultravioleta (zona de emisión del mercurio) (5)(6), pero cuantitativamente no ha tenido aceptación.

La vitamina A_2 produce, en condiciones similares, una fluorescencia de color rojizo.

En ambos casos la luz emitida se hace posible a expensas de la concentración de las vitaminas, que se destruyen.

Curvas de absorción de Vitaminas A.



- 1) Vitamina A_2 .
- 2) Vitamina A.

- 1) Fracción rica en A_2 de aceite de hígado.
- 2) A crist. en etanol.
- 3) Fracción rica en A_2 de aceite de hígado.

b) Método colorimétrico según Carr y Price.

Fundamento y comentarios.

El método se basa en la medida del color azul, fugaz, que se produce por acción del Cl_2 sobre la vitamina A, ambos en solución cloroformica, cuya duración oscila entre 7 y 10 minutos.

El máximo de intensidad se obtiene a los 4 minutos.

La densidad óptica medida a $620\text{ m}\mu$ es una función lineal de la concentración de vitamina A en el medio, pero sólo en bajas concentraciones (hasta 100 unidades internacionales por ml.).

No existen teorías definidas y/o satisfactorias que expliquen el mecanismo de la reacción.

Como ya se dijo, es el método más usado actualmente para el dosaje; principalmente para las fuentes impuras existe una bibliografía muy extensa, y sobre todo en relación a su aplicabilidad a los aceites de pescado.- Se han hecho estudios exhaustivos referente a la influencia de inhibidores de la reacción y de interferencias, con motivo de lo cual existen tablas de los mismos (29)(30)(31)(32)(33).

Así, la presencia de ácidos nítrico y acético disminuyen poco la intensidad del color azul.- El ácido sulfúrico produce una coloración roja que vuelve imperceptiblemente al azul y el ácido clorhídrico disminuye el color en un 60 %.

Entre los solventes, metanol, etanol, isopropilalcohol, isobutanol, alcoholes amílico primario y secundario, acetato de amilo, éter, acetona, xileno, etc. modifican el color.

Aceites esenciales (geraniol, terpineol y otros) modifican el color, o producen color propio.

Lo antecedente no significa una desventaja de la reacción frente a otras, sino que ha sido estudiada a fondo en este aspecto.

La saponificación de los aceites, u otro tipo de muestra, seguida de una extracción etérea es la técnica universalmente adoptada para la eliminación de interferencias extrañas y de las que acompañan a la vitamina en el insaponificable.

Esta práctica arroja un balance satisfactorio aún cuando la forma alcohólica produce una intensidad de color dos veces menor que la que da la vitamina esterificada (34).

Oser, Melnick y Pader (35) proponen algunas modificaciones para adaptar la técnica a la determinación en alimentos:

- 1) El uso de un standard interno para corregir el efecto debido a inhibidores, interferencias y variantes de temperatura y reacti
- 2) Una lectura suplementaria a 720 m μ , para corregir turbides que puede ocurrir durante la formación del color azul.
- 3) Lectura suplementaria a 620 m μ , sin la adición de Cl_2 , para corregir de colores extraños provenientes del insaponificable.

La causa más común de interferencia la constituye la presencia de carotenoides, que en general acompañan a la vitamina y producen coloración azul con el reactivo; la saponificación y extracción etérea no los separa y se han propuesto para su eliminación técnicas cromatográficas.

Estas técnicas utilizan columnas de adsorción de hidróxido de magnesio, gel de aluminio, óxido de magnesio y meclas de este último con carbonato, Kyflo-Super-Gel y otros.

La adsorción en OM_{β} -Kyflo-super-gel ha dado, aparentemente, buenos resultados (36)(37) en lo que respecta a especificidad y aplicabilidad.

Tiene sin embargo el inconveniente de que se tiene que seguir la marcha de la vitamina por la columna mediante el uso de una lámpara de luz ultravioleta con lo cual se produce en la zona una mancha fluorescente típica y ello reduce en pérdida de la misma.

Esta técnica ha sido ensayada por el autor y la ha encontrado en general difícil; además la retención de vitamina por la columna no ha sido total y ni siquiera regular, lo cual hubiera permitido su uso mediante una standardización rigurosa. Es probable que el fracaso se deba a la calidad del material adsorbente.

La determinación de β -caroteno por medición de la absorción a 440 m μ , antes de la colorimetría es evidentemente poco específica, por lo cual sólo puede ser usada en análisis de rutina.

Otro método de separación, preconizado por Bayar, Phillips y Smith (38), incluye la precipitación del caroteno por alcohol etílico absoluto a baja temperatura.

Un procedimiento simple para la corrección del color producido por los carotenos (particularmente β -caroteno) se basa en el hecho, comunicado por Oser, Melnick y Pader (35), de que el máximo de color ocurre a los 4 segundos con un decrecimiento posterior rápido para la vitamina A, y una duración de por lo menos dos horas en el caso del β -caroteno.

Esta técnica será utilizada en el presente trabajo, pues evita el

procedimiento cromatográfico muy elaborado, con muy buenos resultados.

Esta técnica es aplicable a muestras con bajo contenido en caroteno.

Un inconveniente serio de la reacción de Carr y Price estriba en la fugacidad de la duración del color azul.

Han sido propuestas muchas técnicas que tienen como fin la eliminación de este inconveniente; en general se basan en el agregado de sustancias que prolongan la duración del color.

Tales con el agregado de catecol (39), guayacol (40), anhídrido acético (41) y otros.- la más usada es la reacción de Bointhal y Erdelyi (42) con pirocatequina, que produce una coloración azul que pasa al violeta rojizo intenso y es estable; no obstante, tiene la desventaja de que no se realiza en frío y además produce derivados coloreados con los esteroides.

Una solución práctica satisfactoria consiste en producir el color en la misma caba de lectura, con lo cual se alcanza a determinar el máximo con cierta exactitud.

El autor usó para ello un fluorofotocolorímetro Lumetron modelo 402EF, prescindiendo del sistema de compensación interna; la lectura directa - en la escala del galvanómetro de espejo - del máximo de intensidad puede así, en el mínimo de tiempo requerido, ser completada sin dificultad.

Para descontar los valores correspondientes a la reacción de los carotenos, se hará una lectura de absorción a la hora de agregado el reactivo (Absorción residual).

c) Técnica1) Reactivos

Hidróxido de potasio alcohólico N/2: disuelva 28,0 gr. de perlas de HOK en 1000 ml. de etanol.- Prepare la solución diariamente.

Éter dietílico: debe ser libre de peróxidos.- Agregando a 20 ml. de éter 5 ml. de una mezcla por partes de una solución acuosa de IK al 50 % y una alcohólica de fenoltaleína al 1 %, no debe producirse color rojo.

Sulfato de sodio anhidro, granular: No debe retener vitamina A. Agite 5 gr. con 50-100 ml. de éter dietílico conteniendo 100 U.I. de vitamina A.- Decante el éter y lave tres veces con porciones de 10-15 ml. de éter dietílico.- Identifique la vitamina A en el residuo, agregando 2-3 ml. de reactivo de Carr-Price.- Debe permanecer incoloro.

Hidróxido de potasio N/2: disuelva 28,0 gr. de perlas de HOK en 100 ml. de agua destilada y diluya a 1 litro.

Solución estándar de vitamina A (St.): Disuelva en cloroformo vitamina A de potencia conocida, en forma tal de obtener una solución de 35 a 40 U. I./ml.- Si es un éster, proceda según 2).-

Nitrógeno: libre de oxidantes.

Cloroformo: debe estar libre de humedad y reagentes.- Lave con agua destilada, seque 12 horas sobre CaH_2 anhidro y destile.- Desprecie el 20 % del destilado inicial y final.

Reactivo de Carr-Price: pese un frasco cerrado de Cl_2 y vuelque el contenido en cloroformo; pese por diferencia la cantidad usada y agregue cloroformo hasta obtener una solución al 25 %.- Si se produce turbidez, filtre lo más rápidamente posible.- Agregue 10-15 ml. de anhídrido acético por cada litro de reactivo.- Conserve la solución en cámara fría, al abrigo de la luz y de la humedad ambiente.

2) Extracción y purificación

Toda la extracción se llevará a cabo en material de vidrio anti-actínico (en su defecto debe preservarse la vitamina de la acción de la luz).

Pese 10-15 gr. de muestra; pásela a un erlenmeyer de 125 ml., con junta esmerilada para adaptar refrigerante, y agregue 25 ml. de potasa alcohólica N/2.- Adapte el refrigerante y caliente sobre baño de agua

a 100 °C. durante 30 minutos (Nota 1).

Pase el contenido a una ampolla de decantación de 125 ml. y lave el erlenmeyer y el residuo con dos porciones de 5 ml. de agua destilada, y luego con 25 ml. de éter.- Pase todos los lavados a la ampolla.

Extraiga la fase hidroalcohólica y pase el extracto etéreo a una ampolla de decantación de 250 ml.

Repita 8 veces esta operación, usando cada vez 25 ml. de éter.

Lave el extracto etéreo con 25 ml. de H₂O M/Z (acuosa) (Nota 2).

Descarte la fase acuosa y lave nuevamente el extracto etéreo con porciones de 25 ml. de agua destilada, hasta que los lavados no den reacción alcalina con solución alcohólica 1 % de fensulfatadina.

Agregue 5 gr. de SO_4Na_2 anhidro y agite para eliminar el agua de emulsión; deje acumular el SO_4Na_2 a un costado de la ampolla y pase parte del extracto a un vaso de precipitados de 100 ml.

Evapore el éter sobre baño de agua a 100 °C. con corriente de nitrógeno hasta reducir el volumen a 10-15 ml.

Repita la operación hasta que todo el extracto se concentre a ese volumen.- En ningún momento deje llegar a sequedad. (Nota 3).

Evapore el concentrado final en frío, bajo abundante corriente de nitrógeno (Nota 3).

Disuelva lo antes posible (Nota 3) el residuo en 15 ml. de cloroformo, agitando suavemente para disolver y estabilizar, si es necesario.

Pase el total a probeta o matras aferado de 25 ml. y llene a 25 ml. con cloroformo, usando para ello los lavados del vaso de concentración. Homogenice muy bien.

Nota 1: La saponificación es necesaria para separar la vitamina de sus combinaciones e interferencias, pero no debe prolongarse más allá de 30 minutos pues un exceso puede producir pérdida.

Nota 2: El lavado alcalino tiene como fin transferir los ácidos grasos liberados por la saponificación, solubles en éter, en sales solubles en la fase acuosa.- Estos serán eliminados del sistema por los lavados posteriores.- Los ácidos grasos interfieren en la colorimetría.

Nota 3: Debe hacerse así para prevenir cualquier posibilidad de oxidación o destrucción.

3) Reacción y colorimetría.

Se usa para la medición del color un colorímetro lumetron modelo 402EF (fluorofotocolorímetro), con filtro 620.

Se prescinde del uso del circuito de compensación, verificándose la lectura de absorción en base a la escala del galvanómetro.- la fugacidad del color no da tiempo para la lectura completa.

La colorimetría se hace agregando a 2 ml. de solución cloroformica de standard y muestras, 9 ml. de solución reactivo, en el mismo tubo de lectura y con las fotocélulas conectadas al galvanómetro desde el comienzo del agregado.

Se anota la mínima deflexión.

Para agregar el reactivo dese una bureta automática de escurrimiento rápido, con depósito cerrado; dispóngase de forma tal que el mismo se deslice por las paredes del tubo, para evitar la formación de burbujas y turbellinos, los cuales influyen en la lectura.

Ajuste la sensibilidad del aparato en forma tal que el 100 % de transmisión con la reacción de 2 ml. de cloroformo (descuento del color propio de los reactivos) corresponda a lecturas del standard de aproximadamente 90 *de/b escala*.

Para cada muestra y standard se hará una colorimetría con 2ml., y 1 ml. y 1 ml. de standard; y 9 ml. de cloroformo más 2 ml. de muestra se usará para descontar el color propio de la muestra.

Todas estas normas se encuentran descritas y resumidas en el cuadro de la parte experimental (Punto 5 de esta técnica).

4) Cálculo

Las lecturas de transmisión (T) se transforman en su equivalente en absorción mediante la fórmula:

$$A = \text{Log. } 100 - \text{Log. } T$$

La escala del espectrofotómetro Beckman modelo D U permite leer directamente las equivalencias.

Los resultados se hallan según la fórmula:

$$\frac{A \times 1000}{A_{std}} = \text{U.I. de Vitamina A/ gr. de muestra.}$$

donde:

A_m es la absorción de la muestra.

A_{st} es la absorción del standard.

C_{fm} es la concentración final de la muestra.

C_{fst} es la concentración final del standard.

Cálculo de las concentraciones finales:

C_{fst} : se pesaron 0,0712 gr. de aceite de potencia conocida, que contiene 500000 U.I./gr.

$$\frac{0,0712 \times 500000}{100} = \frac{10}{100} = 35,6 \text{ U.I./ml.}$$

C_{fm} : se introducen en el proceso, desde la saponificación, 10 ml. del standard anterior para calcular el factor de extinción.

Este nuevo standard tendrá una concentración final:

$$\frac{35,6 \times 10}{250} = \frac{250}{20} = 17,8 \text{ U.I./ml.}$$

C_{fm} : en todos los casos, la pesada de muestra -10,0 gr.- se diluyó como sigue:

$$\frac{10,0}{250} = \frac{250}{20} = 0,50 \text{ gr./ml.}$$

Muestra	Pesada (gr.)	Conc. final (gr./ml.)
I	10,0028	0,5001
II	10,0004	0,5005
III	10,0006	0,5000
IV	10,0093	0,5005
V	10,0017	0,5001

	Cantidades tomadas, en ml.								Programa de Transmisión				Promedio de Transmisión				Promedio de Recepción				Total	A Final	Recal- tado
	Standards		Muestras					Reactivos		Básica		Residual		I ₁ , I ₂ , I ₃		I ₄ , I ₅ , I ₆		A ₁ -A ₂	A ₃ -A ₄				
	St	St1	I	II	III	IV	V	Cl ₃ OM	Cl ₃ Sb	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	A ₁	A ₂						
Boo	.	.	.	.	.	.	.	2	9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
St.	2	.	.	.	.	.	.	.	9	45,0	45,0	100,0	100,0	45,0	100,0	0,345	0,000	0,345	0,345				
	1	.	.	.	.	.	.	1	9	67,0	67,0	100,0	100,0	67,0	100,0	0,174	0,000	0,174	0,174				
	2	.	.	.	.	.	.	9	.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,000	0,000	0,000	-				
St ₁ .	.	2	.	.	.	.	.	.	9	70,5	69,5	100,0	100,0	70,0	100,0	0,155	0,000	0,155	0,155				
	1	1	.	.	.	.	.	.	9	56,0	56,0	100,0	100,0	56,0	100,0	0,250	0,000	0,076	0,076				
	.	2	.	.	.	.	.	9	.	100,0	-	100,0	100,0	100,0	100,0	0,000	0,000	0,000	-				
I	.	.	2	.	.	.	.	.	9	40,0	40,5	97,0	97,0	40,5	97,0	0,393	0,013	0,380	0,340	77,9			
	1	.	1	.	.	.	.	.	9	46,0	48,0	98,0	98,0	48,0	96,5	0,319	0,007	0,312	0,218	77,0			
	.	.	2	.	.	.	.	9	.	91,0	-	100,0	100,0	91,0	100,0	0,040	0,000	0,040	-				
II	.	.	.	2	.	.	.	.	9	59,5	59,0	98,0	98,0	59,5	98,0	0,225	0,009	0,216	0,206	47,2			
	1	.	.	1	.	.	.	.	9	50,5	51,0	99,5	98,5	50,3	99,0	0,299	0,005	0,284	0,105	48,1			
	.	.	.	2	.	.	.	9	.	98,0	-	100,0	100,0	97,5	100,0	0,010	0,000	0,010	-				
III	.	.	.	.	2	.	.	.	9	54,0	52,0	98,5	98,5	54,0	98,5	0,267	0,007	0,260	0,204	46,7			
	1	.	.	.	1	.	.	.	9	49,5	49,5	100,0	99,0	49,5	99,5	0,305	0,002	0,303	0,105	48,2			
	.	.	.	.	2	.	.	9	.	88,0	-	100,0	100,0	88,0	100,0	0,056	0,000	0,056	-				
IV	.	.	.	.	.	2	.	.	9	73,5	73,5	99,0	99,0	73,3	99,0	0,135	0,005	0,130	0,130	29,8			
	1	.	.	.	.	1	.	.	9	58,5	58,5	100,0	100,0	58,3	100,0	0,234	0,000	0,234	0,060	27,5			
	.	.	.	.	.	2	.	9	.	100,0	-	100,0	100,0	100,0	100,0	0,000	0,000	0,000	-				
V	.	.	.	.	.	.	2	.	9	76,5	77,0	99,0	98,0	76,5	98,5	0,117	0,007	0,110	0,110	25,2			
	1	.	.	.	.	.	1	.	9	56,5	60,5	99,0	100,0	58,0	99,5	0,232	0,002	0,230	0,056	25,7			
	.	.	.	.	.	.	2	9	.	100,0	-	100,0	100,0	100,0	100,0	0,000	0,000	0,000	-				

b') Método espectrofotométrico.Fundamento y comentario.

Se basa en la absorción selectiva de la vitamina A en la zona ultravioleta del espectro; la intensidad de esa absorción es proporcional a la concentración de las soluciones.

La banda de absorción se extiende entre 230 y 400 $m\mu$, con un máximo efectivo a 325-328 $m\mu$ (43)(44).

La proporcionalidad absorción-concentración es solamente válida para luz monocromática (45)(46).

Se ha demostrado que la correlación existente entre la determinación espectrofotométrica y el método de Carr y Price está estrechamente ligada a los resultados de los análisis biológicos (47).

La absorción de luz ultravioleta por parte de la vitamina A se lleva a cabo con destrucción de la actividad biológica de la misma.

El coeficiente de extinción a 325 $m\mu$ está estimado en 1760, y a 326 en 2100, para soluciones recientes de vitamina cristalina (43).

El factor de conversión entre el coeficiente de extinción y las unidades internacionales es muy discutido, oscilando - según los distintos autores - entre 1600 (ingleses) y 2100 (estadounidenses) (48).

Actualmente es aceptado para usos comerciales el valor 2000.

Este factor depende, entre otros, de la forma en que se encuentra la vitamina y del solvente utilizado.

Barter y Robeson, utilizando etanol como solvente, encontraron (43):

	P.F. (°C)	Activid. (UI)	$\frac{1\%}{2.5\text{ cm}}$	Factor Ogston	$\frac{1\%}{2.5\text{ cm}}$ equivalen- te a (x)
Alcohol	-	4,300.000	-	2450 227	-
Acetato	57-58	3,520.000	1510	2350 133	1730 1710
Palmitato	27-28	2,310.000	940	2530 243	1720 1700
di-Succinato	76-77	3,140.000	1240	2630	1420 1700
β -Naftoato	74-75	3,440.000	1290	3160 145	1640 1700

(x) La columna de la izquierda representa los valores a 326 $m\mu$ calculados para vitamina A; la de la derecha los calculados para vitamina A por saponificación de sus ésteres.

El valor del factor de conversión no se puede considerar en forma absoluta en virtud del hecho recientemente descubierto por Hickman (49) de que los tocotrienoles son indispensables para el aprovechamiento correcto de la vitamina A; en consecuencia, de ello también va a depender la relación Actividad biológica-coeficiente.

En lo que respecta a las variaciones a causa del solvente, los polares producen valores de E mayores que los producidos en solventes no polares. a causa de la desviación del espectro hacia la zona de las menores longitudes de onda (50)(51), se recomienda así el alcohol en reemplazo del cloroformo.

Baxter y Bebeson obtuvieron los siguientes valores, para distintos solventes (43):

Solvente	$\lambda_{\text{máx}}$	$\frac{1\%}{1\text{cm}}$ promedio.
Etanol absoluto	326-328	1750:21
Etanol absoluto	328	1780
Eter de petróleo (30-65°)	328	1760
Formiato de etilo	328	1715
Oleohexano	328	1550
Cloroformo	333	1260

Actualmente se estima como más exacto que el máximo de absorción se encuentra a 325 m μ .

El autor ha encontrado como valor promedio de E_{1%}^{1cm} 1756, para vitamina A palmitato (U.S.P. Reference Standard) disuelta en isopropanol.

El método espectrofotométrico fue aprobado por el Comité Internacional de la Liga de las Naciones, en el año 1934, como método accesorio para la determinación de vitamina A en los aceites de hígado.

Para eliminar la interferencia de sustancias que absorben a la misma longitud de onda, Demarest introdujo su técnica de irradiación destructiva (52), que se basa en la medición antes y después de la acción de luz de pequeña longitud de onda.

La validez de esta técnica depende de que se cumplan tres proposiciones principales: 1) la irradiación destruye la vitamina A y el producto resultante no absorbe a 325 m μ .

2) las interferencias no se modifican por la irradiación ni

la modifican.

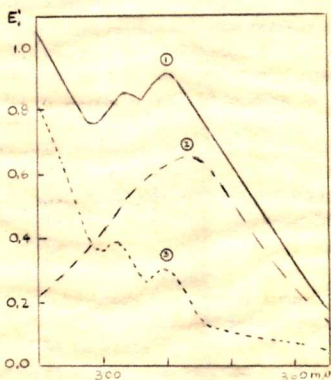
3) la irradiación destruye la vitamina cuantitativamente.

Se demostró que la irradiación destruye completamente la actividad biológica y que las tres condiciones se satisfacen si se usa un filtro bastante selectivo, que asegure la monocromaticidad (53)(54).

Para eliminar interferencias, en general de productos derivados de la oxidación, Morton y Stubbs introdujeron la fórmula de corrección que lleva sus nombres, e incluye las lecturas de absorción a 310, 325 y 334 $m\mu$ (55)(56).

$$A_{corr.} = (7A_{325}) - (2,625A_{310}) - (4,375A_{334})$$

La ecuación es una interpretación matemática de la resolución del sistema curva observada-curva de la sustancia pura-absorción real.



Curvas de absorción (55) de:

- 1) aceite de hígado de bacalao en ciclohexano.
- 2) insaponificable del anterior.
- 3) diferencia entre ambas.

c') Técnica

Se ha adoptado la técnica de purificación del método colorimétrico, con sólo algunas modificaciones de concentración.

1) Reactivos

Propanol-2 (isopropanol): de grado espectrofotométrico. Debe cumplir las siguientes especificaciones:

La absorción a 300 m μ . no deberá ser mayor de 0,050, y entre 320 y 350 m μ . deberá ser menor que 0,010.

Hidróxido de potasio alcohólico N/2: disuelva 28,0 gr. de perlas de HOK en 1000 ml. de etanol.- Prepare esta solución diariamente.

Éter dietílico: Debe ser libre de peróxidos.- Agregando a 20 ml. de éter 5 ml. de una muestra por mitades de una solución acuosa de IK al 50% y una alcohólica de feniltaleína al 1 %, no debe producirse color rojizo.

Sulfato de sodio anhidro, granular: no debe retener vitamina A. -Pese 5 gr. con 50-100 ml. de éter dietílico conteniendo 100 U.I. de vitamina A.- Decante el éter y lave tres veces con porciones de 10-15 ml. de éter.- Identifique la vitamina A en el residuo de evaporación, agregando 2-3 ml. de reactivo de Carr-Price.- Debe permanecer incoloro.

Hidróxido de potasio N/2: disuelva 28,0 gr. de perlas de HOK en 100 ml. de agua destilada y diluya a 1 litro.

Solución standard de Vitamina A: disuelva en isopropanol vitamina A de potencia conocida en forma tal de obtener una solución de 10 U.I./ml.

Nitrogeno: libre de oxidantes.

2) Extracción y purificación

Toda la determinación se llevará a cabo en material de vidrio anti-actínico (en su defecto debe preservarse toda solución que contenga vitamina, de la acción de la luz).

Pese 10 gr de muestra; pásela a un erlenmeyer de 125 ml. con junta esmerilada para adaptar refrigerante, y agregue 25 ml. de potasa alcohólica N/2 .- Adapte el refrigerante y caliente sobre baño de agua a 100 grados C. durante 30 minutos (Nota 1).

Pase el contenido a una ampolla de decantación de 125 ml. y lave el erlenmeyer y el residuo de saponificación con dos porciones de 5 ml. de agua destilada, y luego con 25 ml. de éter.- Pase todos los lavados a la ampolla.

Extraiga la fase acuoso-alcohólica y pase el extracto etéreo a una ampolla de decantación de 250 ml.- Repita 8 veces esta operación, usando cada vez 25 ml. de éter.

Lave el extracto etéreo con 25 ml. de HOK N/2 (acuosa) (Nota 2).

Descarte la fase acuosa y lave nuevamente el extracto etéreo con porciones de 25 ml. de agua destilada, hasta que los lavados no den reacción alcalina con solución fenolftaleína alcohólica 1 %.

Agregue 5 gr. de $\text{SO}_4\text{Na}_2\text{anh.}$ y agite para eliminar el agua de emulsión; deje acumular el sólido a un costado de la ampolla y pase el extracto etéreo seco a un matraz aforado de 250 ml.; lave el residuo de la ampolla con éter y pase los lavados a matraz.- Lleve a volumen con éter.

Evapore en un vaso de ppto. de 100 ml., 50 ml. del extracto del matraz hasta obtener un concentrado de 5-10 ml.- La evaporación se hace sobre baño de agua en ebullición, con corriente de nitrógeno, y cuidando mucho de no llegar a sequedad.- (Nota 3).- Ver notas en B-c-2.

Siga evaporando en frío, bajo abundante corriente de nitrógeno, hasta eliminar totalmente el éter.

Agregue 20 ml. de isopropanol, lavando las paredes del vaso, y coloque sobre la plancha del baño de agua para entibiar y facilitar la solución del residuo aceitoso.

Deje tomar temperatura ambiente y pase a matraz de 25 ml. lavando el vaso y enrasando con isopropanol.

Asegure la homogeneidad del contenido.

Corra un testigo con 2,5 ml. de la solución standard, introducidos en esta técnica desde la saponificación.

3) Espectrofotometría

Mida la absorción de cada una de las muestras y de los standards en solución isopropanólica a 310, 325 y 328 $\text{m}\mu$..

Someta luego las soluciones a una irradiación de 370 $\text{m}\mu$, hasta que las lecturas se mantengan constantes.

El autor efectuó las mediciones con un espectrofotómetro Beckman modelo D U, usando células de sílice de 1 cm. de paso de luz.

La irradiación fue hecha con lámpara de luz de mercurio, para fluorescencia, Hanovia, de tipo 16024, con filtro para fluorescencia, que emite luz de 3660 Å.

4) Cálculos

Los resultados se calculan según la fórmula:

$$\frac{A_2 \times 19 \times f}{C_{fm}} = \text{U.I. de vitamina A/ gr. de muestra.}$$

$$A_2 = (7 \times A_{325}) - (2,625 \times A_{310}) - (4,375 \times A_{334})$$

en las cuales

A_2 es la absorción de la muestra, corregida.

A_{325} , A_{310} y A_{334} son respectivamente las lecturas de muestra a 325, 310 y 334 m/μ.

f es la relación entre el resultado teórico y el obtenido prácticamente con el estándar, a través de la técnica.

C_{fm} es la concentración final de las muestras.

Cálculo de las concentraciones finales:

CF_{25} : se pesaron 0,0980 gr. de aceite conteniendo 500000 U.I. de vitamina A acetato, sintética, por gramo.

$$\frac{0,0980 \times 500000}{250} \times \frac{5}{100} = 9,8 \text{ U.I./ml.}$$

CF_{25}^1 : se introducen en el proceso, desde la amplificación, 2,5 ml. de la solución anterior, para calcular el factor de extracción f .

Se corre este standard en forma paralela a las muestras, excepto en que el extracto etéreo es llevado a 100 ml. en lugar de 250.

$$\frac{0,0980 \times 500000}{250} \times \frac{2,5}{100} \times \frac{50}{25} = 9,8 \text{ U.I./ml.}$$

CF_m : en todos los casos, la pesada de muestra, 10,0 gr. se diluyó como sigue:

$$\frac{10,0}{250} \times \frac{50}{25} = 0,080 \text{ gr./ml.}$$

<u>Muestra</u>	<u>Acetato (gr.)</u>	<u>Conc. final (gr./ml)</u>
I	10,0031	0,0800
II	10,0068	0,0800
III	10,0029	0,0800
IV	10,0042	0,0800
V	10,0006	0,0800

5) ExperimentalResultados inmediatos

	A_{310}	A_{325}	A_{334}	$A_{\text{corr.}}$	Resultado U.I./gr.	Factor extrao.
St	0,472	0,531	0,450	0,509	494,00	1,018
St ₁	0,450	0,506	0,429	0,484	481,00	1,039
I	0,430	0,405	0,380	0,043	10,5	
II	0,265	0,226	0,205	-0,011	Negativo	
III	0,269	0,230	0,209	-0,010	Negativo	
IV	0,130	0,130	0,097	-0,056	Negativo	
V	0,215	0,166	0,138	-0,005	Negativo	

Resultados después de la irradiación

		3 hr.	6 hr.	9 hr.	Promedio
St	A_{310}	0,008	0,008	0,008	0,008
	A_{325}	0,008	0,009	0,009	0,009
	A_{334}	0,010	0,008	0,009	0,009
St ₁	A_{310}	0,006	0,005	0,006	0,006
	A_{325}	0,006	0,006	0,006	0,006
	A_{334}	0,009	0,011	0,011	0,011
I	A_{310}	0,120	0,118	0,118	0,118
	A_{325}	0,056	0,055	0,054	0,055
	A_{334}	0,084	0,086	0,085	0,085
II	A_{310}	0,072	0,069	0,069	0,069
	A_{325}	0,010	0,011	0,010	0,010
	A_{334}	0,026	0,026	0,022	0,024
III	A_{310}	0,082	0,072	0,070	0,071
	A_{325}	0,005	0,005	0,005	0,005
	A_{334}	0,019	0,017	0,018	0,018
IV	A_{310}	0,040	0,050	0,046	0,048
	A_{325}	0,007	0,007	0,007	0,007
	A_{334}	0,005	0,006	0,006	0,006

V	A_{310}	0,115	0,106	0,110	0,108
	A_{325}	0,046	0,046	0,045	0,046
	A_{334}	0,032	0,034	0,033	0,034

Suponiendo que solamente la vitamina A ha sido destruida por la irradiación, restando a los valores inmediatos las nuevas lecturas se obtendrán las absorciones correspondientes a la vitamina A.

Resultados finales

	A_{310}	A_{325}	A_{334}	$A_{\text{corr.}}$	Resultado U.I./gr.	Factor extrañ.
St	0,464	0,552	0,441	0,507	492.000	1,019
St ₁	0,446	0,500	0,418	0,500	485.000	1,031
I	0,312	0,350	0,295	0,333	81,6	
II	0,196	0,216	0,181	0,205	50,2	
III	0,198	0,225	0,191	0,219	53,7	
IV	0,082	0,090	0,074	0,090	22,1	
V	0,107	0,120	0,104	0,104	25,5	

d) Resultados obtenidos y comentarios

MUESTRA	Nº	Método Colorimétrico			Método espectrofotométrico		
		s/muestra tal cual.		sobre anhíd.	s/tal cual	sobre anhíd.	
		U.I./gramo	UI/g	U.I/g	UI/g	UI/g	
		Datos	Prom	Prom	-	-	
Macrocystis pyrifera	I	77,9	77,0	77,5	94,3	81,6	99,5
Lessonia flavicans	II	47,2	48,1	47,7	53,6	50,2	56,4
Lessonia fassia	III	46,7	48,2	47,5	52,8	53,7	59,7
Iridea laminaróide	IV	29,8	27,5	28,7	32,6	22,1	25,1
Iridea cordata	V	25,2	25,7	25,5	28,7	25,5	28,7

En ambos métodos la determinación sigue a la saponificación y extracción etérea del insaponificable.

La concordancia obtenida entre los dos métodos es excelente.

En el método colorimétrico se efectuó una lectura adicional para eliminar la influencia del color producido por los carotenos, cuyo valor fué despreciable.- Se introdujo un standard interno para determinar el factor de extracción, destrucción y/o pérdida; el valor obtenido -1,11- es un 6 % más elevado que el habitual.

En el método espectrofotométrico se descontó el valor de lectura de la interferencias por destrucción fotoquímica de la vitamina A (irradiación ultravioleta durante 3 horas).- Antes de la irradiación las lecturas, utilizando la fórmula de corrección de Morton y Stubbs, arrojaron resultados negativos; la mayor interferencia se encontró a 310 m μ ..

El valor del factor de extracción fué de 1,04, normal.

e) Bibliografía (Vitamina A)

- 1) Karrer P., Morf R. y Schöpp K.- *Helv. Chim. Acta* 14, 1431 (1931).
- 2) Karrer P., Morf R. y Schöpp K.- *Helv. Chim. Acta* 16, 557 (1933).
- 3) Holmes H. y Corbett R.- *J. Am. Chem. Soc.* 59, 2042 (1937).
- 4) Heilbron I. M., Morton R. A. y Webster E. T.- *Biochem. J.* 26, 1194 (1937).
- 5) Sobutka H., Kann S. y Loewenstein E.- *J. Am. Chem. Soc.* 65, 1959 (1943).
- 6) Sobutka H., Kann S. y Winternitz W.- *J. Biol. Chem.* 152, 635 (1944).
- 7) Sobel A. E. y Verdin E.- *J. Biol. Chem.* 159, 681 (1945).
- 8) Edebury J. R., Morton R. A., Simpson C. W. y Lovern J. A. *Biochem. J.* 32, 118 (1938).
- 9) Pritchard H., Wilkinson H., Misbury J. R. y Morton R. A. 31, 258 (1937).
- 10) Embree N. D. y Schantz E. M.- *J. Am. Chem. Soc.* 65, 906 (1943).
- 11) Robeson C. D. y Baxter J. C.- *Nature* 155, 300 (1945).
- 12) Schantz E. M., Cawley J. D., Embree N. D.- *J. Am. Chem. Soc.* 65, 901 (1943).
- 13) Holmes H. y Corbett R. E.- *J. Am. Chem. Soc.* 59, 2042 (1937).
- 14) Zscheile F. P. y Henry R. L.- *Ind. Eng. Chem. An. M.* 14, 422 (1942).
- 15) Baxter J. C. y Robeson C. D.- *J. Am. Chem. Soc.* 64, 2407 (1942).
- 16) La misma que 8).
- 17) Gillam A. E., Heilbron I. M., Jones W. E. y Lederer E.- *Biochem. J.* 32, 405 (1938).
- 18) La misma cita que 10).
- 19) Embree N. D. y Schantz E. M.- *J. Biol. Chem.* 140, XXXVII, (1941).
- 21) La misma cita que 11).
- 22) Pearson W. R.- *Biochem. J.* 19, 488 (1925).
- 23) Pasini A. E. y Taras M. H.- *J. Am. Pharm. Ass.* 26, 721 (1937).
- 24) Kobayashi K. y Yamamoto K.- *J. Soc. Chem. Ind., Japón*, 27, 1060 (1924).
- 25) Besancon M.- *Bull. soc. chim. Biol.* 11, 294 (1929).
- 26) Rosenheim O. y Drummond J. C.- *Biochem. J.* 19, 753 (1925).
- 27) Carr F. H. y Price E. A.- *Biochem. J.* 20, 497 (1926).
- 28) La misma que 27).

- 29) Coward K. H., Dyer F. J., Morton R. A. y Gaddum J. H.
Biochem. J. 25, 1102 (1931).
- 30) Corbett R. E., Geisinger H. M. y Holmes H. M.-J. Biol. Chem. 100,
657 (1933).
- 31) Morris E. Ray Church A. F., J. Biol. Chem. 85, 477 (1929).
87, 139 (1930).
89, 421 (1930).
- 32) Smith E. L. y Haxley V.- Biochem. J. 24, 1942 (1930).
- 33) Morgan R. S.- Biochem. J. 26, 1144 (1932).
- 34) Moll T. y Reid A.- Zeit. Physiol. Chem. 260, 9 (1939).
- 35) Oser B. L., Melnick D. y Pader M.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 15,
724 (1943).
- 36) Wall M. E., Kelley E. G.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 15, 18 (1943)
- 37) Griffith K. B. y Jeffrey P. N.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 16,
438 (1944).
- 38) Boyer P. D., Phillips P. M. y Smith J. R.- J. Biol. Chem. 152,
445 (1944).-
- 39) Rosenthal E. y Weltner L.- J. Biochem. 29, 1036 (1935).
- 40) Meunier P. y Raoul Y.- Comp. rend. soc. biol. 206, 1148 (1938).
- 41) Nottevarp O. y Seedon H. W.- Biochem. J. 30, 1705 (1936).
- 42) Rosenthal E. y Erdélyi J.- Bioch. Zeit. 267, 119 (1933).
- 43) Baxter J. G. y Rebecca O. D.- J. Am. Chem. Soc. 64, 2411 (1942)
- 44) Oser B. L., Melnick D. y Pader M.- Ind. Eng. Chem., Anal/Ed. 15,
717 (1943).
- 45) La misma cita que 14).
- 46) Mergaridge K.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 14, 700, (1942).
- 47) Morton R. A. y Hallbron I. M.- Biochem. J. 22, 987 (1928).
- 48) Holmes W. y Brownund W. H.- J. Biol. Chem. 112, 437 (1936).
- 49) Hickman K.- An. Rev. Bioch. 12, 353 (1943).
- 50) La misma cita que 14).
- 51) La misma cita que 46).
- 52) Demarest B.- Zeit. Vitaminsforsch 9, 20 (1939).
- 53) Neal R. H., Haward C. H. y Luckman A. H.- Ind. Eng. Chem., Anal. E
13, 150 (1941)

- 54) Little R.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 16, 288 (1944).
- 55) Morton R. A. y Stubbs A. L.- Analyst 71, 348 (1946).
- 56) Morton R. A. y Stubbs A. L.- Biochem. J. 42, 195 (1948).

PROVITAMINAS A

Son pigmentos de origen vegetal, de la familia de los carotenos.

Se encuentran generalmente ausentes de los organismos animales, en los cuales se almacenan en forma de vitamina A.

Hay nueve provitaminas A conocidas: α , β y γ caroteno, criptoxantina, equinoxona, mixoxantina, leproteno, afanina y afanicina (1).

A) Antecedentes

a) Características biológicas

Se transforman en vitamina A en el organismo animal.

Este hecho se demuestra porque adicionados a una dieta carente de vitamina A, la completan.

b) Características químicas y físicas

Son de color rojo oscuro y producen soluciones amarillas.

Se caracterizan por contener el núcleo β -ionona, indispensable para la actividad biológica, y una cadena lateral poliénica.

Los carotenos pertenecen a cuatro grupos principales:

1) Los carotenos α , β y γ y el licopeno, isómeros de fórmula



2) Las xantófilas, oxi e hidroxí-derivados de los anteriores.

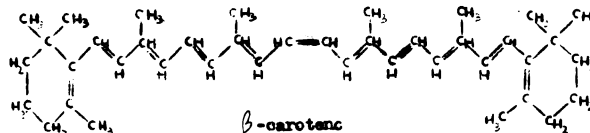
3) Esteres de las xantófilas y ácidos grasos.

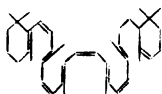
4) Carotenoides ácidos, derivados carboxílicos de los carotenos

De ellos solamente α , β y γ caroteno y criptoxantina tienen actividad biológica y funcionan como provitaminas A en forma definida.

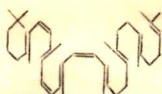
Se ha comprobado, aunque no fehacientemente, que una gran parte de los nombrados en el primer párrafo son relativamente activos. (1)

Los más comunes tienen estructuras conocidas, mientras que otros poseen fórmulas químicas cuestionables.

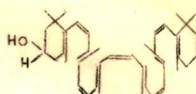




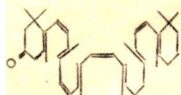
α -caroteno
(α , β -caroteno)



γ -caroteno
(β -lipo- β -
caroteno)



Criptoxantina
(3-hidroxi- β , β -
caroteno)



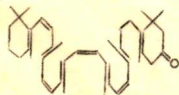
Equinenona
(Questionable)



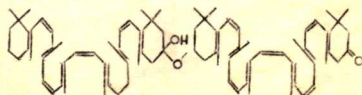
Vinoxantina



Leproteno
(Fórmula y ac-
ción cuestion.)



Afanina
(Questionable)



Afanicina
(Questionable)

En general son solubles en los disolventes de las grasas (cloroformo, benceno, sulfuro de carbono, etc.) y en las grasas mismas.

Son insolubles en agua y en alcohol etílico.

Crystalizan en prismas de elevado punto de fusión (160 °C. o mayor).
Producen coloración azul con ácido sulfúrico, y azul que pasa a verde con mezcla sulfonítrica, en cloroformo.

Son estables al calor en atmósfera libre de oxígeno: excepto en lo que respecta a ciertos cambios estereoisoméricos (2).

Por calentamiento y estacionamiento, soluciones de β -caroteno tienden a isomerizarse en neo- β -caroteno; este último es el isómero cis del β -caroteno natural (3)(4).

El neo- β -caroteno tiene una potencia biológica que es la mitad de la que posee el isómero trans (natural) (5)(6).

Son sensibles a la oxidación, a la auto-oxidación y a la luz.

Poseen un espectro de absorción típico, cuyos máximos varían con el solvente utilizado.- la teoría al respecto acepta que ello se debe a un cambio en el equilibrio de la isomería cis-trans (7).

En el cuadro que sigue se dan los máximos de absorción, en $m\mu$, en distintos solventes (8).

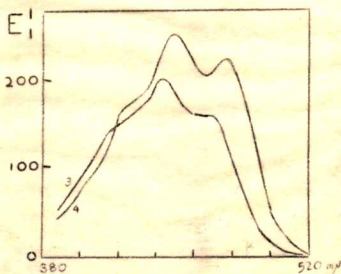
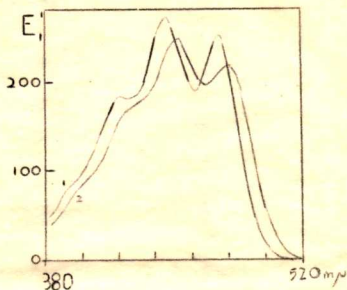
	Eter de Metano		S ₂ O	C ₆ H ₆	EtOH	Cloroformo
α -caroteno	447	442	477	-	-	-
(PF 187°C)	478	446	509	-	-	-
	-	474	-	-	-	-
β -caroteno	451	450	485	-	452	466
(PF 184°C)	484	478	521	-	480	497
γ -caroteno	462	-	496	477	-	477
(PF 178°C)	495	-	533	510	-	510
Criptoxantina	452	452	483	-	452	463
(PF 169°C)	485	478	519	-	486	497
Neo- β -caroteno	-	443	-	-	-	-
	-	467	-	-	-	-

Para que un caroteno se pueda transformar en vitamina A su estructura debe llenar ciertos requisitos:

- 1) Debe contener el ciclo β -ionona.

- 2) El ciclo no debe contener ningún grupo funcional adicional, pues la presencia de éstos lo inactiva.
- 3) La cadena lateral unida al ciclo debe contener no menos de cuatro dobles ligaduras conjugadas.

La unidad U. S. P. de vitamina A se ha asignado arbitrariamente a la actividad biológica de 0,6 mgr. de β -caroteno.



Absorción típica de carotenos en hexano:

- | | |
|------------------------|----------------------------|
| 1) α -caroteno. | 3) Neo- β -caroteno. |
| 2) Crixantina. | 4) β -caroteno. |

B) Desarrollo del método de determinación.

a) Determinación química y/o física en general y elección del método.

Los resultados que se obtienen en general por métodos químicos, físicos o combinados sólo tienen valor de aproximación, dado que el único método exacto conocido hasta el momento es el biológico.

Los métodos físicos se basan en la lectura de las absorciones de soluciones de provitaminas A, en distintos solventes, a 450-460 m μ .

Ello importa la medición directa del color amarillo característico de los carotenos en solución.

Pueden determinarse químicamente por la reacción de Carr-Price, utilizando la misma técnica que para dosar vitamina A.- El color de reacción es el mismo, pero hay una diferencia significativa en la duración: el producido por las provitaminas A (carotenos en particular) tiene una duración media de dos horas.

En la determinación de vitamina A se hicieron lecturas del color residual, con resultados en general despreciables para carotenos.

Por esa causa, en el presente trabajo se ha adoptado el método espectrofotométrico, de mayor sensibilidad.

El problema más serio consiste en la separación de los carotenoides que tienen actividad de provitamina A, de aquellos que no la poseen.

Entre estos últimos figura en forma preponderante la Xantófila.

La separación cromatográfica es en general de mayor valor que la purificación por solventes, debido a que existen ciertos límites en la separación física, a causa de la similitud de los coeficientes de partición con ciertas impurezas, particularmente en lo que respecta a β -caroteno.

No obstante se ha elegido esta última debido a su mayor simplicidad y teniendo en cuenta que es comparable a la separación cromatográfica, en el caso particular del análisis en material de origen vegetal, aunque es ya un hecho conocido el que los extractos provenientes de vegetales según la técnica de partición por solventes no posean estrictamente las propiedades espectrofotométricas del β -caroteno cristalino (9)(10).

La medida de absorción a 450 m μ . es generalmente muy grande con respecto a la de 470 m μ ., siendo la absorción a 480 m μ . en general menor que a 470 m μ .

- Un dato representativo se obtiene según Gilliam (11)
a 460 m μ .

- b) Determinación por el método de Quilbatt (12), modificado por Petersen (13).

Fundamento y comentarios.

Se basa en la solubilidad diferencial de los pigmentos liposolubles en solventes inmiscibles y posterior medición de la absorción de las soluciones a 450-480 m.μ., zona del espectro en la cual la absorción es proporcional a la concentración, entre 0 y 50 mcgr./ml, de β-caroteno.

Por elección apropiada de solventes es posible separar los carotenos biológicamente activos de otros pigmentos liposolubles, especialmente xantófila (luteína) y fitoxantinas.

En la práctica esto se realiza mediante una extracción con metanol al 90 %, que elimina las clorofilinas, flavonas, álcalis y xantófilas.

En general los carotenoides se extraen con una mezcla de éter de petróleo y metanol al 85 %.- La fase orgánica contiene el caroteno, licopina y los ésteres de xantófila.- Por saponificación y extracción en la mezcla de solventes, el caroteno y la licopina quedan en ella, pasa a la fase acuosa la xantófila.

Las provitaminas A se encuentran en los productos naturales, en formas libres o combinadas.- Las combinaciones lo son como ésteres o como complejos con proteínas.

Un simple calentamiento a 40-60 °C. permite liberarlas.

En los tejidos, animales principalmente, los carotenos hidroxilados se encuentran esterificados y se hace necesario así la saponificación, a temperatura ambiente o con aplicación de calor moderado.

Otra manera de efectuar la separación consiste en el agregado, en frío, de bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio.

La saponificación de la muestra es necesaria para facilitar la extracción de los pigmentos, aún cuando ultimamente se tiende a la eliminación de todo proceso térmico a causa de que se le atribuye el inconveniente de provocar la isomerización de los compuestos a dosar.

Willstätter y Stöl, en 1913, publicaron un método bifásico de separación que ha sido la base de cuantos se han desarrollado a posteriori.

Consistía en moler el material fresco con arena, en presencia de acetona⁴⁰⁷ al 40 %, lavar con acetona hasta obtener un filtrado incoloro y luego

con acetona pura.

Los extractos son entonces tratados con éter y saponificados con potasa metanólica.- la solución etérea es lavada luego con agua destilada para eliminar la acetona y el metanol.

El éter se evapora y el residuo es tomado con éter de petróleo.

Este nuevo sistema es liberado de xantófilas por extracciones sucesivas con metanol al 80, 90 y 92 %, hasta que los extractos parciales sean incoloros.

Coward (14) usó la misma técnica, pero trabajando en atmósfera de nitrógeno, para evitar la oxidación e isomerización.

Peterson (13), modificando la técnica de Guilbert, que ha sido extensamente utilizada (12), produce una adaptación especial para vegetales, que será usada en este trabajo.

Como ya se visto, existe alguna diferencia en el uso de las distintas longitudes de onda de la banda 450-480.

Un dato representativo se obtiene, según Gilliam, a 460 m μ . (11).

Esa será la longitud de onda utilizada para efectuar las mediciones de absorción en la técnica que sigue.

La modificación introducida por Peterson a la técnica de Guilbert le es, fundamentalmente, en lo que respecta a la fase manipulativa; obteniendo como resultado una técnica más corta y sencilla.

e) Tiomas1) Reactivos

Nitrógeno de potasio alcohólico al 10 %: en etanol 95 %.

Eter de petróleo: fracción que destila entre 65 y 70 °C.- Debe ser libre de agua y otros solventes.- Es recomendable el uso de Skellysolve tipo B.

Metanol acuoso al 90 %: en volumen

Sulfato de sodio anhidro, granular.

Nitrógeno: debe estar libre de sustancias oxidantes.

2) Extracción y purificación

Pese 10,0 gr. de muestra y transfíralos a un erlenmeyer de 125 ml., de vidrio antiactínico, con junta esmerilada para adaptar un refrigerante a aire.

Agregue 50 ml. de potasa alcohólica 10 % y agite hasta humedecer toda la muestra.

Caliente en baño de agua a 50 °C. durante 15 minutos, con frecuentes agitaciones.

Filtre por placa de vidrio filtrante (gruesa) y lave el residuo sobre la placa con porciones de 20 ml. de Skellysolve y etanol absoluto, en forma alternada, hasta que los filtrados pasen incoloros.

Transfiera los filtrados y lavados a una ampolla de decantación de 250 ml., de vidrio antiactínico.

Extraiga con dos porciones de agua destilada de 50 ml. cada una y pase el extracto acuoso-alcohólico-alkalino a otra ampolla de decantación.- Extraiga con tres porciones de treinta ml. de Skellysolve.

Reuna todos los extractos de Skellysolve y extraígalos con porciones de 30 ml. de metanol al 90 %, hasta que no haya color amarillo en las extracciones metanólicas.

Seque los extractos de Skellysolve con 2-3 gr. de sulfato de sodio anhidro y decante o filtre para eliminarlo.- Si se filtra, hacerlo por lana de vidrio (el papel de filtro puede retener caroteno).

Evapore con corriente de nitrógeno y a baja temperatura los extractos secados, hasta obtener un concentrado de 30-40 ml..

Píselos a un matraz aforado (antiactínico) de 50 ml., enrase con Skellysolve y homogeinice.

3) Colorimetría

Se determina la absorción de las soluciones a 460 m μ ., utilizando para ello un espectrofotómetro Benkman, modelo D U, en células Corex de 1 cm. de paso de luz.

Como blanco de lectura use Skellysolve.

4) Cálculos

El resultado final, en mgr. de β -caroteno/ gramo de muestra, se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{Im \times QFst}{Ist \times QFm} = \text{mgr. de provitaminas A, como } \beta\text{-caroteno / gr.}$$

donde:

Im es la absorción de la muestra.

Ist es la absorción de la solución standard de β -caroteno

QFm es la concentración de la muestra en las soluciones de lectura.

QFst es la concentración final del standard en las soluciones de lectura.

Cálculo de las concentraciones finales:

QFst: se usa para el cálculo el valor 0,400 de absorción, que corresponde a una solución de β -caroteno de 1,6 mgr./ml.

QFm: en todos los casos, la pesada de muestra - 10,0 gr. - se llevó a 50 ml., es decir:

$$\frac{10,0}{50} = 0,20 \text{ gr./ml.}$$

<u>Muestra</u> <u>Nº</u>	<u>Pesada (gr.)</u>	<u>Conc. final (gr/ml.)</u>
I	10,0022	0,2000
II	10,0010	0,2000
III	10,0000	0,2000
IV	10,0091	0,2002
V	10,0002	0,2000

5) Experimental

Muestra Nº	Absorción a 460 m/μ.	Resultado mcgr./gr.
I	0,121	2,4
II	0,078	1,6
III	0,420	8,4
IV	0,012	0,2
V	0,048	1,0

d) Resultados obtenidos y comentarios

Muestra Nº	Alga	Mcgr. (como β-caroteno) por gramo de muestra.	
		s/tal cual	s/anhídrido
I	Macrocystis pyrifera	2,4	3,0
II	Lessonia flavicans	1,6	1,8
III	Lessonia fassia	8,4	9,3
IV	Iridea laminaroides	0,2	0,3
V	Iridea cordata	1,0	1,1

Se determinó provitaminas A por el método de Guilbert, según una modificación de Petersson.- Los carotenos se extrajeron, previa hidrólisis alcalina, con Skellysolve; la interferencia de xantofilas se eliminó por extracción metanólica de las mismas.

Los datos obtenidos difieren en algunos casos (I y III) de la apreciación de carotenos hecha por lectura residual en la determinación colorimétrica de vitamina A.- Lógicamente, la sensibilidad del método aquí empleado es mucho mayor que la que ofrece la reacción con cloruro de antimonio, pero no debe descartarse que es mucho menos específico y en consecuencia estar evidenciando otro tipo de colorante amarillo no eliminable por él.

e) Bibliografía

- 1) Rosenberg H. R.- Chemistry and Physiology of the Vitamins, 39 (1942)
- 2) Zechmeister L. y Tuson P.- Biochem. J. 32, 1305 (1938).
- 3) Mann T. B.- Analyst 69, 34 (1944).
- 4) Moore L. A.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 12, 726 (1940).
- 5) Deuel H. J., Sumner E. y otros.- Arth. Biochem. 7, 247 (1945)
- 6) Kemmerer A. R. y Fritze G. S.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 15, 714 (1934).
- 7) Smith E. L., Stern B. E. y Young F. E.- Nature 141, 551 (1938)
- 8) Peterson W. J., Hughes J. S. y Payne L. F.- Kansas Agr. Expt. St. Tech. Bull. 46, (1939).
- 9) Miller E. S.- Cereal Chem. 15, 310 (1938).
- 10) Peterson W. J.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 13, 212, (1941).
- 11) Gilliam A. E.- Biochem. J. 28, 79 (1934).
- 12) Guilbert H. S.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 206, 41 (1932).
- 13) La misma que 10.
- 14) Coward K. H.- Biochem. J. 18, 1114 (1924)

VITAMINA B₁

La vitamina B₁ se llama también aneurina, antineurítica, antiberibérica, tiamina, polineuremina, etc.- Se le conoció en un tiempo como vitamina F (1).-

A) Antecedentesa) Características Biológicas

Los principales cuadros por carencia de esta vitamina alcanzan los tres tipos siguientes: alteraciones del sistema nervioso, cardíacas y del aparato digestivo.-

Experimentalmente se ha demostrado en las aves -en los mamíferos con mayor dificultad- que la polineuritis carencial se caracteriza por fases de rigidez, opistotonus, ataxia y convulsiones.- En fases más avanzadas hay marcados síntomas paralíticos.-

La falta de tiamina altera también el fisiologismo del impulso nervioso y posiblemente la liberación del potasio y de la acetilcolina no se desenvuelvan normalmente.-

Clínicamente, los primeros cuadros carenciales que se conocen son los descritos como beri-beri, que en el hombre se caracteriza a grandes rasgos por un cuadro que generalmente tiene una de las siguientes características:

1) Predominio neurológico con lesiones degenerativas básicas de los nervios periféricos; se alcanza también la parte motora y se llegan a producir ataxia y parálisis, acabando en lo que se ha llamado cuadro de forma seca y atrofía.-

2) Beri-beri edematoso, localizado principalmente en las extremidades inferiores y en los párpados.-

3) Beri-beri cardíaco, con polineuritis, edemas y alteraciones cardíacas (disnea, palpitaciones, fatiga de esfuerzo, dolores retroesternales, etc.).-

Es interesante consignar que en general existe una especie de antagonismo entre las formas polineuríticas y cardíacas; de tal manera las formas neuríticas graves suelen cursar sin manifestaciones cardíacas o con éstas muy atenuadas, y viceversa.-

Entre las alteraciones del aparato digestivo se pueden consignar anorexia, estreñimiento, dificultades en la absorción digestiva, etc.-

El cuadro carencial se acentúa si hay lesiones sangrantes en el aparato digestivo, por destrucción de la vitamina por parte de la hemina producida por la acción del clorhidrico sobre la sangre.-

En lo que respecta al cuadro de hipercosificación, puede afirmarse que no existe.- Dosis inyectadas de hasta 500 mgr., producen apenas ligeras modificaciones en la cromaxia de los nervios periféricos, pero sin aparecer las más ligeras modificaciones subjetivas.-

La necesidad diaria mínima de tiamina está estimada en 0,6 mgr. por el Food and Nutrition Board of the National Research Council.-

Otras fuentes indican 1 mgr.; en general la dosificación está relacionada con la energía de la dieta; para evitar toda deficiencia se aconseja 0,3 mgr. por cada 500 calorías ingeridas.-

1 mgr. de clorhidrato de tiamina equivale a 3.333 unidades internacionales (2).-

Fundamentalmente, la tiamina tiene actividad de coenzima (co-carboxilasa) cuando se encuentra fosforilada (difosfotiamina).- Actúa en la fase de decarboxilación, o sea una de las últimas etapas anaerobias del metabolismo; esta acción se refiere al ácido pirúvico.-

Favorece el depósito de glucógeno en el hígado y es indispensable para la oxidación del ácido láctico en el cerebro.-

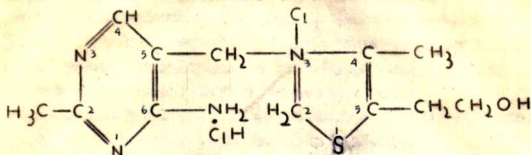
Participa también del metabolismo del agua, en forma intensa; su acción es diurética.-

Se supone que interviene activamente en la liberación de acetilcolina en el sistema nervioso y por tanto tendría importancia fundamental para la transmisión del impulso nervioso.-

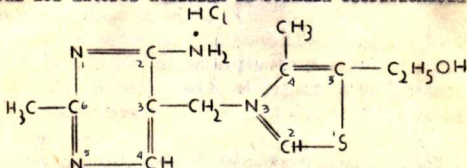
Es interesante hacer notar el carácter absolutamente específico de esta vitamina: no se conoce fórmula semejante capaz de promover su acción, y cualquier modificación en su constitución anula con facilidad sus caracteres biológicos.-

b) Características químicas y físicas.

Se ha aislado en estado puro de la corteza de arroz y de la levadura.- Su fórmula estructural, confirmada es



En general los autores utilizan la fórmula escribiéndola:



La nomenclatura inicial es: 4- metil- 5- β - hidroxietil- N- { [2- metil- 4- aminopirimidil- (5)] - metil } tiazolio para la base, siendo la sal un clorhidrato del cloruro de la misma.-

La base se presenta como cristales monoclinicos finos, de color blanco, que funden a 221 $^{\circ}$ C. -

Como tales, son muy inestables.-

Poseen fuerte caracter básico debido a los átomos de nitrógeno cuaternario y aminico.-

Como clorhidrato cristaliza en agujas incoloras que funden a 249-251 $^{\circ}$ C. y de gran poder higroscópico; absorben como máximo una molécula de agua.

En estado seco son muy estables a la oxidación atmosférica.-

Tienen el olor característico de la levadura, del cual es causante en virtud del núcleo tiazólico.

Por la gran cantidad de átomos de nitrógeno no oxidados, y el anillo tiazólico con oxhidrilos libres, es hidrosoluble (100 gr/100 ml.)

Las soluciones acuosas son de carácter ligeramente ácido.

Es también soluble en etanol 95% (1 gr./100 ml.), etanol 100 % (0,3 gr./100 ml.) y glicerina (5 gr./100 ml.).

Es insoluble en éter, cloroformo, benceno, acetona y hexano.

En cuanto a los efectos del calor, es estable en soluciones ácidas; a pH 3,5 puede ser calentada a 120 °C, sin ninguna descomposición.

En soluciones menos ácidas se descompone, y lo mismo ocurre a temperatura ambiente en soluciones neutras o alcalinas, presumiblemente a causa de la alteración de la porción tiamídica.

En solución a pH 4,0-6,0 (en presencia de sulfitos) se separan los dos núcleos de la molécula; lo mismo ocurre con soluciones de nitrato de bario y acetato de sodio (3).

La estabilidad al calor no sólo depende pues del pH de la solución sino también de los electrolitos presentes.- A pH 5,4 y calentando una hora a 100 °C., la destrucción es del 100 % en presencia de boratos del 57 % en solución acuosa no regulada, del 10 % con acetatos y del 3 % con fosfatos (4).

Es muy sensible a oxidantes y reductores cuando se halla en solución.

Por oxidación leve se transforma en tiorona, y lo mismo ocurre simplemente por reposo de sus soluciones, aunque en un lapso de varios meses.- Esta transformación se opera rápidamente por oxidación con ferricianuro de potasio, en medio alcalino; esta reacción se utiliza para la determinación cuantitativa.- (5).

Los ácidos minerales fuertes la destruyen con formación de amoníaco.

El espectro de absorción ultravioleta tiene dos máximos a 235 y 267 m μ a pH 7 ó mayor (6); a pH 5,5 o menor tiene también dos máximos de absorción: a 245 y 247 m μ . (7) (8).

Vemos pues que el espectro de absorción de la tiamina es función del pH de la solución (9), lo cual puede atribuirse al núcleo pirimidico de la molécula (10) (11).

El carbón y la tierra de infusorios la adsorben en medio ácido.

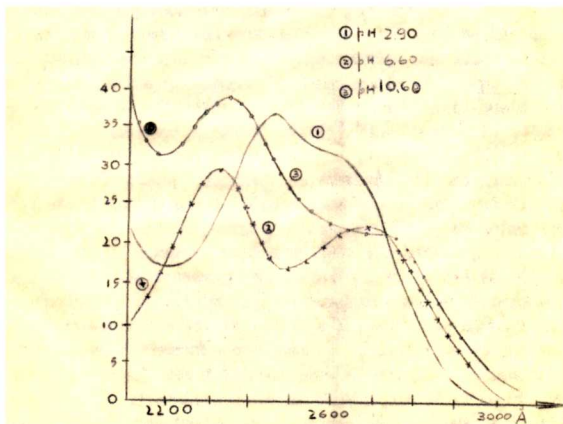
La elución del carbón se hace con ácido clorhídrico y de la tierra de infusorios con álcalis y sales de quinina.

Las zeolitas sintéticas (Permutita, Decalco) la adsorben por intercambio de bases, pudiéndose eluirla con eluente de potasio.

La tiamina, bajo la forma de pirofosfato, forma parte del sistema enzimático de la carboxilasa, funcionando como coenzima.

La carboxilasa tiene el espectro de absorción de la tiamina y se demostró que es el ester pirofosfórico de ella (12); se hidroliza fácilmente a 100 °C. en medio ácido, o por acción de una fosfatasa, produciéndose un derivado monofosfatado que no actúa como coenzima y es muy difícil de hidrolizar.

Se ha comprobado que la tiamina, aunque inactiva por si misma, actúa considerablemente el efecto catalítico de descarboxilación de la levadura lavada en medio alcalino.



Curvas de absorción de soluciones acuosas de tiamina (4).
Coeficiente de absorción específica vs. longitud de onda.

B) Desarrollo del método de determinación.

a) Determinación química y/o física en general y elección del método.

Muchos de los métodos colorimétricos propuestos para el ensaje de tiamina se basan en la reacción con un reactivo diazotado.

Entre los que no se encuentran en esa categoría cabe mencionarse la reacción de Lipman (13) con hidrosulfito, para producir una coloración verde amarillenta.

Tauber (14) describió la reacción de la tiamina con p-dimetilamino benzaldehído la cual, después de evaporación, enfriamiento y adición de ácido acético glacial, produce un intenso color rojo.

La 2-6 ditreosquinona-clorimida se combina con la parte tiazólica de la vitamina para producir un color anaranjado (con cloroformo).

Los métodos ya mencionados en base a reactivos diazotados han sido y son muy usados y han sido propuestos varios:

Kinnerley y Peters desarrollaron uno (15) (16) basado en la reacción de la tiamina- estabilizada con formaldehído- con ácido sulfamílico diazotado, en medio alcalino.- La combinación se produce con el amino-grupo 4 del núcleo pirimidínico, no obstante lo cual sustituyentes en el grupo tiazólico modifican el color (17).- También lo interfiere la presencia de reductores.

Willstaedt y Bárány aplicaron la formación de una tintura soluble en éter por reacción con 2,4 dinitroanilina en medio alcalino.

Mareoni (18) utilizó p-nitroanilina diazotada, en medio alcalino, para producir un derivado rojo extraíble por benceno.

La reacción más extensamente utilizada, entre las de esta clase, es la de Prohász y Mc Collum (19) que usaron p-amino-acetofenona diazotada, para producir una coloración roja insoluble en agua, pero soluble en xileno.- Esta reacción, mejorada en investigaciones posteriores (20) (21) (22) (23) (24), fue utilizada para el ensaje en cereales (24).

Otro tipo de determinación es el método por la medida de la fluorescencia del tiocromo, basado en la oxidación alcalina de la vitamina, que permite trabajar con concentraciones finales de 0,5 mgr./ml.

Este método tiene sobre los anteriores las ventajas de una mayor especificidad y sencillez de operación.

Por estas causas se lo ha elegido para el presente trabajo.

b) Determinación por el método del tiocromo.

Método original de Jansen (25), modificado por Hennessy y Cerecedo (26).

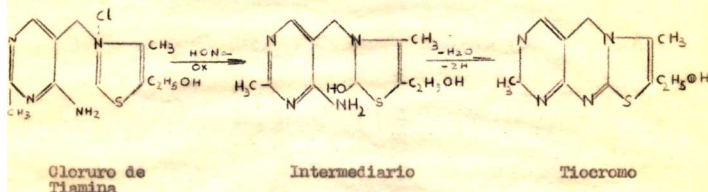
Fundamento y comentarios.

Se basa en la oxidación de la tiamina en medio alcalino, con lo cual se transforma en tiocromo (27).- Como ya se ha dicho, esta transformación ocurre también espontáneamente cuando se dejan reposar soluciones alcohólicas, a temperatura ambiente, durante varios meses.

El tiocromo es un compuesto fluorescente extraíble con isobutanol, lo cual permite separarlo de interferencias.

La fluorescencia es proporcional a la concentración original de tiamina, aunque la relación tiocromo-B₁ no es estequiométrica.

El mecanismo de deshidrogenación no se conoce con certeza, pero es muy probable que se forme un compuesto intermediario:



El tiocromo es una sustancia amarilla de intensa fluorescencia azul(2). Funde a 227-228 °C. y tiene su espectro de absorción dos máximos a 358 y 375 mμ.

El hidrosulfito de sodio lo reduce, en soluciones neutras o alcalinas a una leucobase que no posee fluorescencia.- La oxidación por agitación en aire lo regenera.

La luz lo destruye en forma irreversible.

Pese a la similitud molecular con la tiamina, es biológicamente inactivo.

Puede obtenerse de la tiamina por oxidación de sus soluciones con permanganato de potasio o bióxido de manganeso a pH 7 (28), con ferricianuro de potasio en medio alcalino (29), con agua oxigenada, óxido

de selenio y otros.

El perclorato de potasio en medio alcalino - pH 10,0 - es el agente oxidante que mejores resultados ha dado para la determinación cuantitativa (29).

El dosaje de la tiamina por este método fué propuesto por Jansen (25) quien extrajo el compuesto fluorescente con isobutanol y determinó su concentración fluorimetricamente.

En adelante, muchos investigadores estudiaron y usaron este método, sin aportar más que ligeras variantes de técnica (30)(31)(32)(33)(34)(35).

En la práctica, a bajas concentraciones (0,2-1,5 mgr./ml.), se ha encontrado a menudo que la transformación de tiamina en tioromo no es total sino un 67 % del valor máximo estequiométrico.

Por esa causa es necesario hacer simultáneamente una comparación con una solución de concentración conocida, en condiciones de rigurosa standardización.

La técnica según Jansen sólo permite determinar tiamina libre, dado que el tioromo-compuesto que produce la coccortexilasa no se extrae en la fase isobutanolica (36).

Para la determinación de tiamina total Hennessy y Cerecedo introdujeron la hidrólisis enzimática, con el fin de liberar la vitamina de sus combinaciones orgánicas (26).

Tauber hizo uso de la misma técnica (37)(38)(39) con alguna anterioridad, no obstante lo cual los trabajos de Hennessy y Cerecedo tuvieron mayor trascendencia.

Se ha usado para ello Takadiastasa (40)(41)(42), amilasa, clara de yema de huevo; particularmente en productos amiláceos (41)(42).

Hennessy y otros (43) han comparado varias marcas comerciales de preparaciones enzimáticas y encontraron que presencia de iones Al, Hg (100) y Fe (100) inhiben la hidrólisis, mientras que iones ferrosos la activan.

Estos autores hallaron interferencias fluorescentes en el extracto isobutanolico y determinaron una técnica de adsorción en Decalco que dió resultados satisfactorios.- El Decalco es una zeolita sintética provista por The Permutite Co. (44)(45)(46).- La vitamina pudo ser satisfactoriamente eluida con solución de nitrato de sodio.

Actualmente el eluyente ha sido reemplazado por una solución clor-

hídrica 0,1 N de cloruro de potasio, al 25 %.

Como variante al método comentado, se antepone a la hidrólisis enzimática una hidrólisis ácida (47), por calentamiento en medio sulfúrico a 120 °C. (15 lb. de presión en autoclave) durante veinte minutos.

La purificación se hace en la misma columna de adsorción, por lavados sucesivos con agua caliente (80 °C.) hasta que los líquidos de lavado sean incoloros, previamente a la elución ácida.

El Decalco debe ser activado según una técnica que se verá más adelante, al ser descrito el método.

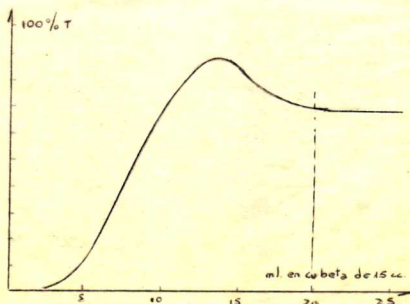
La recuperación se realiza mediante eluciones hasta reacción negativa de tiamina y lavados con agua calentada a 80 °C. hasta reacción negativa de cloruros con NO_3Ag 0,1 N.

La sensibilidad del método fluorimétrico permite el dosaje en materiales que contengan 0,2 a 2,5 mgr. de tiamina.- El método colorimétrico exige cantidades mucho mayores (de 15 a 100 mgr.).

La precisión depende, entre otros factores, del fluorímetro utilizado.

El autor ha determinado, además, que existe una gran sensibilidad al volumen de fase isobutanólica escurrido a la cubeta de lectura, por lo cual es necesario tener muy en cuenta este factor.

Utilizando una solución fluorescente proveniente de 1 mgr./ml. de tiamina obtuvo las siguientes variaciones fluorescencia-volumen, utilizando un fluorímetro Lumetrón modelo 402EF:



c) Técnica1) Reactivos

Hidróxido de sodio 15 %: disuelva 15 gr. de NaOH (perlas) en agua destilada y diluya hasta 100 ml.

Ferriamuro de potasio 1 %: disuelva 1,0 gr de $\text{Fe}(\text{OH})_6\text{K}_3$ en agua destilada y diluya a 100 ml.- Este reactivo es estable indefinidamente si se lo conserva en frasco caramelo y en heladera.

Ácido clorhídrico 0,1 N: diluya 8,5 ml. de ClH concentrado a 1000 ml. con agua destilada.

Ácido sulfúrico 5 N: diluya 140 ml. de SO_4H_2 Concentrado a 1000 ml. con agua destilada.

Acetato de sodio 2,5 N: disuelva 205 gr. de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ anhidro ó 345 gr. $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y lleve el volumen a 1000 ml.

Isobutanol: de grado fluorimétrico.- En su reemplazo puede usarse la fracción de isobutanol técnica que destila entre 105 y 108 °C.- La fracción debe ser secada por agitación con perlas de NaOH , decantada y redestilada.- Los destilados anteriores a 105 °C. contienen apreciable cantidad de agua.

Solución de ensima: se prepara diariamente por agitación de 6 gr. de Takadiastasa (Parke-Davis & Co., Detroit, Mich..) con acetato de sodio 2,5 molar hasta completar 100 ml.- Puede usarse también Glarasa, Mylase u otras fosfatasa.

Solución ácida de Cloruro de Potasio al 25 %: disuelva 250 gr de ClK en agua destilada, agregue 8,5 ml. de ClH conc. y diluya a 1000 ml. con el mismo solvente.

Decalco activado: debe usarse una mezcla de lo que queda retenido entre mallas 30-50 y 60-80 por partes iguales.- Debe activarse como sigue:

A 100 gr de Decalco agregue 200-250 ml. de ácido acético al 3 %, caliente, agite 10-15 minutos, deje decantar y, elimine el líquido.

Repita el tratamiento con solución ácida de cloruro de potasio 25 %, caliente, y luego con solución acética caliente.

Lave con agua destilada caliente hasta eliminación de cloruros con NO_3Ag 0,1 N.- Seque a temperatura ambiente o a cualquier temperatura menor de 100 °C.

Existen otros métodos de activación (44).

Solución standard de Vitamina B₁: debe contener 5 mgr./ml., en solución ácida 0,1 N de ácido sulfúrico.- 5 ml. de esta solución se diluyen a 25 con 0,1K ácido 25 % y 5 ml. se usarán en la técnica como testigo de la adsorción cromatográfica en Decalco.

2) Extracción e hidrólisis

Pese 12,0 gr. de muestra (alrededor de 12 mgr. totales), páselos a un erlenmeyer de 250 ml. y agregue 100 ml. de ácido sulfúrico 0,1 N.- Para preparar esta normalidad puede usarse SO_4H_2 5 N en proporción de 2 ml. por cada 100 ml. a preparar.

Corra un testigo con 5 ml. de solución standard de tiamina (5 mgr./ya preparada).

Agite hasta humedecer bien la muestra y coloque durante 20 minutos en autoclave a 15 lb. de presión.

Deje enfriar con agitación constante.

Agregue acetato de sodio 2,5 M hasta viraje del verde de bromo cresol (pH aproximado 4,5).

Agregue 2 ml. de solución de enzima e incube toda la noche a 50 °C.

Deje enfriar con agitación constante y filtre al vacío por papel de filtro W.Nº 3.- Lave el residuo con pequeñas porciones de agua destilada y una los lavados al filtrado.

3) Purificación

Haga pasar la totalidad del filtrado por una columna de adsorción de Decalco de 6 cm. de largo y 0,8 cm. de diámetro.

Regule, aplicando vacío, la compresión del adsorbente en forma tal que el líquido fluya por la columna a razón de 1 gota por segundo.

Deseche los adsorbidos.

Lave la columna con agua destilada caliente, en la misma forma, hasta que los lavados pasen incoloros.

Fluya con solución de cloruro de potasio ácida 25 % caliente, recogiendo el eluido en un matraz aferado de 25 ml.; pase eluyente por la columna hasta completar casi ese volumen.

Deje enfriar el líquido contenido en el matraz y enrase con lo mismo.

4) Conversión en tioromo.

Homogéinice bien los eluidos y pase 5 ml. de cada uno a cada uno de 4 erlenmeyers de 125 ml. con tapón de vidrio, esmerilado,

A dos de ellos (activos) agregue 3 ml. de HONa 15 % y homogéinice por rotación durante 10 segundos.

Agregue inmediatamente 3 gotas de $\text{Fe}(\text{ON})_6\text{K}_3$ 1 % y agite por rotación durante 10 segundos.

Agregue inmediatamente 25 ml. de isobutanol y agite energicamente durante 2 minutos.

Trate los otros dos erlenmeyers (inactivos) de la misma forma, pero sin el agregado de $\text{Fe}(\text{ON})_6\text{K}_3$ 1 %.

Pase las emulsiones así obtenidas a tubos de centrifuga de 50 ml. y centrifugue a 500-1000 r.p.m. hasta separar nítidamente las dos capas. Pase 20 ml. de la fase isobutanólica a un erlenmeyer de 50 ml. que contenga 2 ml. de alcohol etílico anhidro.

5) Fluorimetría

Para medir la fluorescencia de los extractos se usa un fluorímetro Lumetron modelo 402EF, provisto de los filtros primario y secundarios correspondientes.- El filtro primario selecciona del haz de luz ultravioleta la radiación de 365 m/ μ . para excitar el tioromo; los filtros secundarios para luz fluorescente son: uno amarillo para retener la luz ultravioleta y otro azul verdoso con el máximo de 470 m/ μ para seleccionar la luz fluorescente azul que va a impresionar las células fotoeléctricas.

Se calibra el aparato con el standard directo (St) en forma tal que obteniéndose el 0 % con isobutanol, el St oxidado (activo) produzca una lectura 100 %.

Se hace notar nuevamente la importancia del total escurrimiento del extracto a la cuba de lectura, para asegurar la uniformidad de ésta.

6) Cálculos.

El resultado final, en mgr. de vitamina B₁/ gr. de muestra, se calcula según la fórmula :

La x CPst = mgr. de Vitamina B₁ como clorhidrato de tiamina / gr.
1st x CPm

donde: La es la lectura de la fluorescencia de la muestra.

1st es la correspondiente al standard.

CPm es la concentración de la muestra hasta la elución.

CPst es la correspondiente al standard, en el mismo punto.

Cálculo de las concentraciones finales:

CPst: se pesaron 100,0 mgr. de clorhidrato de tiamina (U.S.P. Reference Standard) y se diluyeron a 500 ml. con ácido sulfúrico 6,1 N.

5 ml. de esta dilución se llevaron a 200 ml. con el mismo medio.

5 ml. de la segunda dilución se llevaron a 25 ml. con solución ácida al 25 % de ClK.

$$\frac{0,1000}{500} \times \frac{5}{200} \times \frac{5}{25} = 1 \text{ mgr./ml.}$$

CPst: 5 ml. de la segunda dilución del standard anterior se pasan por la columna de adsorción y el eluido se lleva a 25 ml.- En consecuencia, la concentración final es igual a la del st: 1 mgr./ml.

CPm: en todos los casos, la pesada de muestra - 12,0 gr. - se pasó por columna y el eluido se llevó a 25 ml.; es decir:

$$\frac{12,0}{25} = 0,48 \text{ gr./ml.}$$

<u>Muestra</u>	<u>Pesada (gr.)</u>	<u>Conc. final (gr/ml)</u>
I	12,0011	0,4800
II	12,0002	0,4800
III	12,0097	0,4804
IV	12,0030	0,4801
V	12,0010	0,4800

7) Experimental

	Lecturas de activos			Lecturas de inactivos			Lectura Final.	resultados.
	L ₁	L ₂	Prom.	L ₁	L ₂	Prom.	L	Wogr/t.R
St	100,0	100,0	100,0	1,2	1,0	1,1	98,9	—
St ₁	96,1	96,4	96,3	1,2	1,3	1,3	95,0	—
I	28,4	28,4	28,4	2,7	2,6	2,7	25,7	0,56
II	17,2	17,9	17,5	1,2	1,2	1,2	16,3	0,36
III	4,2	3,6	3,9	3,4	3,4	3,4	0,5	0,01
IV	66,2	66,0	66,1	8,0	7,2	7,1	59,0	1,29
V	18,0	18,5	18,3	3,7	3,4	3,6	14,7	0,32

d) Resultados obtenidos y comentarios

Muestra N°	Alga	Wogr./gr. sobre muestra	
		tal cual	anhídrea
I	Macrodictya pyrifera	0,56	0,68
II	Lessonia flavicans	0,36	0,41
III	Lessonia fassia	0,01	0,01
IV	Iridea laminaroides	1,29	1,46
V	Iridea cordata	0,32	0,36

Se ha determinado vitamina B₁ por el método de Jansen, según una modificación de Hennessy y Oercedo que permite dosar también la tiamina combinada como co-carboxilasa; esta modificación incluye además la purificación de los extractos por adsorción en Decalco activado.

Se ha corrido un estándar interno que permite calcular un rendimiento de la operación de 96 %; esta cifra indica una alta recuperación si se tiene en cuenta que incluye una cromatografía por columna.

Al extraer las muestras en medio sulfúrico (extracción e hidrólisis)

sis ácida), las número IV y V formaron un coloide resistente a los tratamientos ácidos más intensos, pero no al tratamiento térmico posterior que lo destruyó casi totalmente.- Los últimos vestigios de gelificación se eliminaron después del ataque diastásico; es por esa razón que se recomienda en todos los casos una enérgica y repetida agitación, con el fin de asegurar la extracción de la vitamina, probablemente deficiente en las primeras etapas..

En cuanto a las muestras restantes, el problema fué similar, pero menos intenso.

Respecto de los resultados obtenidos, son perfectamente reproducibles pese a tratarse de valores muy pequeños dada la alta sensibilidad del método empleado.

e) Bibliografía

- 1) Sherman H. O. y Artmayer J. H.- J. Biol. Chem. 75, 207 (1927).
- 2) Macrae T. F.- Bull. Org. Nac. Soc. Sci. Nat. 9, 389.1940/1.
- 3) Williams R. R.- J. Am. Med. Ass. 11, 730 (1935).
- 4) Beadle B., Greenwood D. y Krabill H.- J. Biol. Chem. 149, 339 (1943)
- 5) Kinnersley H. N., O'Brien J. R. y Peters R. A.- Biochem. J. 29, 701 (1935).
- 6) Wintersteiner O., Williams R. R. y Ruehle A. E.- J. Am. Chem. Soc. 57, 517 (1935).
- 7) Smakula A.- Z. Physiol. Chem. 230, 231 (1934).
- 8) Peters R. A. y Phillipot I.- Proc. Roy. Soc. (London) B113, 48 (1937)
- 9) Holiday A. R.- Biochem. J. 29, 718 (1935).
- 10) Williams R. R., Ruehle A. E. y Finkelstein J.- J. Am. Chem. Soc. 59, 526 (1937).
- 11) Uber F. M. y Verbrugge F.- J. Biol. Chem. 134, 273 (1940).
- 12) Lohman K. y Schuster P.- Bioch. Zeit. 294, 188 (1937).
- 13) Lipman F.- Nature 140, 849 (1937).
- 14) Tauber H.- Science 86, 594 (1937).
- 15) Kinnersley H. W. y Peters R. A.- Biochem. J. 28, 667 (1934).
- 16) Kinnersley H. W. y Peters R. A.- Biochem. J. 32, 1516 (1938).
- 17) Bergel F. y Todd A. R.- J. Chem. Soc. 1904, año 1937.
- 18) Baransi A. D.- Anal. farm. bioquim., Bs. As., 11, 115 (1940).
- 19) Prebluda H. J. y Mc. Collum E. V.- Science 84, 488 (1936).
- 20) Prebluda H. J. y Mc. Collum E. V.- J. Biol. Chem. 127, 495 (1939).
- 21) Melnick D. y Field H.- J. Biol. Chem. 127, 505-515 y 531, (1939).
- 22) Melnick D. y Field H.- J. Biol. Chem. 130, 97 (1939).
- 23) Emmett A. O., Peacock C. y Brown R. A.- J. Biol. Chem. 135, 131 (1940)
- 24) Hochberg M., Melnick D. y Oser B. L.- Cereal Chem. 22, 83 (1945).
- 25) Jansen B.- Rec. trav. chim. 55, 1046 (1936).
- 26) Hennessy D. J. y Cerecedo L. R.- J. Am. Chem. Soc. 61, 179 (1938).
- 27) Peters R. A.- Nature 135, 107 (1935).
- 28) Kinnersley H. N., O'Brien J. R. y Peters R. A.- Biochem. J. 29, 2369 (1935).
- 29) Barger G., Bergel F. y Todd A. R.- Nature 136, 259 (1935).

- 30) Westenbrink H. G. y Goudsmit J.- *Rec. trav. chim.* 56, 803 (1937).
- 31) Karrer P. y Kuhl U.- *Helv. Chim. Acta* 20, 369 (1937).
- 32) Goudsmit J. y Westenbrink H. G.- *Nature* 139, 1108 (1937).
- 33) Westenbrink H. G. y Goudsmit J.- *Nature* 142, 150 (1938).
- 34) Booth R.- *J. Soc. Chem. Ind.* 59, 131 (1940).
- 35) Hills G. M.- *Biochem. J.* 33, 1966 (1939).
- 36) Kinnersley H. W. y Peters R. A.- *Biochem. J.* 33, 697 (1938).
- 37) Tauber H.- *J. Biol. Chem.* 123, 479 (1938).
- 38) Tauber H.- *J. Biol. Chem.* 125, 191 (1938).
- 39) Weyl J. y Tauber H.- *J. Am. Chem. Soc.* 60, 2263 (1938).
- 40) Clausen D. P., Brown R. E.- *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 15, 100 (1943).
- 41) Conner R. T. y Straub G. J.- *Ind. Eng. Chem./Anal. Ed.*, 13, 380 (1941).
- 42) De Caro L. y Butturini L.- *Boll. soc. ital. biol. sper.* 15, 404 (1940).
- 43) Hennessy D. J. y otros.- Vitamin program, Abs. 101 st. meet. Am. Chem. Soc. (1941).
- 44) Cerecedo R. C. y Hennessy D. J.- *J. Am. Chem. Soc.* 59, 1617 (1937).
- 45) Cerecedo R. C. y Kassaba F. J.- *J. Am. Chem. Soc.* 59, 1619 (1937).
- 46) Cerecedo R. C. y Thornton J. J.- *J. Am. Chem. Soc.* 59, 1621 (1937).
- 47) United States Pharmacopeia XIV, pag 811, traducción castellana de 1950.
- 48) Brown R. E., Ham J. C. y Harrison M. E.- *J. Biol. Chem.* 151, 153 (1943).

VITAMINA B₂

La vitamina B₂ se llama también riboflavina (nombre americano) y lactoflavina (europeo).

Sherman la designó como vitamina G, nombre que sólo se conserva con valor histórico como los de hepatoflavina y ovolavina.

A) Antecedentesa) Características biológicas

La forma fisiológicamente activa es la flavoproteína, conocida como fermento o enzima amarilla de Warburg.

Este fermento amarillo toma parte en las reacciones de óxido-reducción celular, si bien otras flavoproteínas son mucho más activas a ese respecto (1).- Se conocen en la actualidad 10 enzimas amarillas que son flavinas unidas a proteínas específicas.

Las flavoproteínas actúan en general como dehidrogenasas y contienen un mononucleótido o un dinucleótido.

Para actuar como vitamina, la riboflavina tiene que estar bajo la forma fosforilada.- La fosforilación se hace en el intestino y tal vez en el hígado.

Los animales superiores no son capaces de sintetizarla; los rumiantes, gracias a la presencia en el rumen de abundante flora bacteriana que la produce sintéticamente, no presentan señales de carencia en avitaminosis experimental.

Algo semejante ocurre con el hombre debido a la producción bacteriana en el intestino (2).

Para que el pigmento amarillo se hidrogene, pasando a leuco-derivado, debe actuar un cofermento, las cohidrasas I y II, constituidas por adenina, ácido fosfórico, pentosa y, respectivamente, nicotinamida y ácido nicotínico.

El cuadro carencial se denomina arriboflavinosis.- Los primeros síntomas aparecen a los tres meses de iniciada la avitaminosis, con queilosis y palidez de la mucosa labial, en las comisuras, que se agravarán

por formación de fisuras.

Otras consecuencias son: glositis, queratitis intersticial (invasión de la córnea por parte del plexo vasculocapilar pericorneal); congestión conjutival, fotofobia con disminución de la agudeza visual, seborrea y dermatitis general.

Pueden también aparecer cataratas, y estas lesiones del cristalino son - a diferencia de las demás - irreversibles.

Recientemente se han descrito también lesiones de degeneración grasa en el hígado.

Estos cuadros, descriptos como avitaminosis B₂, aparecen con relativa frecuencia en los enfermos pelagrosos.

Es fundamental para la función visual, y no solamente de la retina, sino en general de los diferentes órganos oculares, preferentemente el cristalino.- Por lo menos la función retiniana no puede realizarse sin la participación directa de las vitaminas A y B₂, con seguridad, y de la C con muchas probabilidades.

La necesidad del organismo humano no está aún bien establecida, aunque puede aproximarse como cifra valedera una dosis diaria de 1 a 3 mgr.

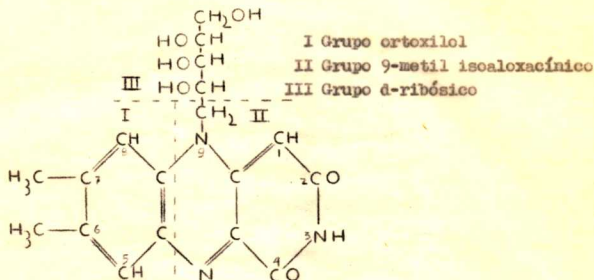
La hiperdosificación, aun siendo alta y sostenida, no determina en el hombre cuadros tóxicos.

La riboflavina es la única sustancia natural conocida que posee actividad de vitamina B₂.

La eficiencia de la vitamina se mide directamente en mgr. de riboflavina, en lo que respecta al uso terapéutico común.- Otra unidad de eficacia es la de Bourquin-Sherman: 1 mgr. de riboflavina equivale a 400 U.

b) Características químicas y físicas

La obtención sintética de la vitamina B₂ por Kuhn y colaboradores en 1935, y Karrer y los suyos en 1935 (3) y 1936 (4), demostró la exactitud de la siguiente fórmula:



Riboflavina ó 6-7-dimetil-9-(d-l'-ribitol) isoxaloxazina.

La fosforilación se produce por la esterificación del OH alcohólico con una molécula de PO_4H_3 .

La sustitución de los -H de los carbonos 6 y 7 es indispensable para la actividad vitamínica; la ausencia de sustituyentes es acompañada de alta toxicidad (3) y disminución de dos tercios de la actividad para uno de ellos, y del total para ambos.

El imino grupo no sustituido en la posición 3 es también necesario; sustituido el hidrógeno por alquilación desaparece la acción sobre el crecimiento.

Se presenta como agujas finas (cristalinas), de color amarillo anaranjado, que funden a 282 °C. con descomposición (oscurecen a 240 °C).

Es poco soluble en agua (0,012 gr./100 ml.) como compuesto puro; las preparaciones impuras son más solubles.

La solución acuosa es amarillo verdosa, y fluorescente.

Sustituídos los OH del grupo ribosa pierde totalmente la solubilidad.

Es aun menos soluble en etanol (0,0045 gr./100 ml.) absoluto, e in-

soluble en éter etílico, acetona, benceno, hexano y cloroformo.

Es más soluble en soluciones ácidas, pero deja de ser fluorescente.

En solución alcalina es muy soluble, y también en este caso pierde la fluorescencia que le es característica.- Ello ocurre por cambio de posición de un hidrógeno, que pasa del grupo imino al vecino oxo, con formación de un enol.

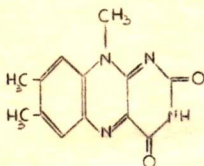
El máximo de intensidad de la fluorescencia se obtiene entre pH 3 y 9; entre 7,0 y 10,2 ésta disminuye en un 50 % (6).

La fluorescencia, que se usa para la determinación cuantitativa, tiene un máximo de radiación de 565 m μ ., y es óptima entre pH 6,7 y 6,8.

Tiene caracter anfótero, con el punto isoelectrico a pH 6.

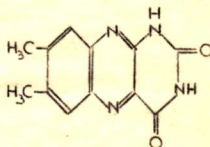
La irradiación con luz ultravioleta (7) (8) de soluciones alcalinas produce lumiflavina, y la de soluciones ácidas lumicromo, caracterizándose este último por una intensa fluorescencia azul.

El espectro de fluorescencia de la lumiflavina es casi el mismo que el de la riboflavina.



Lumiflavina

6,7,9-trimetil
isoxaloxazina.



Lumicromo

6,7-dimetil
aloxazina.

En estado cristalina, y protegida de la acción de la luz, es estable a temperatura ambiente.- La luz destruye lentamente su actividad en cualquier condición.

Es esencialmente inestable en solución; la descomposición es grandemente influenciada por la luz, la temperatura y el pH de la solución.

El efecto de estos factores ha sido estudiado por Conner y Straub, a quienes pertenecen los valores que se dan a continuación (9):

Naturaleza de la iluminación	pH de la solución	Pérdida de vitamina B ₂ en diferentes intervalos			
		1 día	2 días	5 días	7 días
Luz difusa	2,2	40 %	96 %	98 %	-
	4,0	84 %	96 %	96 %	-
	6,0	82 %	94 %	98 %	-
	8,0	72 %	96 %	96 %	-
Luz artificial	2,2	12 %	16 %	16 %	29 %
	4,0	15 %	37 %	60 %	78 %
	6,0	16 %	38 %	58 %	79 %
	8,0	23 %	37 %	55 %	75 %
Oscuridad	2,2	-	-	-	0 %
	4,0	-	-	-	0 %
	6,0	-	-	-	0 %
	8,0	-	-	-	0 %

La concentración inicial es de aproximadamente 50 mgr./ml. (9).

Posee un grado relativamente alto de termoestabilidad; en soluciones ácidas se produce sólo ligera destrucción luego de calentar 6 horas a 120 °C. y 15 lb. de presión.

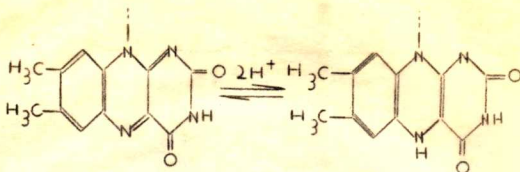
En soluciones alcalinas, pH mayor de 8, se destruye relativamente pronto, aún a temperatura ambiente.

Es estable a los ácidos fuertes y a la mayoría de los agentes oxidantes (agua oxigenada, agua de bromo, ácido nítrico etc.) a excepción del ácido crómico - por supuesto, entre los comunes.

El permanganato de potasio la destruye según el medio: en medio acético 0,1 N la oxida a temperatura ambiente en 10 minutos, pero a pH 4,5 la pérdida en ese lapso es menor del 10 %.

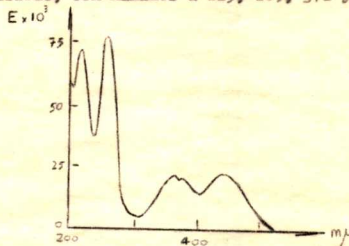
Si bien es estable al agua oxigenada, es descompuesta por ella en presencia de iones ferrosos.

El hidrógeno nascente, hidrosulfito de sodio, cloruro titanoso, cloruro estañoso y sulfuros alcalinos la reducen reversiblemente a leucobase:



La oxidación se produce fácilmente, por agitación de la solución reducida en atmósfera común.

Tiene un espectro de absorción que se extiende desde el ultravioleta a la zona visible, con máximos a 225, 269, 372 y 445 m μ .



La extinción molecular a 267 m μ . es $7,6 \times 10^4$.

La riboflavina fosforilada puede separarse de la vitamina libre según técnica de Kummer, basada en que el alcohol bencílico sólo extrae la flavina libre (10).

Combinada con proteínas no se extrae de sus fuentes naturales por solubilidad en agua, haciéndose necesaria la hidrólisis ácida.

Las tierras de infusorios (Supersorb, Florisil) la adsorben en medio ácido, de donde se la eluye, y la frankonita en medio alcalino, con difícil elución.

El Decalso, las permutitas y zeolitas sintéticas en general no la adsorben.

B) Desarrollo del método de determinación

a) Determinación química y/o física en general y elección del método.

No se utilizan, y practicamente no existen, métodos químicos para la determinación cuantitativa de vitamina B₂.

Entre los métodos físicos, la espectrofotometría visible o ultravioleta sólo es aplicable a compuestos puros o conocidos, a causa de su baja especificidad.

Emmerie, modificando una técnica de Koschura, obtuvo buenos resultados purificando previamente por adsorción en sulfuro de plomo, en medio neutro, y elución con una mezcla de agua-piridina-acetona.

El sulfuro de plomo adsorbe la riboflavina selectivamente.

Los métodos polarográficos no han dado buenos resultados mas que con soluciones de vitamina pura (11).

Otro método preconizado fué el basado en la conversión en lumiflavina, por irradiación de soluciones alcalinas, seguido de extracción cloroformica de la solución acidificada y posterior determinación de la intensidad de la fluorescencia (12).

La seguridad que ofrece este método es limitada, dado que la conversión en lumiflavina no es cuantitativa y deben, en consecuencia, hacerse otras determinaciones adicionales (medida de la velocidad de transformación de una solución de potencia conocida y aproximada a la de la sustancia problema, y agregado a ésta de una cantidad conocida de vitamina B₂).

Kuhn y colaboradores usaron la primera parte de esta técnica (transformación en lumiflavina y extracción), midiendo luego la intensidad de la absorción a 470 m μ ., longitud de onda en la cual tiene un coeficiente de extinción - 1 %, 1 cm.- de 430.

Las soluciones de lumiflavina en cloroformo son muy estables; la intensidad del color no varía en 8 semanas.

El método universalmente utilizado es el fluorimétrico directo, que se basa en la medición de la fluorescencia de soluciones a pH 6-7 (13)(14) cuyas características se darán más adelante.

b) Método fluorimétrico (13)(14)Fundamento y comentarios.

Se basa en la medición de la fluorescencia verde que producen las soluciones de vitamina B₂, cuando ésta es excitada por luz de 430-440 m μ ; la luz fluorescente producida es de color verde, con el máximo de intensidad de radiación a 565 m μ .

La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de vitamina B₂ entre 0,013 y 0,130 mgr./ml.(9).

Según distintas técnicas, pueden usarse como patrones de comparación soluciones conocidas de riboflavina (15), de fluoresceína (16), o vidrios de uranio standardizados (17).

Con respecto a los límites de concentración indicados, es conveniente trabajar en la menor concentración permitida por el aparato de medición para evitar la interferencia de impurezas que absorban radiación.

El autor ha obtenido excelentes resultados con este método, para concentraciones entre 0,08 y 0,16 mgr./ml..

Deben evitarse, de cualquier forma, las concentraciones superiores, pues empieza entonces a influir el "quenching effect" (disminución de la proporcionalidad entre la fluorescencia y la concentración, con ensangüamiento de la primera).

También influye en la fluorescencia la presencia de ciertos aniones, tales haluros, cianuros, tiocianatos, sulfitos y nitritos (18).

Sales ferrosas y férricas tienen un efecto similar al de la concentración elevada (18).

Una técnica que ha producido excelente concordancia con los datos de los ensayos biológicos consiste en hidrolizar enzimáticamente, extraer con agua y determinar la fluorescencia del extracto en base a las características mencionadas (19).

Hodson y Morris (15) extraen la riboflavina con ácido sulfúrico 0,25 N; el Collaborative Committee (Res. Corp. Coll. Comm.) sugiere un autoclavado con ácido sulfúrico 0,1 N, mientras que Conner y Straub (9) usan ácido sulfúrico 0,04 N en baño de agua ebullente.

Otros ácidos han sido usados; por ejemplo el ácido fosfórico diluido (20) y el ácido clorhídrico 0,1 N (21).

Boyd, Terry y Andrews utilizan el autoclavado en agua destilada y posterior digestión con takadiastasa (22).

Para tejidos animales, se ha encontrado que arroja mejores resultados de extracción el uso de enzimas proteolíticas que el autoclavado ácido.

El autor ha obtenido buenos resultados en polivitamínicos, autoclavando en medio ácido, de SO_4H_2 0,1 N, y digiriendo luego con diastasa.

La eliminación de interferencias, fundamentalmente pigmentos fluorescentes, ha sido objeto de estudios exhaustivos.

Ferrebee adsorbe sus extractos en Floridina activada termicamente (23); otro medio adsorbente efectivo es el Supersorb (14).- En ambos casos la elución se hace con solución acética de piridina.

Koschura (24) elimina luego las últimas trazas de interferentes por oxidación con permanganato de potasio; el exceso de permanganato se elimina con agua oxigenada.

Hodson y Morris (15) reducen los pigmentos con hidrosulfito de sodio y cloruro estañoso.- El hidrosulfito reduce la riboflavina a leucobase no fluorescente, y el cloruro estañoso hace lo mismo con los pigmentos fluorescentes no-riboflavina, pero en forma irreversible y sin alterar la vitamina B_2 .- La leucobase de ésta se reoxida luego fácilmente, por agitación.

En productos pobres en vitamina, se recomienda la oxidación con permanganato y eliminación de éste con agua oxigenada, seguido de reducción con hidrosulfito y cloruro estañoso (19).

Algunos autores obtienen sus blancos basándose en que a pH 11,0 la riboflavina pierde su fluorescencia.

Las características de las muestras en análisis han inducido al autor a adoptar todas las medidas posibles que tiendan a aumentar la especificidad del método, por lo cual ha adoptado la técnica dada en los "Methods of Vitamin Assay", con algunas modificaciones de adaptación, que incluye la oxidación con $\text{KNO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$, adsorción en Florisil con posterior elución con piridina acética y reducción con $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2\text{-Cl}_2\text{Sn}$.

Se incluye además el doble hidrolizado, ácido y diastásico.

En lo que respecta al uso de standards de comparación, el autor prefiere el uso de una solución de concentración conocida, reducida con $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ solamente para el blanco de standard.

Existen tablas de correlación entre soluciones de riboflavina y fluoresceína sódica.

Vitamina B ₂	Fluoresceína sódica	Solución 0,001 % de fluoresceína, llevada a 50 ml.
(gr./ml.)	(gr./ml.)	(ml.)
0,1	0,17	0,85
0,2	0,34	1,70
0,3	0,54	2,55
0,4	0,68	3,40
0,5	0,86	4,30
0,6	1,03	5,15
0,7	1,20	6,00
0,8	1,37	6,85
0,9	1,54	7,70
1,0	1,72	8,60

Otros sistemas de comparación incluyen el uso de standards de vidrio fluorescente.

c) Técnica1) Reactivos

Ácido sulfúrico 0,1 N: Diluya 2,8 ml. de SO_4H_2 concentrado a 1000 ml. con agua destilada.

Acetato de sodio 2,5 M: Disuelva 205 gr. de CH_3COONa ó 340 gr de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y diluya a 1000 ml.

Solución de enzima: Disuelva 3 gr. de takadiastasa en 50 ml. de acetato de sodio 2,5 M.- Prepare esta solución diariamente.- Pueden usarse otras marcas de enzima: Polidase, Olarasa o Mylase.

Permananganato de potasio 4 %: Disuelva 4 gr. de KMnO_4 en agua destilada y lleve a 1 litro.

Agua oxigenada al 3 %: se prepara diariamente por dilución 1:10 de la concentrada (30 %).

Florisil: Se usa lo que queda entre mallas 60 y 80.

Ácido acético 2 %: Diluya 2 ml. de CH_3COOH glacial con agua destilada y lleve a 100 ml.

Piridina 20 % en ácido acético 2 %: Diluya 200 ml. de piridina y 20 ml. de ácido acético glacial a 1000 ml. con agua destilada.

Solución standard de Riboflavina: Pese 25 mgr. de droga de potencia conocida, previamente secada 24 horas al vacío sobre SO_4H_2 y transfiera un erlenmeyer, de vidrio antiactínico, de 250 ml.; agregue 200 ml. de agua destilada y 2,5 ml. de ácido acético glacial y agite hasta disolver la vitamina (la disolución es dificultosa; se puede ayudar con calor moderado). Pase la solución a un matraz aforado, antiactínico, de 250 ml. y lleve a volumen con agua destilada.- Diluya 10,0 ml. de esta solución a 1000 ml. con agua destilada: la concentración será así de 1 mgr. de vitamina B_2 por ml.- Diluya 4,0 ml. de esta segunda solución a 25 ml. con piridina acética y la concentración final será de 0,16 mgr./ml..

2) Hidrólisis y extracción

Pese 4,0 gr. de muestra y páselos a un erlenmeyer de 125 ml., antiactínico, y cierre un testigo desde este punto con 5,0 ml. de la primera solución de standard.

Agregue 50 ml. de SO_4H_2 0,1 N y autoclave 20 minutos a 15 lb.

Agregue acetato de sodio 2,5 M hasta viraje del verde de bromocresol

Agite durante 30 minutos.

Agregue 2 ml. de solución de enzima e incube toda una noche a 50 °C. En lo posible, efectúe la incubación bajo atmósfera de nitrógeno. Agite nuevamente, durante 15 minutos.

3) Purificación

Deje enfriar los extractos hasta temperatura ambiente y filtre por buchner, en forma tal de obtener un filtrado claro, y lave el residuo sobre el filtro con SO_4H_2 0,1 N.

Pase el filtrado y los lavados a un matraz aforado, antiactínico, de 100 ml. para las muestras y 500 ml. para el standard interno.

Enrase los matraces de las muestras con agua destilada y pase 25,0 ml. de esta solución a matraz antiactínico aforado de 50 ml..

A estos y al del standard interno de 500 ml., agregue 1 ml. de permanganato de potasio 4 %, o la cantidad necesaria hasta que haya un ligero exceso, y elimine el exceso con 1 ml. de agua oxigenada 3 %, o la cantidad necesaria para decolorar.

Lleve todos los matraces a volumen con agua destilada.

Pase 5 gr de Florisil a tubo de centrifuga de 50 ml. y agregue las siguientes cantidades de las soluciones anteriores:

Standard interno: 8 ml.

Muestras I y II :20 ml.

Muestras III,IV,V : 12 ml.

(Estas cantidades han sido determinadas por la fluorescencia de los extractos purificados, en determinaciones anteriores.)

Agite durante 5 minutos, energicamente, y centrifugue hasta obtener un líquido sobrenadante claro.

Elimine el líquido sobrenadante y agregue 25 ml. de piridina acética

Agite nuevamente 5 minutos, en forma enérgica.

Centrifugue hasta obtener nuevamente un sobrenadante claro y decante a un matraz aforado, antiactínico, de 50 ml.- Si es necesario, filtre.

Lave el residuo con piridina acética y pase los lavados al matraz, hasta enrasar.

4) Fluorimetría

Para medir la fluorescencia de los extractos se usó un fluorímetro

Lumetron, modelo 402FF, provisto de los filtros primario y secundarios correspondientes.- El filtro primario selecciona del haz de luz ultravioleta, proveniente de la fuente luminosa, la radiación de 435 m μ . que va a excitar la riboflavina, y los secundarios absorben, entre la cubeta y las fotocélulas, toda radiación que no sea de 565 m μ .

El aparato se llevó a 100 con la solución de standard de 0,16 mgr. por ml. (St) y a 0 con la misma solución, reducida con hidrosulfito de sodio. Una punta de espátula de droga en polvo es suficiente.

La fluorescencia de las muestras se determinó sobre las soluciones tal cual y reducidas.

5) Cálculos

El resultado final se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{I_m \times QF_{st}}{I_{st} \times QF_m} = \text{mgr. de Riboflavina por gramo de muestra.}$$

donde:

I_m es la fluorescencia de la muestra.

I_{st} es la fluorescencia del st; para el cálculo se usará el st. interno.

QF_m es la concentración final de la muestra.

QF_{st} es la concentración final del standard.

Cálculo de las concentraciones finales:

QF_{st} : se pesaron 25,0 mg. de riboflavina (U.S.P. Reference Standard), y se diluyeron a 250 ml. en medio acético.- 10 ml. de esta solución se llevaron 1,000 ml.- 4 ml. de esta solución se llevaron a 25 ml.

$$\frac{0,0250}{250} \cdot \frac{10}{1,000} \cdot \frac{4}{25} = 0,16 \text{ mgr./ml.}$$

QF_m : 5 ml. de la primera dilución del standard anterior se oxidan y se llevan a 500 ml.- 8 ml. de esta solución se adsorben y el eluido se lleva a 50 ml.

$$\frac{0,0250}{250} \cdot \frac{5}{500} \cdot \frac{8}{50} = 0,16 \text{ mgr./ml.}$$

Los valores de este standard serán los usados en el cálculo; el standard anterior sirve como punto de referencia del rendimiento de la técnica.

GM: en todos los casos, la pesada de muestra -4,0 gr.- se llevó a 100 ml.; 25 ml. de esta solución se oxidaron y se llevaron a 50 ml.; 20 ml. de las muestras I y II y 12 ml. de las muestras III, IV y V se llevaron a 50 ml., luego de la adsorción y elución.

$$I \text{ y } II : \frac{4,0}{100} \cdot \frac{25}{50} \cdot \frac{20}{50} = 0,0080 \text{ gr./ml.}$$

$$III, IV \text{ y } V : \frac{4,0}{100} \cdot \frac{25}{50} \cdot \frac{12}{50} = 0,0048 \text{ gr./ml.}$$

<u>Muestra</u>	<u>Pesada (gr.)</u>	<u>Conc. final (gr./ml.)</u>
I	4,0013	0,0080
II	4,0003	0,0080
III	4,0009	0,0048
IV	4,0000	0,0048
V	4,0015	0,0048

6) Experimental

	Valores de fluorescencia						Lectura Final	Resultado
	Lecturas de activos			Lect.de inactivos				
	L ₁	L ₂	Prom.	L ₁	L ₂	Prom.	L	
St	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	-
St ₁	97,6	97,9	97,7	0,2	0,2	0,2	97,5	-
I	98,9	98,5	98,7	0,5	0,6	0,6	98,1	11,9
II	22,2	22,2	22,2	1,3	1,2	1,3	20,9	4,3
III	33,4	33,8	33,6	0,0	0,0	0,0	33,6	6,9
IV	98,9	98,9	98,9	0,4	0,2	0,3	98,6	33,8
V	77,5	77,7	77,6	0,6	0,6	0,6	77,0	15,8

d) Resultados obtenidos y comentarios

Muestra Nº	Alga	Mg/gr. sobre muestra	
		tal cual	anhidra
I	Macrocystis pyrifera	11,9	13,5
II	Lessonia flavicans	4,3	4,8
III	Lessonia fassia	6,9	7,6
IV	Iridea laminaroides	33,8	38,3
V	Iridea cordata	15,8	17,9

Se ha determinado el contenido en vitamina B₂ por medición de la fluorescencia- y comparación- de los extractos purificados.

Los problemas que presenta la extracción ácida de las muestras son en un todo similares a los comentados en este mismo ítem para vitamina B₁.

La purificación de las muestras se realizó por oxidación con permanganato de potasio y posterior adsorción en Florisil.- la elución se hizo con solución acética de piridina.

Se corrió un standard interno que permitió calcular un rendimiento de la operación del 97,5 %, cifra que aboga por la bondad del método.

Los valores obtenidos comparan satisfactoriamente con los que han sido obtenidos en otras muestras por distintos autores.

e) Bibliografía

- 1) Sumner J. B. y Somers G. F.- *Chem. & Meth. of Enzymes*, Acad. Press, pág 244 (1943).
- 2) Najjar V. A. y Holt E.- *Bull. Johns Hosp.* 69, 476 (1941).
- 3) Karrer P. y coautores.- *Helv. Chim. Acta* 18, 476 (1935).
- 4) Karrer P. y Meerwein H.- *Helv. Chim. Acta* 19, 264 (1936).
- 6) Kuhn R. y Moruzzi G.- *Ber. Deut. Chem. Ges* 67, 888 (1934).
- 5) Kuhn R. y Boulanger P.- *Z. physiol. Chem* 241, 233 (1936).
- 7) Williams R. R. y Cheldelin V. H.- *Science* 96, 22 (1942).
- 8) DeMarre L. J. y Brown W. S.- *Arch. Biochem.* 5, 161 (1944).
- 9) Conner R. T. y Straub G. J.- *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 13, 365 (1941).
- 10) Hammett A.- *Nature* 141, 416 (1938).
- 11) Lingane J. J. y Davis O. L.- *J. Biol. Chem.* 137, 567 (1941).
- 12) Euler V. H., Adler E. y Selötsner A.- *Z. physiol. Chem.* 226, 87 (1934).
- 13) Suplee G. C. y coautores.- *J. Dairy Sci.* 19, 215 (1936).
- 14) Karrer P. y Fritzsche H.- *Helv. Chim. Acta* 16, 911 (1934).
- 15) Hodson A. Z. y Norris L. C.- *J. Biol. Chem.* 131, 621 (1939).
- 16) Weisberg S. M. y Levin I.- *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 9, 523 (1937).
- 17) Hand D. B.- *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 11, 366 (1939).
- 18) Ellinger P. y Holden W.- *Biochem. J.* 38, 147 (1944).
- 19) Van Dyne F. O.- *J. Biol. Chem.* 139, 207 (1941).
- 20) Jones W. S. y Christianson W. C.- *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* 30, 270 (1941).
- 21) Wegner M. I., Kemmerer A. R. y Fraps G. S.- *J. Biol. Chem.* 146, 547 (1942).
- 22) Andrews J. S., Boyd H. W. y Terry D. E.- *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 14, 271 (1942).
- 23) Ferrebee J. W.- *J. Clin. Invest.* 19, 251 (1940).
- 24) Koechere W. Z.- *Z. physiol. Chem.* 232, 101 (1935).
- 25) Rabbin S. H., De Ritter E. y otros.- *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 17, 136 (1945).

VITAMINA B₆

La vitamina B₆ o piridoxina (nombre estadounidense) se denomina también adermina (nombre europeo).- Se la ha conocido también como factor complementario, vitamina H de Richardson y Hogan (1), factor antiacrodinia de la rata, factor antidermatítico de la rata, factor Y de Onick (3), factor I de Lepkowsky (4), factor eluido de la levadura (2), y otros.

A) Antecedentes

a) Características biológicas

Se había considerado hasta hace poco tiempo que no era un factor necesario para el hombre, pero actualmente parece fuera de toda duda que la carencia de ella determina un cierto complejo nervioso.

Por lo general la carencia está asociada, en los casos clínicos, a otras carencias del grupo B.

Spies y colaboradores (5) demostraron que habían cuadros de enfermedad de Casal, que aún tratados con las vitaminas B₁, B₂ y PP, no curaban totalmente, quedando algunos síntomas residuales, principalmente de tipo nervioso (insomnio, irritación, dolores abdominales, astenia y marcha atáxica) y que al administrar adermina, en cantidad suficiente, la desaparición de toda la sintomatología era rapidísima.

En general puede decirse que a medida que ascendemos en la escala de los vertebrados, las lesiones pasan del predominio cutáneo -pelagra de la rata- al nervioso y hematopoyético, en el hombre.- Pacientes con pseudohipertrofia muscular distrófica, por ejemplo, responden al tratamiento con piridoxina.

No se conocen de esta vitamina, síndromes por hiperdosificación, por cuanto administrando altas dosis (50-100 mgr.) no se observan manifestaciones de toxicidad.

Dosis de 3 gr./Kgr., letal en ratas, tienen en el hombre efecto sedante.

En cuanto a la constitución química, llama la atención su similitud con el ácido nicotínico, y se ha escrito que de ello puede deducirse

que intervenga activamente en el metabolismo, como enzima, una vez unida a una molécula proteica; esta acción enzimática parece desarrollarse preferentemente en los órganos de origen ectodérmico: piel y estratos cutáneos en la rata, y sistema nervioso en el hombre.

El resultado de un intento de resolver este problema fué negativo: el metil-yodo compuesto de la vitamina B₆ no es reducido a dehidroforma como ocurre con el de la nicotinamida.

La piridoxina interviene en la producción de la hemoglobina, no sólo en la avitaminosis B₆ sino también en otros tipos de anemia, pero el mecanismo íntimo de la acción no es conocido.

Una anemia hipocrómica microcítica aparece también asociada a los otros síntomas de carencia.- Esta anemia es insensible al hierro, cobre y al factor antianémico del hígado.

El piridoxal, compuesto químicamente relacionado, actúa como coenzima en la descarboxilación de los ácidos aminados, y tiene un papel importante en la transaminación.- En los hidrolizados ácidos de productos naturales, la mayor parte de la actividad B₆ se debe al piridoxal y a la piridoxamina.

El piridoxal, la piridoxamina y la piridoxina en inyección endovenosa tienen la misma actividad para el crecimiento y regeneración sanguínea, en perros con deficiencia de piridoxina.

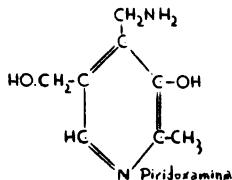
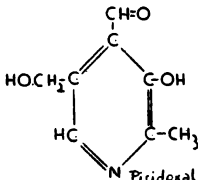
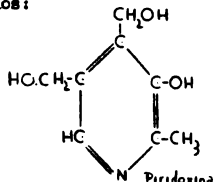
Parece que los ácidos grasos son indispensables para la utilización de la piridoxina por el organismo.- La dermatitis (acrodinia) depende de la mayor o menor proporción de grasa en la dieta.

7,5 mgr. del clorhidrato equivalen a una unidad rata.

b) Características físicas y químicas

Fue reconocida por György y colaboradores como miembro individual del complejo de las vitaminas B en el año 1936 (6)(7)(8)(9)(10)(11) y luego aislada del mismo por investigadores de las escuelas de Keresztesy (12)(13)(14)(15)(16) y Kuhn (17)(18)(19)(20) dos y tres años, respectivamente, más tarde.- Fue cristalizada por Lepkowsky y casi simultáneamente por Keresztesy y Stevens.

Su estructura química es simple; lo mismo que su compuestos relacionados:



Químicamente es la 3-hidroxi-4,5-di(hidroximetil)-2-metilpiridina.

La base libre es un compuesto cristalino, incoloro, de sabor ligeramente picante, que funde a 159-160 °C.

Es muy soluble en agua, y menos en alcohol etílico y acetona; es poco soluble en éter y cloroformo.

Cristaliza en varias formas salificadas, de las cuales las más conocidas son el clorhidrato (P.F. 204-206 °C., con descomposición) y el picrato; el primero es la forma usada comercialmente.

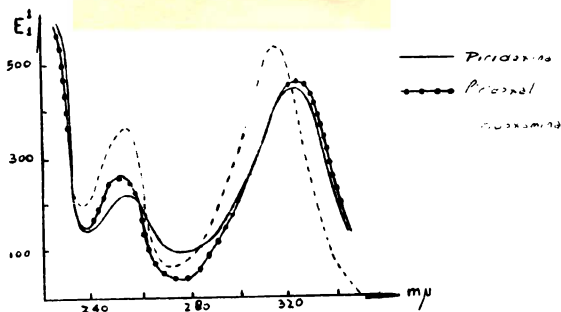
El clorhidrato es muy soluble en agua (22,2 gr./ 100 ml.) y menos en alcohol etílico (1,1 gr./ 100 ml.) y acetona.- La solución acuosa tiene pH aproximadamente igual a 3,2.

Tanto la vitamina como su clorhidrato subliman.

El clorhidrato es estable al calor, ácido clorhídrico concentrado y álcalis; es^{en} cambio destruido por la luz, especialmente la de pequeña longitud de onda.- En solución diluida, a pH 6,8, la pérdida por irradiación es del 50-60 % en doce horas, pero a pH 1,0 la pérdida es mínima luego de nueve horas de exposición a la luz artificial (21).

Es ópticamente inactiva.-

También el espectro ultravioleta depende marcadamente del pH de la solución, aunque el máximo de absorción a 325 m μ . se mantiene constante por lo menos cualitativamente.



Produce un color amarillo anaranjado con cloruro férrico, y azul con el reactivo fenólico de Folín y Denis (23), a causa del hidroxilo fenólico.- Con ácido sulfanílico diazotado (24) o p-aminoacetofenona diazotada (25) produce color anaranjado.

Estas reacciones han sido usadas para su determinación química.

La más importante, analíticamente, es la que produce con 2-6-dicloroquinona-cloroimida, con formación de un complejo color azul, cuyas características serán tratadas más adelante.

B) Desarrollo del método de determinación

a) Determinación química y/o física en general y elección del método

Los métodos se basan en las reacciones coloreadas peculiares de los fenoles aromáticos.- Ya se han mencionado algunas, al hablar de sus propiedades químicas y físicas; todas ellas han sido usadas, con más o menos éxito, en la determinación cuantitativa.

El dosaje con cloruro férrico se basa en el color anaranjado-rojizo que se produce cuando 1 ml. de solución de piridoxina (10-100 mgr./ml.) es tratado con una gota de solución de cloruro férrico al 10%; este método es sólo utilizable en muestras puras o de constitución conocida, (13) (26)

La reacción con el reactivo de Folin y Denis (22) (23), ha sido mencionada por algunos investigadores, pero no fué aceptada por su poca especificidad; esta técnica se basa en el color azul producido por el hidroxilo fenólico y una mezcla de tungstato de sodio, ácido fosfotúngstico, ácido fosfórico e hidróxido de litio, y permite determinar entre 20 y 80 mgr. de piridoxina.

Kmun y co-autores (27) han descripto una técnica según la cual transforman la vitamina en su éter metílico, con diazometano, y luego en su derivado yodado, el yodometilato del éter metílico de piridoxina.- Este compuesto, por calentamiento en medio alcalino, en presencia de alcohol y cloroformo, produce una coloración violeta-violeta de adermína- cuyo máximo de absorción se encuentra entre 555 y 599 m μ .

Es un método muy específico, dado que no se conocen otros derivados de la alfa picolina en tejidos vegetales o animales.

La reacción se produce con un rendimiento de 35-40% y sólo permite determinar cantidades mayores de 800 mgr; en razón de ello, su aplicabilidad es relativa.

Swaminathan (28) (29) ha aplicado la reacción con el ácido sulfanílico y la p-nitroanilina diazotados para el dosaje en tejidos animales y alimentos; la reacción es sensible, y 10 mgr. producen color apreciable.

Bina y coautores (24) (25) usaron, en lugar de p-nitroanilina diazotada, p-amino-acetofenona diazotada, con resultados similares.

En ambos casos las técnicas están limitadas por el largo y trabajoso

tratamiento de purificación: hidrólisis ácida y enzimática, separación de las proteínas con tungstato de sodio, adsorción de la vitamina con superfiltrol a pH 3,0 y elución con alcohol alcalino.

La reacción más utilizada actualmente es la que se produce con 2-6-dicloroquinona-cloroimida, desarrollada por Gibbs en el año 1927.

Stiller, Keresztesy y Sterens (14) observaron que la piridoxina daba resultados positivos, y Scudi (31) la utilizó en forma cuantitativa en el año 1941; a este trabajo original sucedieron muchas investigaciones, que serán descritas en el punto siguiente.

b) Método colorimétrico de Scudi.
Fundamento y comentarios.

Se basa en la medida de la intensidad del color azul que produce la piridoxina cuando en medio buffer, de veronal, es tratada con solución butanólica de 2-6 dicloroquinona-cloroxima.

El máximo de absorción del color producido tiene lugar a $620\text{ m}\mu$; y es proporcional a la cantidad de vitamina presente entre 2 y 40 mgr.

La técnica original de Scudi (31) fué posteriormente estudiada por el mismo y coautores en cuanto a su aplicabilidad (31)(32)(33)(34).

Dado que la tintura se acopla a otras sustancias, Scudi propuso un sistema de reacción bifásico (butanol-agua) y un blanco de reactivos e interferencias que se basa en que agregando un buffer de borato antes de la colorimetría, con lo cual se previene la reacción de la vitamina.

Biró, Vandenbelt y Emmett (35), aplicando la técnica de Scudi a productos farmacéuticos y material biológico, separan la piridoxina de las interferencias por adsorción en Superfiltrol, a pH 3,0 producido por buffer de Mc Ilvain.- Ofrece, además la variante de producir en forma simultánea la copulación y elución, con desarrollo del color con buffer veronal a posteriori, lo cual implica una inversión en el orden de reacción con respecto a la técnica original, la cual copula en el medio veronal.

El autor ha ensayado estas modificaciones en el dosaje de B_6 en productos polivitamínicos y, según su experiencia, no se obtiene ningún desarrollo de color, aún cuando éste se produce al devolver el orden de los reactivos a su secuencia original.

No obstante ello, la intensidad del color no alcanza los valores previstos, ni es satisfactoria la reproducibilidad.

Hoenberg, Melnick y Oser (37)(38)(36) desarrollaron una técnica basada en la copulación de la tintura con la piridoxina en una sola fase.

El uso de un buffer de $\text{HONH}_4\text{-ONH}_4$, de alta basicidad, reduce la interferencia debida a las diferentes clases y cantidades de bases y sales presentes.- En estas condiciones, el blanco de borato provee una corrección cuantitativa para la mayoría de las sustancias que puedan copular con la tintura y la colorimetría es más específica para piridoxina.

La hidrólisis se hace necesaria porque se encontró en el salvado de arroz (39) y en otros materiales biológicos (40), una forma conjugada de

la piridoxina, junto con la vitamina libre.

La hidrólisis puede ser ácida o enzimática; el autor ha creído conveniente la adopción de ambas formas.

Según se dijo, el piridoxal y la piridoxamina están presentes en cantidades variables en muchos productos naturales, y constituyen un considerable porcentaje del contenido de la actividad biológica (41)(42).

Melnick y colaboradores han hecho notar que por su método colorimétrico ya comentado, la piridoxamina y el piridoxal son respectivamente reactivos en un 31 y 16 % con respecto a la piridoxina en mezclas equimoleculares (43).

En general, un método específico para piridoxina no sería satisfactorio dado que frecuentemente la potencia de B_6 está constituida por los tres compuestos.

No obstante esta circunstancia, Ormsky, Fisher y Schlenk (44) encuentran posible distinguirlos en forma individual, por la diferencia de color que se produce en la reacción con ácido sulfanílico diazotado.

En el presente trabajo se adoptará la colorimetría según el método original de Seudí, se eliminarán las proteínas y las grasas por medio de acetona y éter etílico, respectivamente, e interferencias en general por oxidación, por medio de nitrito de sodio (algunas técnicas usan para el mismo fin bióxido de manganeso, pero el primero tiene la ventaja de ser fácilmente eliminable por calentamiento en medio ácido).

c) Técnicas1) Reactivos

Ácido clorhídrico: de grado analítico.

Eter etílico: de grado analítico.

Acetona: de grado analítico.

Hidróxido de sodio al 20 %: disuelva 244 gr. de HONa (perlas) en 1 litro de agua destilada.

Ácido sulfúrico 60 %: diluya 490 ml. de SO_4H_2 concentrado a 1000 ml. usando agua destilada.

Solución de enzima: disuelva 3 gr. de Takadiastasa en 50 ml. de acetato de sodio 5 N. Prepare esta solución diariamente.- Pueden usarse otras marcas de enzima: Polidase, Clarasa o Mylase.

Acetato de sodio 5 N: disuelva 205 gr. de CH_3COONa ó 340 gr. de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y diluya a 500 ml.

Nitrito de sodio 25%: disuelva 5 gr. de NO_2Na en 20 ml. de agua destilada.

Hidróxido de potasio 5 N: disuelva 66 gr. de HOK (perlas) en 200 ml. de agua destilada.

Ácido clorhídrico 0.2 N: disuelva 4,2 ml. de OIH concentrado en agua destilada y lleve a 250 ml.

Solución de 2-6 dicloroquinona-clorovimida: disuelva 0,1 gr. de 2-6 dicloroquinona-clorovimida (Eastman) en butanol normal y lleve a 100 ml.- Transfiera a recipiente de vidrio color caramelo y conserve en heladera.

Buffer Barbital: disuelva 15 gr. de barbital sódico (distilbarbiturato sódico- Merck) en 700 ml. de agua destilada.- Agregue 3 ml. de OIH y lleve a pH 7,6 con OIH 0,5 N (aproximadamente 26 ml.).- Agregue 30 ml. de etanol y homogenice.- Filtre si es necesario.

Solución Standard de Piridoxina: pese 50 mgr. de clorhidrato de piridoxina de potencia conocida a un matraz aforado de 500 ml. usando agua destilada. Agregue 100 ml. de etanol y diluya hasta aproximadamente 490 ml. con agua destilada.- Lleve a pH 6,8 con HONa 0,1 N, lleve a volumen con agua destilada y homogenice.- Diluya 10 ml. de esta solución a 100 ml., con agua destilada.- La segunda dilución contiene 10 mgr. de vitamina $\text{B}_6/\text{ml.}$ y dura por lo menos una semana si se la conserva protegida de la luz y en heladera.

2) Hidrólisis y extracción.

Toda la determinación se llevará a cabo en material de vidrio anti-actínico.

Pese 10,0 gr. de muestra y transfiera a un erlenmeyer de 250 ml.

Agregue 20 ml. de SO_4H_2 N y humedezca bien la muestra.

Autoclave durante 20 minutos a 15 lbs. de presión, agite mecánicamente durante 30 minutos y lleve a pH 4,8 con OH_3COONa 5 N.

Agregue 2 ml. de la solución de enzima e incube toda la noche a 50 °C.

Agite hasta que la muestra haya tomado temperatura ambiente, filtre utilizando vacío, hasta obtener un filtrado claro, lave con 2 porciones de 20 ml. de agua destilada y lleve a pH 6,5-7,0 con HClNa al 20 g.

3) Purificación

Reuna los filtrados y lavados en un erlenmeyer de 500 ml. y agregue 100 ml. de acetona, lentamente, agitando constantemente durante la adición; caliente sobre baño María hasta que el contenido entre en ebullición y mantenga ésta durante 3-4 minutos.

Enfríe a temperatura ambiente y decante a través de papel de filtro Whatman No 4, recibiendo el filtrado en un vaso de ppdo. de 400 ml.

Lave dos veces el residuo que quedó en el erlenmeyer con porciones de 50 ml. de acetona, y una los lavados al filtrado anterior.

Evapore la acetona, sobre el baño María, con corriente de aire; coloque unas perlas de vidrio para evitar la ebullición súbita.

Agregue 1 ml. de ClH conc. y 0,5 ml. de solución de NO_2Na .

Mierva la solución hasta eliminar totalmente el ácido nitroso, usando como indicador papel de almidón-ioduro, y enfríe a temperatura ambiente.

Transfiera la solución a una ampolla de decantación de 125 ml. y lave con tres porciones de 25 ml. de éter etílico, juntando los lavados en otra ampolla similar.

Transfiera la solución lavada a un vaso de ppdo. de 250 ml..

Extraiga los lavados etéreos de la segunda ampolla con 20 ml. de ClH 0,2 N y pase la fase acuosa al vaso de ppdo.- Descarte el éter.

Caliente sobre baño María hasta eliminar el éter emulsionado, enfríe a temperatura ambiente y lleve a pH 7,5 usando para ello HClNa 5 N.

Transfiera a un matras aforado de 100 ml., agregue 20 ml. de buffer

barbital y lleve a volumen con agua destilada.

4) Reacción

Para cada muestra y para blanco y standards, disponga dos tubos de centrífuga de 50 ml. y agregue en ellos las cantidades de reactivos que se indican a continuación, en ese orden:

	Blanco (ml)	Standards (ml)			Muestra (ml)
		St ₁	St ₂	St ₃	
Solución de standard	-	1	2	3	1
Solución de muestra	-	-	-	-	25
Solución de CLK 10 %	2	-	-	-	-
Agua destilada	25	26	25	24	1
Buffer barbital	3	3	3	3	3
Butanol	15	15	15	15	15
Solución de clorocimida	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Tape los tubos con tapón de polietileno o goma, agite vigorosamente y coloque en lugar oscuro durante 5 minutos.- Vuelva a agitar y deje nuevamente en lugar oscuro durante 15 minutos.

Centrifugue hasta obtener dos fases límpidas y deje en reposo, en lugar oscuro, durante 40 minutos.

Pipeteo 10 ml. de la capa butanólica (superior) y pase a tubos que contengan 4 ml. de alcohol absoluto.

5) Colorimetría

mida la absorción de las soluciones butanólicas, a 620 m μ ., llevando a cero de absorción con el blanco preparado.

Se usó un espectrofotómetro Beckman, modelo DU, y células de 1 cm. de paso de luz, Corax.

Disponga la reacción y la colorimetría en forma tal que todos los tubos sean leídos con el mismo intervalo de tiempo, desde el agregado de la clorocimida.

6) Cálculos

Con los valores de absorción obtenidos de la colorimetría de los standards en ordenadas, y la correspondiente concentración de piridoxina de los extractos butanólicos, represente la curva absorción-concentración

de piridoxina, en mgr./ml.

Con la lectura de absorción de la muestra obtenga, del gráfico, la correspondiente concentración de vitamina B₆ en el extracto butanólico.

A este valor reste la concentración que aporta 1 ml. de solución de standard, agregado en la colorimetría, y calcule el resultado según la siguiente fórmula:

$$\frac{Cfm - Cfst}{Cfm} = \text{mgr. de vitamina B}_6 / \text{gr. de muestra, expresados como clorhidrato de piridoxina.}$$

donde:

Cfm: es la concentración de piridoxina en el extracto butanólico, en mgr./ml., encontrada en el gráfico, a partir de la lectura de absorción de la muestra.

Cfst: es la concentración de piridoxina en el extracto correspondiente a la muestra, aportada por 1 ml. de standard.

Cfm: es la concentración de la muestra en el extracto, mgr/ml.

cálculo de las concentraciones finales:

Qm: se pesaron 50,0 mgr. de *piridoxina, CH* U.S.P. Reference Standard, previamente secado a 105 °C., durante una hora.- La pesada se llevó a 100 ml., previo ajuste de pH, y 10 ml. de esta dilución se llevaron a 100 ml. con agua destilada.- De esta segunda dilución 1,2 y 3 ml. entraron en colorimetría:

$$CFst_1 = \frac{0,0500}{100} \cdot \frac{10}{100} \cdot \frac{1}{15} = 3,33 \text{ mgr. vit. B}_6/\text{ml.}$$

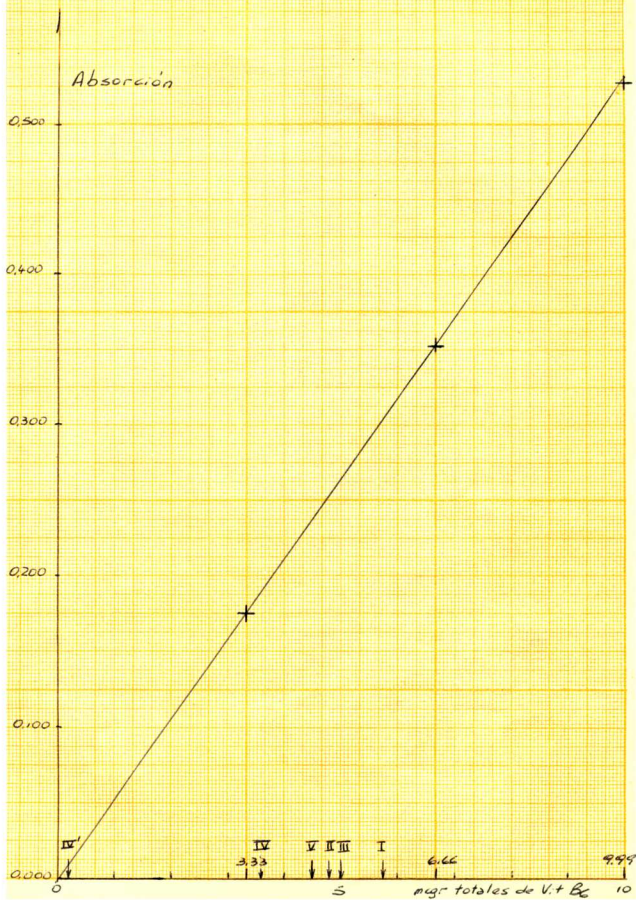
$$CFst_2 = \frac{0,0500}{100} \cdot \frac{10}{100} \cdot \frac{2}{15} = 6,66 \text{ " " " "}$$

$$CFst_3 = \frac{0,0500}{100} \cdot \frac{10}{100} \cdot \frac{3}{15} = 9,99 \text{ " " " "}$$

Qm: en todos los casos, la pesada de muestra-10,0 gr- se llevó a 100 ml., y 25 ml. entraron en colorimetría y fueron extraídos con 15 ml.

$$\frac{10,0}{100} \cdot \frac{25}{15} = 0,166 \text{ gr. de muestra/ml.}$$

Muestra N°	Pesada (gr)	Conc. final (gr/ml)
I	10,0008	0,1666
II	10,0018	0,1666
III	10,0000	0,1666
IV	10,0004	0,1666
V	10,0007	0,1666



7) Experimental

Muestra o Stand.	Absorción a 620 m μ .			C _{PM} obtenida del gráfico	C _{PM} -3,33 mcgr./ml.	Resultado mcgr./gr.
	I ₁	I ₂	Promedio			
St ₁	0,175	0,175	0,175			
St ₂	0,351	0,353	0,352			
St ₃	0,530	0,527	0,529			
I	0,300	0,303	0,302	5,73	2,40	14,4
II	0,253	0,257	0,255	4,80	1,47	8,8
III	0,263	0,266	0,265	5,01	1,78	10,7
IV	0,189	0,187	0,188	3,60	0,27	1,6
IV'	0,009	0,010	0,010	0,20	-	1,2
V	0,238	0,234	0,236	4,50	1,17	7,0

La muestra IV fué hecha por duplicado (IV'), para correr así un testigo sin el agregado de solución standard.

d) Resultados obtenidos y comentarios

Muestra N ^o	Alga	Mcgr/gr sobre muestra tal cual	
		análisis	
I	Macrocyctys pyrifera	14,4	17,6
II	Lessonia flavicans	8,8	9,9
III	Lessonia fassia	10,7	11,9
IV	Iridea laminaróide	1,6	1,8
V	Iridea cordata	7,0	8,1

Se ha determinado vitamina B₆ por el método de Scudi, previa eliminación de proteínas, grasas e interferencias en general, respectivamente por precipitación, extracción etérea y oxidación.

En lo que respecta a la extracción e hidrólisis ácida, caben las mismas consideraciones que se formularon en este mismo ítem para las vitaminas B₁ y B₂.

e) Bibliografía

- 1) Richardson L. R. y Hogan A. G.- Science 63, 17 (1936).
- 2) Edgar U. M. y Macrae T. F.- Biochem. J. 31, 886 (1936).
- 3) Chick H., Copping A. M. y Hoscoe M. H.- Biochem. J. 24, 1748 (1930).
- 4) Lepkowsky T. H., Jukes T. H. y Kanse M. K.- J. Biol. Chem. 115, 557 (1936).
- 5) Spies J. W. y coautores.- J. Am. Med. Assoc. 112, 2414 (1939).
- 6) György P.- Nature 133, 498 (1934).
- 7) György P.- Biochem. J. 29, 741 (1935).
- 8) György P.- Biochem. J. 29, 760 (1935).
- 9) György P.- Biochem. J. 29, 767 (1935).
- 10) Birch T. M., György P. y Harris L. J.- Biochem. J. 29, 2830 (1935).
- 11) Birch T. M., György P. y Harris L. J.- Biochem. J. 30, 304 (1936).
- 12) Keresztesy J. O. y Stevens J. K.- Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 38, 64, (1938).
- 13) Keresztesy J. O. y Stevens J. K.- J. Am. Chem. Soc. 60, 1267 (1938).
- 14) Stiller E. T., y coautores.- J. Am. Chem. Soc. 61, 1237 (1939).
- 15) Harris S. A., Stiller E. T. y Folkes A.- J. Am. Chem. Soc. 61, 1242 (1939).
- 16) Harris S. A. y Folkes K.- J. Am. Chem. Soc. 61, 1245 (1939).
- 17) Kuhn R. y Wendt G.- Ber. 72, 305 (1939).
- 18) Kuhn R., Andersag A. y otros.- Ber. 72, 309 (1939).
- 19) Kuhn R. y coautores.- Ber. 72, 310 (1939).
- 20) Kuhn R. y Wendt G.- Ber. 72, 311 (1939).
- 21) Hochberg M., Melnick D. y Osier B. L.- J. Biol. Chem. 148, 253 (1943).
- 22) Folin O. y Denis S. W.- J. Biol. Chem. 12, 239 (1912).
- 23) Folin O. y Denis S. W.- J. Biol. Chem. 22, 305 (1915).
- 24) Bina A. F., Thomas J. M. y Brown E. B.- J. Biol. Chem., 148, 111 (1943).
- 25) Brown E. B., Bina A. F. y Thomas J. M.- J. Biol. Chem. 158, 455 (1945).
- 26) Greene R. D.- J. Biol. Chem. 130, 513 (1939).
- 27) Kuhn R. y Löw I.- Ber. 72, 1453 (1939).
- 28) Swaminathan K.- Ind. J. Med. Res. 28, 427 (1940).
- 29) Swaminathan K.- Nature 145, 780 (1940).

- 30) Gibbs H. D.- J. Biol. Chem. 72, 649 (1927).
- 31) Scudi J. V.- J. Biol. Chem. 139, 707 (1941).
- 32) Scudi J. V., Koenes H. F. y Keresztesy J. C.- Proc. Exptl. Biol. Med. 43, 118 (1940).
- 33) Scudi J. V., Urna A. y Antopol W.- J. Biol. Chem. 135, 371 (1940).
- 34) Scudi J. V., Bastedo W. A. y Webb T.- J. Biol. Chem. 136, 399 (1940).
- 35) Bird O. D., Vandenbelt J. M. y ~~Rametz~~³ A. D.- J. Biol. Chem. 142, 317 (1942).
- 36) Hochberg M., Melnick D. y Oser B. L.- J. Biol. Chem. 153, 109 (1944).
- 37) Hochberg M., Melnick D. y Oser B. L.- J. Biol. Chem. 155, 119 (1944).
- 38) Hochberg M., Melnick D. y Oser B. L.- J. Biol. Chem. 155, 129 (1944).
- 39) Scudi J. V.- J. Biol. Chem. 145, 637 (1942).
- 40) Siegel L., Melnick D. y Oser B. L.- J. Biol. Chem. 149, 361 (1943).
- 41) Snell E. E.- J. Biol. Chem. 157, 491 (1945).
- 42) Rubin S. H., Scheiner J. y Hirschberg E.- J. Biol. Chem. 167, 599 (1947).
- 43) Melnick D., Hochberg M., Himes H. W. y Oser B. L.- J. Biol. Chem. 160, 1 (1945).
- 44) Ormsby A. A., Fisher A. y Schlenk F.- Arch. Biochem. 12, 79 (1947).

VITAMINA C

El nombre de vitamina C fué propuesto en 1920 por Drummond (1-).

Se llama ácido ascórbico y también vitamina antiescorbútica y ácido cevitámico (2).- Otros nombres, históricos, son: escorbutamina (3) y ácido hemurónico (4).

4) Antecedentes

a) Características biológicas

La carencia continuada de vitamina C en la dieta, determina una serie de trastornos, en los organismos susceptibles, que se conocen en su conjunto con el nombre de escorbuto.

Las primeras manifestaciones suelen presentarse en el sistema óseo, particularmente como dolores en las zonas epifisarias de los huesos largos (extremidades).

Se presentan tumefacciones en las encías que pueden adquirir carácter necrótico, y hemorragias cutáneas, particularmente en las extremidades inferiores.

En general las hemorragias se deben a un aumento de la fragilidad capilar, a causa de dificultades en la formación de la sustancia intercelular, la cual requiere ácido ascórbico.

El estado general se altera muy marcadamente: anorexia, anemia, adelgazamiento, palidez de los tegumentos y mucosas, infecciones cutáneas y de las mucosas (a causa de una insuficiencia inmunitaria) y otros.

El mecanismo de la acción biológica de la vitamina C no se conoce exactamente, pero se sabe positivamente que interviene en los procesos oxidativos del organismo.

Se supone que actúa por medio del grupo di-enólico, que funciona como aceptor de 2-oxígeno en el sistema redox de los tejidos.

Las propiedades anti-escorbúticas se deben a la estructura especial del ciclo lactónico.- Otros productos sintéticos, vecinos del ácido ascórbico (ácidos 3-cetohexónico y heptolactónico) están dotados de actividad biológica, si bien menor.

Los ácidos de la serie "1" del ascórbico, arabo y galacto-ascórbico

son activos, mientras que los de la serie "d" no lo son.

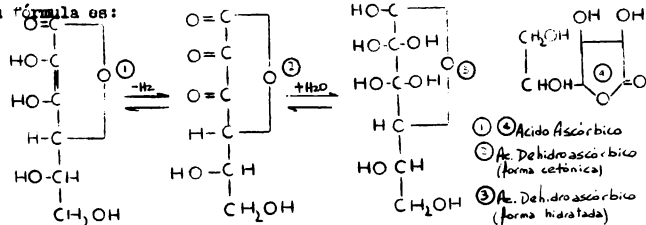
Se ha postulado que existe un sistema enzimático especial que regula la oxidación y reducción de la vitamina C (5)(6).

b) Características químicas y físicas

Su constitución química fue aclarada en el año 1933 por los trabajos de Harris (7), Hirst y Haworth (8), King (9) y Michael y Kraft (10).-

Fue confirmada por síntesis por la escuela suiza de Reichstein (11), y la inglesa de Haworth (8), casi simultáneamente.

Su fórmula es:



Químicamente se denomina: lactona del ácido 1-treo-3-oxo-hexurónico, ó del ácido 1-treo-2-3-4-5-6-pentoxi-hexen-2-carboxílico; también como del ácido 3-oxo-1-gulo-furánico.

Se encuentra como tal en las plantas, y en equilibrio con la forma oxidada y su hidrato, en los tejidos animales.

Mediciones cristalográficas y con rayos X demuestran, en la sustancia cristalina, que la molécula es completamente plana (12)(13)(14).

Crystalliza en agujas microscópicas, de color blanco, que funden a 192°C.

Es muy soluble en agua (1 gr. en 3 ml.), en metanol, en etanol (1 gr. en 50 ml.) y en glicerina (1 gr. en 100 ml.).

Es insoluble en éter, éter de petróleo, benceno, cloroformo, xileno, grasas, etc.-

Es dextrógiro, con un poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} = +24$ en agua y +46 en metanol.

El ácido cristalino es estable al oxígeno del aire y a la temperatura; en cambio en solución, es enormemente lábil en medio neutro o alcalino, y solo relativamente estable en soluciones ácidas -pH 5,6-.

En solución se oxida por acción del oxígeno del aire, y trasas de me-

tales como hierro y cobre (iónicos), y acción de la luz (14), que catalizan la oxidación.- En soluciones libres de esos metales, el aire no lo oxida aún a pH 7,6.

Mohler y Lohr han examinado el efecto del cobre en la estabilidad de las soluciones de vitamina, y encontraron que puede ser eliminado el efecto por adición de pequeñas cantidades de QMK (16).

El ácido dehidroascórbico es estable a pH menor de 4,0; soluciones más alcalinas motivan un reordenamiento molecular irreversible que origina un compuesto similar, pero biológicamente inactivo; si bien la actividad vitamínica original es igual a la de la forma oxidada.

Sus soluciones tienen reacción ácida y características reductoras energías (potencial de oxidación 0,166 Volt a pH 4,0 y 35 °C.).

Reduce el 2-6-diclorofenol-indofenol, iodo, ferricianuro, azul de metileno, licor de Fehling, sales de plata, etc.-

Estas características han sido utilizadas para la determinación química, así como sus propiedades de formar osazonas y ser transformable en furfural.

Con ácido fosfomolibdico, en solución ácida, produce una coloración azul; con ácido monomolibdico-fosfotúngstico produce una coloración violeta que sirvió de base a Bessonoff para establecer un método cuantitativo.

Cuando se calienta con ácido clorhídrico, a ebullición, se produce furfural, el cual puede ser evidenciado por el test del resorcinol.

Con solución saturada de o-dinitrobenceno y alcalinizando luego, produce una coloración violeta estable (16).

Reacciona además con la nicotinamida, ácido nicotínico, y otros derivados piridínicos; lo hace también con las piperidinas, quinolinas e isoquinolinas (17).- Se produce un color amarillo.

Presenta un espectro característico de absorción en la zona del ultravioleta, con un máximo a 265 m μ . (18) y una pequeña banda entre 350 y 400 m μ . (19).

El máximo varía en realidad entre 245 y 265 m μ ., según el solvente utilizado (20) y según el pH de la solución; con el decrecimiento del pH el máximo se corre hacia el lado de las menores longitudes de onda.

B) DESARROLLO DEL METODO DE DETERMINACIONa) Determinación química y/o física en general y elección del método.

Se utilizan métodos biológicos, colorimétricos, de óxido-reducción, electrométrico, espectrofotométrico y polarográfico.

Los métodos químicos, y un poco los físicos, van desplazando a la más precisa pero costosa, determinación biológica en cobayo.

Se ha ensayado con resultados muy exactos el método electrométrico - dosaje potenciométrico - en presencia de iodato de potasio como oxidante y diclorofenol-indofenol (21)(22), en material biológico.

También el método polarográfico ha sido objeto de estudios (23).

Espectrofotometricamente, la mejor manera de determinarlo es en solución acuosa, con una cantidad equimolecular de cianuro de potasio como estabilizante (16).- La exposición a la luz ultravioleta debe ser breve para evitar la destrucción, propiedad que se usa luego para hacer un blanco de reactivos por irradiación.

Los métodos químicos (colorimétricos y de óxido-reducción) son los más estudiados y numerosos, y de mayor aplicabilidad.

De todos ellos, sobre los cuales es muy accesible una abundante bibliografía, cuatro reacciones son las más importantes:

- 1) Titulación con solución valorada de iodo, para material puro.
- 2) Reacción con azul de metileno, especialmente para uso clínico(24)(25)
- 3) Reacción con 2-6-diclorofenol-indofenol, actualmente la más utilizada en forma colorimétrica o titrimétrica.- Deriva directamente de las investigaciones de Tillmans, en el año 1928.
- 4) Reacción con 2-4-dinitrofenilhidrazina, y colorimetría de la solución sulfúrica de la osazona.

Oxidación del ácido ascórbico con diclorofenol-indofenol es la técnica más extendida.- Otra técnica de uso común es la basada en la reacción con dinitrofenilhidrazina.

La relativa inespecificidad de los métodos químicos frente a la determinación biológica, ha inducido al autor a hacer uso de estas dos técnicas.

Oreac'n y Barand reportan un método para algas que creen más específico, cuyas características han sido comentadas en I-d (26).

El ácido ascórbico se oxida a dehidroascórbico con iodo, y éste se hidroliza a ácido 2-3-dicetogulónico con carbón activado.

El ácido obtenido se combina luego con p-sulfotrenilhidrasina, en medio acético regulado a pH 4,7, por calentamiento a ebullición.

Se dijo ya que la oxidación del ácido ascórbico con diclorofenol-indofenol es la técnica más extendida; adaptación de los métodos visuales han sido descriptas por Bessey y King (30).

Estas técnicas no son aplicables a productos conteniendo pigmentos azo y/o ácidosolubles, productos reductores y otros compuestos que reaccionen con la tintura a una velocidad suficientemente rápida como para influenciar el punto final de la titulación.

Los métodos fotométricos (29)(31) evitan ciertas limitaciones de la titulación visual (turbidez y pigmentación).- En muestras muy pigmentadas no son, no obstante, enteramente satisfactorios; se usa entonces la técnica de extracción xilénica (32).

En algunos productos naturales el valor del diclorofenol-indofenol es limitado por la presencia de sustancias del tipo de las "reductonas" y ácido reductico (compuestos muy reductores formados durante el prolongado estacionamiento del material biológico en ciertas condiciones, o por calentamiento de carbohidratos en medio alcalino), hierro etc.

Varios procedimientos han sido ideados para disminuir su influencia; entre ellos, la diferencia de velocidad con la cual se oxida la tintura por efecto del ascórbico y de las interferencias.(33)(34).

Ácido reductico y "reductonas" forman osazonas con 2-4-dinitrofenilhidrasina a una velocidad mucho menor que el ácido dehidroascórbico.

Ha sido propuesto también el uso de ascórbico-oxidasas para producir la destrucción selectiva y específica (35), pero la capacidad de la enzima para la oxidación en presencia de otros reductores, ha sido cuestionada.

Para evitar la interferencia de ciertos tipos de material reductor, se ha propuesto la reacción de derivados con 2-4-dinitrofenilhidrasina (36), pero este método no previene la interferencia de las "reductonas".

Existen modificaciones para obviar este inconveniente (34) tales como la medición del color producido después de 15 minutos de iniciada la reacción; se ha descripto un esquema para la corrección de estas interferencias, basado en períodos de incubación de 15 minutos a 25°C. y 3 horas a 37 °C.

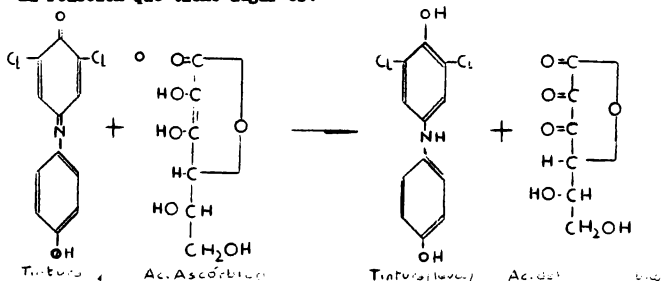
- b) Método colorimétrico por oxidación con 2-6-diclorofenol-indofenol (27)(28)(29).

Fundamento y comentarios.

Se basa en la reducción - y decoloración - de la tintura, en medio ácido, por el ácido ascórbico.- Se determina el exceso de reactivo por medición espectrofotométrica a 500 m μ del extracto xilénico de la misma; el xileno solo extrae la forma oxidada.

La extracción xilénica ofrece ventajas reales para el estudio de extractos vegetales pigmentados, porque permite eliminar colores parásitos y, fundamentalmente, separar rápidamente la tintura no reducida del contacto de interferencias que actúan más lentamente que el ácido ascórbico, cuya reacción es instantánea.

La reacción que tiene lugar es:



La tintura, azul en solución acuosa neutra, es rosada en solución ácida, y la leucobase incolora.

Sólo se determina según este método todo el ácido ascórbico reducido, no determinándose en cambio la parte que pueda estar presente como ácido dehidroascórbico.

Inicialmente se usó para la extracción de la vitamina C de los tejidos animales y vegetales el ácido tricloroacético (30), pero se comprobó a posteriori que este ácido reduce al diclorofenol-indofenol y oxida la vitamina.

El ácido metafosfórico al 2-3 %, además de ser desproteínizante, tiene la propiedad de estabilizar la solución de ácido ascórbico y no reducir la tintura.- El ácido sulfúrico al 5% también previene la oxidación de la vitamina, y le mismo el ácido oxálico.

Se recomendó también el empleo del ácido sulfosalicílico, que es más estable que el metafosfórico, no reduce la tintura y produce un filtrado más ácido que el tricloraacético (37).

De una comparación entre 13 ácidos desproteínizantes para la determinación del ácido ascórbico en tejidos animales y alimentos, los que dieron mejor resultado para extraer la vitamina sin pérdida por oxidación, fueron los ácidos oxálico y metafosfórico (38).

La mezcla de ácido sulfúrico al 5% y metafosfórico al 3%, no parece ofrecer ventajas sobre el ácido metafosfórico al 3%.- El ácido metafosfórico empleado generalmente es el glacial, en bastones (39).

De la variedad de técnicas para la utilización de este método, el autor ha escogido la de Rubin, Jahns y Bauerfeind (40), que usa ácido metafosfórico al 20%, reemplazándolo por el mismo al 10%.

La acción reductora de sulfitos y estaño o hierro reducidos, se elimina por adición de agua oxigenada al 3% antes del agregado de la tintura.

Para eliminar en el mayor grado posible, la acción de reductores más lentos que el ácido ascórbico, se recomienda hacer rápidamente la extracción milénica.

c) Técnicas

1) Reactivos

2-6-Diclorofenol-indofenol: disuelva 40 mgr. de la sal sódica en 100 ml. de agua destilada caliente.- Enfría y diluya a 500 ml.- Filtre antes de usar.- Se conserva en heladera hasta 15 días.

Ácido metafosfórico al 10%: disuelva 50,0 gr. de P_2O_5 en bastones, en agua destilada y diluya a 500 ml.- Filtre rápidamente.- Se conserva en heladera hasta 30 días.

Buffer de citrato: disuelva 5,76 gr. de ácido cítrico en 100 ml. de agua destilada.- Disuelva 6,4 gr. de fosfato disódico en 60 ml. de agua destilada y mezcle con la solución anterior.- El pH resultante debe ser 4,0. Si así no fuera, debe ser llevada al valor indicado.-

Agua oxigenada al 3% : diluya diez veces el H_2O_2 concentrado, con agua destilada.

Xileno: no debe reducir el colorante.- Si así no fuera, puede purificarse por alcalinización y redestilación.

Ácido ascórbico, solución standard: disuelva 50 mgr. de ácido ascórbico de potencia conocida, en ácido metafosfórico al 10% y llave a 100 ml. Diluya 10 ml. de esta solución a 100 ml. con el mismo diluyente. La concentración final es 50 mgr./ml.

2) Extracción y reacción.

Pese 5,0 gr. de muestra en un erlenmeyer con tapa esmerilada, agregue 50 ml. de ácido metafosfórico al 10% y agite mecánicamente durante 15 minutos.

Pase el contenido a tubos de centrifuga y centrifugue hasta obtener un sobrenadante límpido.- Si no lo obtiene, filtre.

En tubos de centrifuga con tapón esmerilado, distribuya los filtrados y las soluciones de reactivos según se indica en el cuadro siguiente:

Denominación del tubo:	Blan- co St.	St. ₁	St. ₂	St. ₃	St. ₄	St. ₅	St. ₆	St. ₇	St. ₈	M	Blan- co M
Muestra (ml.).	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
Standard	-	0,10	0,25	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00	-	-
H ₂ O dest.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
H ₂ O ₂ 3 %	3 gte	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
PO ₃ H 10 %	5,00	4,90	4,75	4,50	4,00	3,50	3,00	2,50	2,00	-	-
Buffer	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Indofenol	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
Xileno	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0

Tape y agite enérgicamente durante 10 minutos.- Centrifugue hasta separar nitidamente las fases.

Pipeteo la capa xilénica a tubos de ensayo de 8" x 1" y si hubiere turbides coloque previamente en estos 1 ml. de alcohol etílico absoluto.

3) Colorimetría

Se midieron las absorciones a 500 m μ . utilizando para ello un espe-

trorotómetro Beckman, modelo DU, y células Corex de 1 cm. de paso.
Standards y muestras fueron leídas contra sus respectivos blancos.

4) Cálculos

Con los valores de absorción obtenidos de la colorimetría de los standards en ordenadas, y la correspondiente cantidad de ácido ascórbico del extracto xilánico en abscisas, represente la curva absorción-cantidad de ácido ascórbico.

Con las lecturas de absorción de las muestras, obtenga del gráfico la cantidad de ácido ascórbico de cada muestra, contenida en el extracto correspondiente.

Calcule los resultados mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{D \times 10}{0.1n} \text{ mgr. de ácido ascórbico / gr. de muestra.}$$

donde:

D es la cantidad de ácido ascórbico contenida en el extracto xilánico de la muestra, obtenida del gráfico, en mgr.

$0.1n$ es la cantidad de muestra en el extracto xilánico, en gr.

Cálculo de las concentraciones y cantidades:

QFm: se pesaron 0,0500 gr. de ácido ascórbico (U. S. P., Reference Standard), previamente secado al vacío sobre SO_4H_2 durante 3 horas, y se diluyeron a 100 ml. con ácido metafosfórico 10 %.- 10 ml. de esa solución se llevaron a 100 ml. con el mismo diluyente.

La concentración de la segunda solución es 50 mgr./ml.

Las cantidades totales correspondientes a cada St. de trabajo es:

Standard	ml. tomados	Cantidad total
St ₁	0,10	5 mgr. ác. ascórbico.
St ₂	0,25	12,5 " " "
St ₃	0,50	25,0 " " "
St ₄	1,00	50,0 " " "
St ₅	1,50	75,0 " " "
St ₆	2,00	100,0 " " "
St ₇	2,50	125,0 " " "
St ₈	3,00	150,0 " " "

OTm: entodos los casos la pesada de muestra, 5,0 gr., se extrajo con 50 ml. de ácido metafosfórico al 10 %, y la colorimetría se hizo sobre 5,0 ml. de extracto ácido, que es la cantidad de muestra que pasó al extracto xilónico.

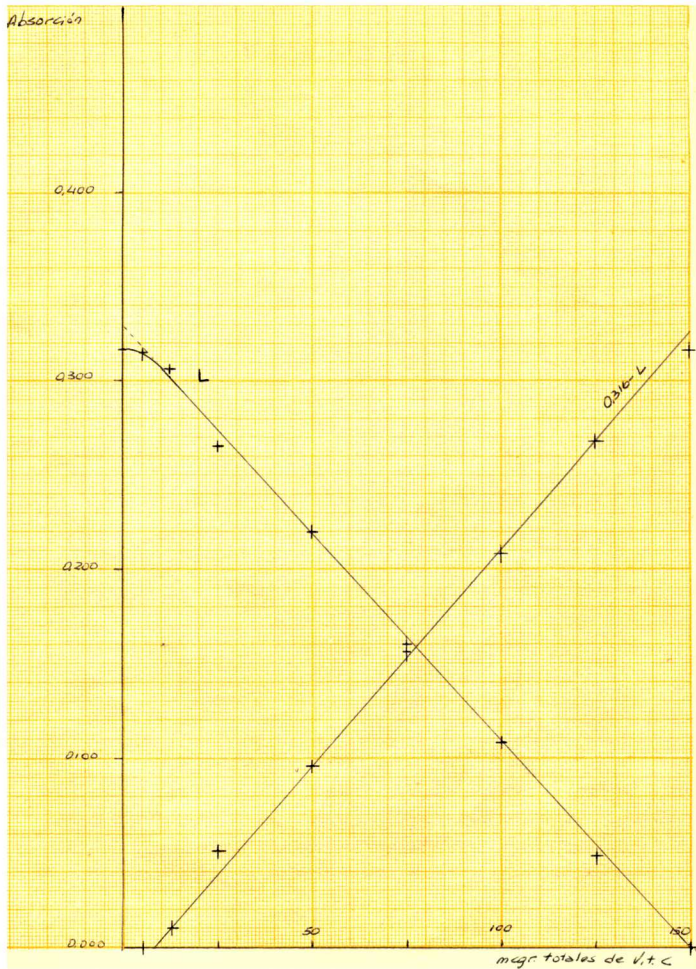
Muestra	Pesada (gr.)	Conc. final (gr/ml)	OTm (gr.)
I	5,0019	0,1000	0,5000
II	5,0006	0,1000	0,5001
III	5,0002	0,1000	0,5000
IV	5,0011	0,1000	0,5001
V	5,0006	0,1000	0,5000

5) Experimental

	Cant. ext. xilónico	Absorción a 500 m μ			I _{blanco} - I _{est,m}	Absorb. en gráfico	Resul- tado
		I ₁	I ₂	Promedio			
	(mgr)					(mgr)	(mgr/gr)
Blanco	0,0	0,316	0,316	0,316			
St ₁	5,0	0,315	0,314	0,315	0,001		
St ₂	12,5	0,308	0,304	0,306	0,010		
St ₃	25,0	0,269	0,261	0,265	0,051		
St ₄	50,0	0,220	0,219	0,220	0,096		
St ₅	75,0	0,162	0,158	0,160	0,156		
St ₆	100,0	0,107	0,108	0,108	0,208		
St ₇	125,0	0,050	0,046	0,048	0,268		
St ₈	150,0	0,000	-0,001	0,000	0,316		
	(gr)						
I	0,5002	0,206	0,209	0,208	0,108	54,0	108
II	0,5001	0,156	0,152	0,154	0,162	78,0	156
III	0,5000	0,134	0,133	0,134	0,182	86,5	173
IV	0,5001	0,202	0,199	0,201	0,115	57,0	114
V	0,5000	0,067	0,064	0,066	0,250	116,5	233

La determinación de la cantidad de ácido ascórbico por el gráfico se hizo sobre la curva absorción-cantidad, pero puede utilizarse para el mismo fin la curva (absorción blanco - absorción standard)-cantidad.

Absorción



a) Resultados obtenidos

Muestra Nº	Alga	Mogr./gr. sobre muestra:	
		tal cual	anhidra
I	<i>Macrocistys pyrifera</i>	108	132
II	<i>Lessonia flavicans</i>	156	175
III	<i>Lessonia fassia</i>	173	192
IV	<i>Iridea laminaroides</i>	114	130
V	<i>Iridea cordata</i>	213	242

6) Determinación colorimétrica por formación de la osazona/
Fundamento y comentario.

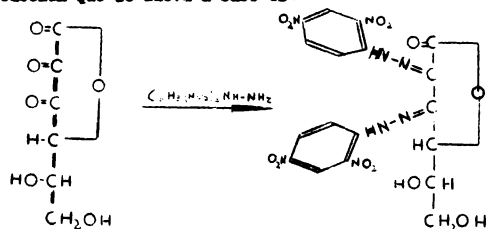
Se basa en la formación de la osazona correspondiente al ácido dehidroascórbico, el cual se obtiene por oxidación moderada del ascórbico.

Como agente de copulación se usa la 2-4-dinitrofenil hidrazina.

Cuando la osazona se solubiliza en ácido sulfúrico-agua, produce una solución de color rojo, cuyo máximo de absorción se encuentra a 540 m μ .

El procedimiento es una adaptación del método descripto por Roe, Cesterling y Kuether (36)(41) para la determinación de ácido ascórbico en tejidos vegetales.

La reacción que se lleva a cabo es:



La transformación de ácido ascórbico a dehidroascórbico puede hacerse por medio de Norita (carbón activado), ascórbico-oxidasa, iodo, bromo, 2-6 diclorofenol-indofenol y muchos otros reactivos oxidantes.

Bolomey y Kemmerer (42), modificaron el método de Roe, Cesterling y Kuether sustituyendo el ácido acético glacial por sulfúrico al 85 %.

Más adelante, los mismos autores (43), demostraron mediante un estudio comparativo que, en ausencia de tiourea, la oxidación con norita causa menos distorsión de las curvas de absorción que cuando se oxida con bromo.

Por su parte, Roe y Mills (44), publicaron datos espectrofotométricos que prueban que estas modificaciones pueden disminuir la especificidad del método original.- Afirman además que la aparente superioridad del ácido sulfúrico sobre el acético, disminuye por el hecho de ser el primero, a la vez, reactivo y solvente.

La importancia de la tiourea en la reacción, es acentuada como un medio de impedir la acción de oxidantes y controlar la velocidad de co-pulacion en el desarrollo del color.

Su acción reductora impide a la transformación ascórbico-dehidroascórbico ir más allá de éste.

Es de hacer notar que este método no está libre de objeciones..

El ácido fenil-pirúvico y otros α -cetocácidos reaccionan con la dinitrofenilhidrasina; el 2-3 diceto-1-gulónico, un compuesto que puede formarse a partir del ácido dehidroascórbico por mutarrotación y pre-pérdida de la estructura lactónica, y otros tales como el glucosascórbico y arabeascórbico, no pueden ser distinguidos por este método.

En consecuencia, el valor químico diferirá del valor biológico si ha habido pérdida de la estructura lactónica (45) del dehidroascórbico en su estado natural.

c') Técnica

Como ya se ha dicho, se usará una adaptación del método descrito por Roe, Oesterling y Kuether (36)(41).

1) Reactivos

Ácido sulfúrico 9 N: agregue cuidadosamente 250 ml. de SO_4H_2 (p.e. 1,84) a 700 ml. de agua destilada; enfríe y diluya a 1.000 ml.

2-4-dinitrofenil-hidrazina al 2%: disuelva 2 gr. de 2-4-dinitrofenilhidrazina en 100 ml. de SO_4H_2 9 N, y filtre.- Guárdese en heladera y renuévese cada 2 semanas.

Ácido metafosfórico al 10 %: disuelva, sin calentar, 200 gr. de PO_3H en 1.800 ml. de agua destilada de bajo contenido en cobre.

Consérvese a menos de 3 °C. y renuévese cada semana.

Ácido metafosfórico al 5 %: diluya el anterior al medio.

Tiourea al 1% en metafosfórico al 5 %: disuelva 5 gr. de tiourea en 500 ml. de ácido metafosfórico al 5 %.

Ácido sulfúrico al 85%: agregue cuidadosamente 900 ml. de SO_4H_2 (p.e. 1,84) a 100 ml. de agua destilada y homogeníe.

Agua saturada con bromo: compruebe la presencia de bromo libre sedimentado. Nitrógeno.

Solución standard de ácido ascórbico: pese 100 mgr. de ácido ascórbico de potencia conocida, disuelva en PO_3H al 5%, y diluya a 1.000 ml.

2) Extracción y oxidación

Pese 5,0 gr. de muestra y agregue 25 ml. de PO_3H al 10% en un erlenmeyer de 125 ml. con tapa esmerilada.

Agite enérgicamente durante 10 minutos y pase el contenido a tubos de centrifuga de 50 ml.- Centrifugue hasta obtener un sobrenadante claro. Si es necesario filtre.

Pase 10 ml. de este extracto ácido y 30 ml. de la solución standard a sendos vasos de ppdo. de 50 ml. y agregue agua de bromo, gota a gota, hasta que haya un exceso.

Elimine el exceso de bromo haciendo pasar a través de las soluciones una corriente suave de nitrógeno.

Agregue a la muestra 30 ml. de tiourea 1% (volumetricamente).

Diluya 2,5 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 - 25,0 ml. de la solución oxidada de standard a 100 ml., con tiourea 1%.

3) Opulación.

Pase 4 ml. de cada una de las soluciones obtenidas, a series de 3 tubos de ensayos, cada una.

A dos de ellos agregue 1 ml. de 2-4-dinitrofenil-hidrazina al 2% y colóquelos en baño de agua a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C.}$, durante 3 horas exactamente.

Pase los tubos a un baño de hielo, junto con los terceros de cada seri que serán usados como blanco.

Agregue, a todos, 5,0 ml. de SO_4H_2 al 85%, lentamente.

Agregue a los blancos 1 ml. de 2-4-dinitrofenil-hidrazina al 2%.

Sin quitar del baño de hielo, homogenice el contenido de los tubos.

Deje tomar temperatura ambiente durante 30-40 minutos.

4) Colorimetría

Mida la absorción de standards y muestras, usando como cero los blancos hechos según el punto tres (anterior), a 500-540 m μ .- Se recomienda la lectura a 540 m μ . para eliminar las interferencias debidas a osasomas que puedan formar los azúcares.- En base a ello, en el presente trabajo se utilizó dicha longitud de onda.

Para efectuar las mediciones se utilizó un espectrofotómetro Beckman, modelo DU, y células Correx de 1 cm. de paso de luz.

5) Cálculos

Con los valores de absorción obtenidos de la colorimetría de los standards en ordenadas, y la correspondiente concentración en abscisas, represente la curva absorción-concentración.

Con las lecturas de absorción de las muestras, obtenga del gráfico la concentración de ácido ascórbico de cada una de ellas.

Calcule los resultados mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{D}{\text{CFm}} = \text{mgr. de ácido ascórbico / gr. de muestra.}$$

Donde:

D es la concentración en ácido ascórbico (mgr./ml.) de cada muestra, obtenida del gráfico.

CFm es la concentración final de la muestra.

Cálculo de las concentraciones finales:

CFm : se pesaron 100,0 mgr. de ácido ascórbico (U.S.P. Reference Stan

dard), previamente secado al vacío sobre SO_2 durante 3 horas, y se diluyeron a 1.000 ml. con ácido metafosfórico al 5%.

2,5 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 - 25,0 ml. se diluyeron a 100 ml. con tiourea al 1%.

$$\text{CFst } \frac{0,1000}{1000} = 100 \text{ mcgr./ml., de ácido ascórbico.}$$

$$\text{CFst}_1 \frac{0,1000}{1000} \cdot \frac{2,5}{100} = 2,5 \text{ mcgr./ml., de ácido ascórbico.}$$

$$\text{CFst}_2 \frac{0,1000}{1000} \cdot \frac{5,0}{100} = 5,0 \text{ mcgr./ml. " " "}$$

$$\text{CFst}_3 \frac{0,1000}{1000} \cdot \frac{10,0}{100} = 10,0 \text{ mcgr./ml. " " "}$$

$$\text{CFst}_4 \frac{0,1000}{1000} \cdot \frac{15,0}{100} = 15,0 \text{ mcgr./ml. " " "}$$

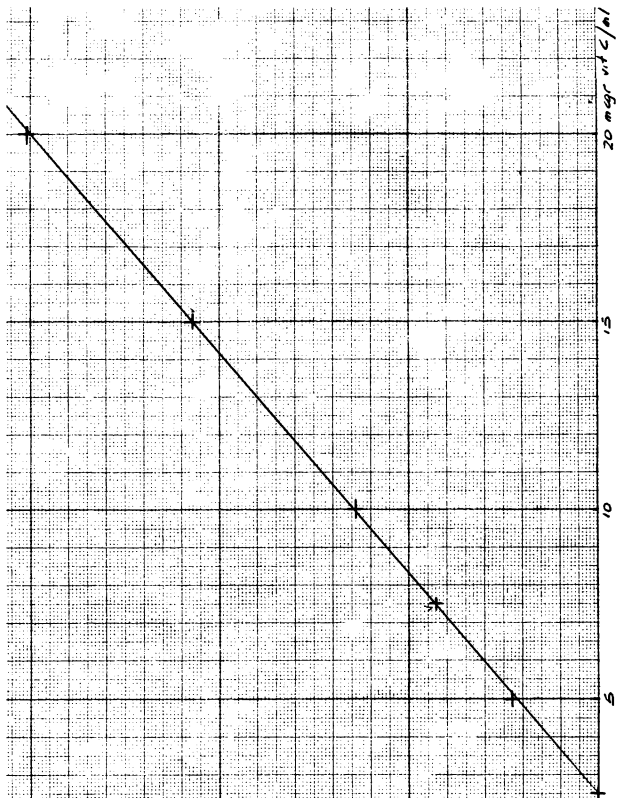
$$\text{CFst}_5 \frac{0,1000}{1000} \cdot \frac{20,0}{100} = 20,0 \text{ mcgr./ml. " " "}$$

$$\text{CFst}_6 \frac{0,1000}{1000} \cdot \frac{25,0}{100} = 25,0 \text{ mcgr./ml. " " "}$$

CFM: en todos los casos se pesaron 5,0 gr. de muestra, se extrajeron con 25 ml. de ácido metafosfórico al 10 %, y 10 ml del extracto se llevaron a 40 con tiourea al 1 %.

$$\frac{5,0}{25} \cdot \frac{10}{40} = 0,05 \text{ gr. de muestra/ml.}$$

Muestra	Pesada	Conc. final
Nº	(gr)	(gr./ml.)
I	5,0021	0,0500
II	5,0053	0,0501
III	5,0005	0,0500
IV	5,0012	0,0500
V	5,0021	0,0500



6) Experimental

	Concentr. final	Absorción a 540 m. μ .			Conc. Asc.	Resultado	
		L_1	L_2	Promedio		Individual	Promedio
	mcgr/ml				mcgr/ml	mcgr/gr	mcgr/g
St ₁	2,5	0,099	0,100	0,100			
St ₂	5,0	0,189	0,192	0,191			
St ₃	10,0	0,355	0,357	0,356			
St ₄	15,0	0,528	0,528	0,528			
St ₅	20,0	0,708	0,700	0,704			
St ₆	25,0	0,847	0,852	0,850			
	gr/ml						
I	0,0500	0,300	-	-	8,3	166	164
		-	0,292	-	8,1	161	
II	0,0501	0,201	-	-	5,4	108	113
		-	0,217	-	5,9	118	
III	0,0500	0,200	-	-	5,4	108	105
		-	0,181	-	5,1	102	
IV	0,0500	0,670	-	-	20,5	410	377
		-	0,611	-	17,2	344	
V	0,0500	0,336	-	-	18,8	176	184
		-	0,360	-	9,6	192	

d') Resultados obtenidos

Muestra No	Alga	Mcgr./gr. sobre muestra del cual	
		al qual	añadiera
I	Macroclstys pyrifera	164	200
II	Lessonia flavicans	113	127
III	Lessonia Fissia	105	116
IV	Iridaea laminaroides	377	428
V	Iridaea cordata	184	209

CONCLUSIONES

Se ha determinado vitamina C por dos métodos colorimétricos.

La razón de la duplicación se debe a la relativamente pobre especificidad de las reacciones utilizadas, si bien en ambos casos se han usado técnicas que proveen un sistema adecuado de eliminación de interferencias posibles o de sus efectos.

En general, los valores obtenidos se corresponden con excepción de los de la muestra IV.- Al hablar de correspondencia de valores debe tenerse en cuenta diversos factores; entre ellos debe destacarse la complejidad de las muestras, el relativo desconocimiento de sus medios internos y las pequeñas cantidades de ácido ascórbico presente.

Además, los resultados de dos métodos distintos no pueden ser totalmente concordantes, máxime teniendo en cuenta que el primero de los métodos determina reductores en general (ácido ascórbico) y el segundo sustancias osazonizables (ácido dehidroascórbico), y la vitamina C se halla en los tejidos naturales en un equilibrio variable de ambas sustancias.

Con todo, los resultados obtenidos muestran una coincidencia aceptable para cuatro de las muestras; con respecto a la número IV, los resultados sugieren la presencia de una mayor cantidad de vitamina en forma de ácido dehidroascórbico.- En cuanto a las restantes, ésta se encontraría presente como ácido ascórbico.

Los valores están, además, en concordancia con los obtenidos por distintos autores en otros tipos de algas y dentro de cifras expectables.

La gelificación de las muestras representan un inconveniente para la extracción, lo cual se subsana en parte extrayendo con cantidades de líquido mayores que las habituales y en parte mediante condiciones rigurosas de agitación.- Como en casos anteriores, el comportamiento de las muestras IV y V fué en este aspecto diferente a las restantes.

e) Bibliografía

- 1) Drummond J. O.- Biochem. J. 14, 660 (1920).
- 2) Council of Pharm. & Chem. of the Am. Med. Assoc.
- 3) Jones K. L.- Science 68, 480 (1928).
- 4) Szent-György.- Biochem. J. 22, 1378 (1928).
- 5) Roe J. H. y Bernum G. L.- J. Nutrition 11, 359 (1936).
- 6) Croock E. M. y Hopkins F. G.- Biochem. J. 32, 1356 (1938).
- 7) Harris L. y coautores.- Biochem. J. 27, 580 (1935).
- 8) Hirst E. y coautores.- J. Chem. Soc. (Londres), año 1933, p.1270
- 9) King C. G.- Science 75, 357 (1932).
- 10) Michael F. y coautores.- Zeit. Physiol. Chem. 222, 235 (1935).
- 11) Reichstein T. y coautores.- Helv. Chim. Acta 16, 561 (1933).
- 12) Cox E. G.- Nature 130, 205 (1932).
- 13) Cox E. G. y Goodwin T. H.- J. Chem. Soc. 1936, pág. 769.
- 14) Cox E. G. y Hiest E. L.- Nature 131, 402 (1933).
- 15) Arous C. L. y Zilva S. S.- Biochem. J. 34, 61 (1940).
- 16) Fearon W. R. y Karveran E.- Biochem. J. 37, 326 (1946).
- 17) Milhorat A. T.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 55, 52 (1944).
- 18) Bowden F. P. y Snow C. P.- Nature 129, 720 (1932).
- 19) Mohler H. y Lehr H.- Helv. Chim. Acta 21, 485 (1938).
- 20) Adamson D. O. y Evers N.- Analyst 66, 106 (1941).
- 21) Ramsay J. B. y Collichman K. L.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 14, 319 (1942).
- 22) Becker E. y Gleria J.- Zeit. Vitaminsf. 6, 86 (1937).
- 23) Kirk M. W.- Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 13, 625 (1941).
- 24) Martini E. y Bonsignore A.- Biochem. Z. 273, 170 (1934).
- 25) Gal I.- Nature 138, 799 (1936).
- 26) Oreamón P. y Barand J.- C. R. Soc. Biol. 148, 105 (1954).
- 27) Evelyn K. A. y Malloy H. T. y Rosen O.- J. Biol. Chem. 126, 645 (1938).
- 28) Mindlin R. L. y Butler A. K.- J. Biol. Chem 122, 673 (1938).
- 29) Bessey O. A.- J. Biol. Chem. 126, 771 (1938).
- 30) Bessey O. A. y King C. G.- J. Biol. Chem. 103, 678 (1933).
- 31) Hochberg M., Melnick D. y Oser B. L.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 15, 182 (1943).

- 32) Pepkowitz L. P.- J. Biol. Chem. 151, 405 (1943).
- 33) Snow G. A. y Zilva S. S.- Biochem J. 38, 458 (1944).
- 34) Penny J. R. y Zilva S. S.- Biochem J. 39, 392 (1945).
- 35) Tauber H., Kleiner I. S. y Fishkind D.- J. Biol. Chem. 110, 211 (1935).
- 36) Roe J. H. y Oesterling L. J.- J. Biol. Chem. 152, 511 (1944).
- 37) Wieters H.- Ann. Merck IV, 1, (1936).
- 38) Ponting J. O.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 15, 389 (1943).
- 39) Howath A. A.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 18 229 (1946).
- 40) Rubin S. H., Jahns F. W. y Bauerfeind J. O.- Food Prod. J. Am. Food Manuf. 24, 327 (1945).
- 41) Roe J. H. y Kuehner C. A.- J. Biol. Chem. 147, 399 (1943).
- 42) Bolomey R. A. y Kemmerer A. R.- J. Biol. Chem. 165, 377 (1946).
- 43) Bolomey R. A. y Kemmerer A. R.- J. Biol. Chem. 167, 781 (1947).
- 44) Mills L. B. y Roe J. H.- J. Biol. Chem. 170, 159 (1947).
- 45) Pijoan M. y Gerjovich H. J.- Science 103, 202 (1946).

VITAMINA D

La vitamina D se llama también antirraquítica, raquistérol y raquitamina.

A) Antecedentesa) Características biológicas

La falta de vitamina D en la alimentación causa la aparición de una enfermedad conocida clínicamente con el nombre de raquitismo.

La osteomalacia en el adulto, y tal vez otras condiciones relacionadas con la descalcificación (osteoporosis senil), también se deben a deficiencias de vitamina D.

Todas estas manifestaciones se hallan vinculadas con la facilitación de la absorción intestinal del calcio y del fósforo.

Al incrementarse la dosis de vitamina la absorción de ambos elementos aumenta, pero llega un momento—dosificaciones fuertes—en que la hipercalcemia y la hipérfosfatemia alcanzan valores elevados a expensas no sólo del crecimiento del coeficiente de absorción sino de la movilización de los depósitos óseos de ambos elementos.—La fosfatasa de Robinson, a pesar de estar aumentada en los puntos de osificación y en la sangre, no actúa disgregando los compuestos orgánicos de calcio y fósforo para depositarlos en los huesos a causa de que la vitamina D actúa como agente catalítico de este proceso (1).

Otros cuadros carenciales, que podríamos llamar sub-clínicos, son la predisposición a padecer caries dentales, hiperexcitabilidad neuromuscular e inflamaciones latentes de algunas mucosas.

La hipervitaminosis produce calcificaciones en órganos y tejidos (tubos renales, vasos sanguíneos corazón y pulmones).

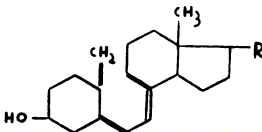
La eficiencia con la que el hombre utiliza las varias formas de la vitamina D es difícil de establecer; la experimentación a este respecto indica que, por vía oral, la vitamina D₃ es más activa que la D₂; aproximadamente 1,5 veces (2).

La dosis normal para un adulto es de 400 U.I. diarias (0,01 mgr.), y de 400 a 800 para el niño y la mujer grávida.—La dosis terapéutica máxima utilizable, considerada inocua, es 5000 U.I./mgr. de peso-día.

b) Características químicas y físicas

Se conocen cinco sustancias, íntimamente relacionadas en cuanto a su estructura química, que responden al nombre genérico de vitaminas D.

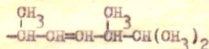
La fórmula general es:



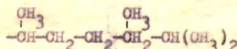
y el grupo R las diferencia entre sí.

Vitamina D₁: es una mezcla equimolecular de vitamina D₂ y lumisterol. El nombre corresponde históricamente a los primeros preparados, todavía impuros, de la que luego fue llamada vitamina D₂ por la escuela de Windaus, en 1930.

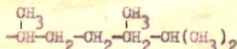
Vitamina D₂: o viosterol, calciferol, ergosterol activado.- El grupo distintivo R es



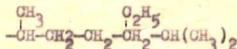
Vitamina D₃: o 7-dehidro-colesterol activado.- El grupo R es



Vitamina D₄: o 22-dehidro-ergosterol activado.- El grupo R es



Vitamina D₅: o 7-dehidro-sitosterol activado.- El grupo R es



Las vitaminas D sólo existen en los organismos animales, cuyas fuentes naturales están constituidas por las provitaminas homólogas que se encuentran, casi sin excepción, en los tejidos de origen vegetal.

Las propiedades antirraquíticas de algunos productos vegetales se deben a la irradiación de los mismos por la luz solar.

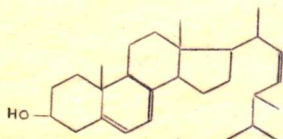
Las sustancias que pueden activarse por irradiación con luz de 250-300 m.μ. se llamaron provitaminas D.- En general es efectiva toda luz

de longitud de onda igual a aquella que es absorbida por cada una de las provitaminas.- Estas pueden irradiarse en estado sólido, en soluciones y en estado de vapor..

Se ha establecido que la luz de 275-300 m μ . produce el mejor rendimiento con la menor cantidad de productos secundarios (3), que son mucho más sensibles a la oxidación por el oxígeno molecular que las vitaminas y las ^{pro}vitaminas D.- Los mejores rendimientos se obtienen cuando sólo el 40-60 % del total de las provitaminas han sido convertidas.

El mecanismo de transformación ha sido estudiado extensamente para el ciclo ergosterol $\rightarrow$ calciferol.- Se supone además que es el mismo en todos los casos.

El resultado de estas investigaciones puede esquematizarse (4):

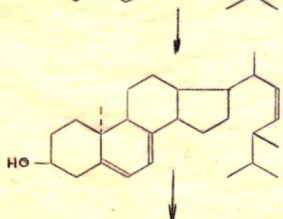


Ergosterol

P.F.: 166 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -132 ° en Cl_3OH

Máximos de absorción a 260, 282 y 293,5 m μ .

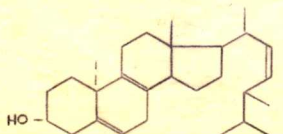


Lumisterol₂

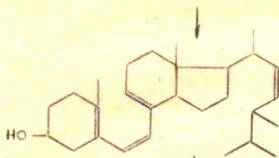
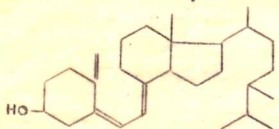
P.F.: 118 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +192 ° en acetona.

Máximos de absorción a 265 y 280 m μ .



Protaquistrol₂

Taquisterol₂ $[\alpha]_D^{25}$: -70° en benceno.Máximo de absorción a 268, 280 y 294 m μ .Vitamina D₂

P.F.: 116 °C.

 $[\alpha]_D^{25}$: +106° en etanol.Máximo de absorción a 265 m μ .Toxisterol₂Máx. de abs.
a 248 m μ .Suprasterol₂I

P.F.: 104 °C.

 $[\alpha]_D^{25}$: -76° (Cl₃OH)Máx. de abs. en
el ultravioleta
lejano.Suprasterol₂II

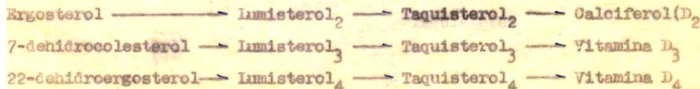
P.F.: 110 °C.

 $[\alpha]_D^{25}$: +63° (Cl₃OH)Máx. de absorción
en el ultravioleta
lejano.

Como no hay seguridad que se hayan reconocido todos los productos intermediarios, no hay evidencia de que no existan otros.- Todos los productos de reacción de este esquema son isómeros de la provitamina.

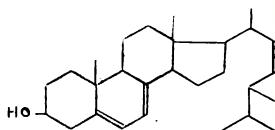
La constitución química de: lumisterol, taquisterol y vitamina D, está bien establecida; sólo la del protaquisterol es hipotética.

El cuadro general del proceso de irradiación sería (5):

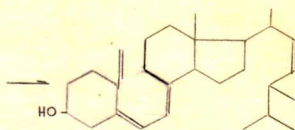


Los estados químicos iniciales y finales de cada proceso son:

Vitamina D₂

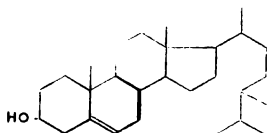


Ergosterol

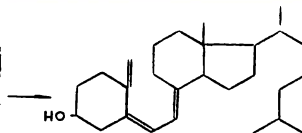


Vitamina D₂

Vitamina D₃

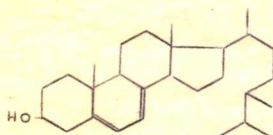


7-dehidrocolesterol

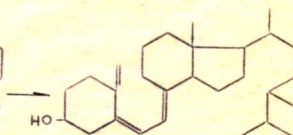


Vitamina D₃

Vitamina D₄



22-dehidroergosterol



Vitamina D₄

Además de las mencionadas existen otras provitaminas con caracteres químicos y físicos más o menos conocidos:

Epi-ergosterol: constantes físicas desconocidas.

Epi-7-dehidrocolesterol: P.F.: 124-126 °C; $[\alpha]_D^{20}$: -70,5 en Cl₃CH.

22-23-óxidoergosterol: constantes físicas desconocidas.

Provitamina de Mussel: constitución desconocida; P.F.: 150-151 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -118 ° en benceno.

Provitamina de Periwinkle: constitución química desconocida.

P.F.: 137-137,5 °C.; $[\alpha]_D^{20}$: -124 ° en C_6H_6 .

7-dehidrositosterol: P.F.: 144-145 °C.; $[\alpha]_D^{20}$: -116 ° en Cl_3OH .

7-dehidrostigmasterol: P.F.: 154 °C.; $[\alpha]_D^{20}$: -118 ° en benceno.

Todas estas provitaminas tienen características de solubilidad similares: son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos típicos como éter, hidrocarburos, hidrocarburos clorados, alcoholes, etc.

Tienen también el mismo espectro de absorción, que se caracteriza por máximos a 260, 270, 281 y 293,5 m μ .; el coeficiente de extinción a 261 m μ . (1% - 1 cm.) oscila alrededor de 30×10^3 .

Ya se ha visto como las provitaminas se transforman por irradiación según un cambio que podría esquematizarse como la apertura del anillo II con formación de un grupo metilénico en el C_{10} , en reemplazo del primitivo grupo metilo.- Este doble enlace es tan fundamental que cuando no existe, las propiedades antirraquíticas llegan casi a desaparecer (taquisterol) aún cuando la apertura del anillo II produce un efecto hipercalcemiente cuya consecuencia es una intensa participación en el metabolismo del calcio.

Todas las vitaminas D, en estado puro, se presentan como cristales inodoros de color blanco.

Son solubles en las grasas y en los solventes orgánicos usuales; de ello es responsable su estructura colánica (moleco colestánico); son insolubles en agua (6).

Poseen un espectro de absorción característico, con un máximo a 265 m μ . (en éter y ciclohexano).- El coeficiente de extinción molecular es $1,82 \times 10^4$.

Existen ligeras variaciones en los E_{265} : 460, 500 y 470 respectivamente para vitaminas D_2 , D_3 y D_4 .

B) Desarrollo del método de determinación

a) Determinación química y/o física en general y elección del método

El dosaje espectrofotométrico es aplicable, como de costumbre, a muestras que contengan vitamina D₂ pura, o a aquellas de constitución conocida.

Todas las vitaminas D tienen prácticamente el mismo espectro de absorción, por lo cual no es posible utilizarlo para determinar cantidades individuales en una muestra.

Otro inconveniente lo constituye el que la vitamina A acompaña casi siempre a la D y su absorción a 325 m.μ. puede interferir según la concentración.

Fuchs trató de determinar el tenor de soluciones de aceite saponificando previamente y disolviendo el insaponificable en etanol-benceno.-

Tópelman y Schukhnecht (7) informan no haber logrado valores significativos con aceites y grasas pobres en vitamina.

Shear comprobó que el aceite de hígado de bacalao y el colesterol irradiado producían un color rojo oscuro en presencia de clorhidrato de anilina disuelto en gran cantidad de anilina (2:15) (8); posteriormente la especificidad de esta reacción fué negada (9).

Tzoni estableció en 1936 (10) una técnica colorimétrica basada en la reacción que se produce con cloruro de aluminio anhidro y pirogalol; el color producido- rojo violado- sólo es proporcional a la concentración dentro de límites muy estrechos.

El reactivo 1-3 diclorhidrina, introducido por Sobel para la determinación de vitamina A, produce con la vitamina D una coloración amarilla inestable, que pasa al verde.- El máximo de absorción se encuentra a 625 m.μ.. se produce a los 45 minutos y dura varias horas constante, (11)

Esta es la única reacción conocida que permite diferenciar el ergosterol del 7-dehidrocolesterol.- Campbell (12) aumentó la sensibilidad de reacción por selección de la longitud de onda en la medición del color.

El método más utilizado para la determinación no biológica de vitamina D es el de Brookmann y Chen (13), basado en la producción de un color anaranjado rojizo con una solución clorofórmica, libre de alcohol, de cloruro de antimonio.- Este método será usado en este trabajo, y sus características serán objeto de comentario posterior.

El mayor problema de la determinación química de la vitamina D lo produce la separación de las interferencias que casi siempre la acompañan; por ejemplo, el taquisterol y algunos otros esteroides producen el mismo color con el cloruro de antimonio, aunque con intensidad mucho menor o con máximo algo diferente.- Prácticamente no existe una reacción específica de vitamina D en presencia de vitamina A.

Se han ensayado muchas técnicas de eliminación de la vitamina A, en general de tipo cromatográfico.

Wolff (14) la separa por adsorción en tierra de Montana; los esteroides pueden ser separados por precipitación con digitonina.

Ritsert (15) ha usado el hidróxido de aluminio, que no retiene el calciferol pero sí la vitamina A.

También el Superfiltrol adsorbe la vitamina A, de sus soluciones en hexano-éter-etanol.- La técnica consiste en determinar el coeficiente de extinción de las muestras con cloruro de antimonio antes y después de la separación de la vitamina A y los esteroides.

Ewing y coautores (16), utilizando una columna dual en el dosaje de aceite de pescados, observaron que por cromatografía en superfiltrol-alúmina se obtenían dos clases de interferencias: una propia de los aceites y otra consistente en los productos de degradación de la vitamina A formados en la columna de superfiltrol.- Estos compuestos tienen características cromatográficas y espectrales semejantes a las de las vitaminas D.

Tschapke y Pessing (17) adsorben la vitamina A-alcohol, luego de saponificar, en caolín purificado, usando cloroformo como solvente.- Los mismos autores informaron a posteriori que existen dificultades motivadas por la calidad variable del caolín, razón por la cual lo reemplazaron por talco(18).

Schmall y coautores (19) encuentran inconveniente con esta última técnica a causa de la gran cantidad de vitamina A que es eluida e interfiere.

Nakamiya y Koizumi (20) destruyen la vitamina A en un tratamiento preliminar que consiste en irradiar con luz de mercurio.- Este procedimiento destruye también algo de vitamina D, pero como esta reacción es muy lenta el método puede considerarse exacto si se limita el tiempo de acción.

Kilas, Heggie y Reynolds (21) añaden anhídrido maleico para destruir la vitamina A y otros interferentes cuando se emplea la reacción del cloruro de antimonio; este método será también comentado más adelante, al tratar el método a utilizarse.

- b) Método colorimétrico de Brockmann y Chen (13), previa eliminación de interferencias con anhídrido acético (21).

Fundamento y comentarios

Las vitaminas D en solución clorofórmica producen una coloración anaranjado-rojiza en presencia de una solución saturada de cloruro de antimonio.- El máximo de absorción del color producido se encuentra a 500 m μ ., y se produce entre los 3 y 10 minutos de agregado el reactivo, según el tipo de éste que se use.

Según la bibliografía original la vitamina A y los esteroides no interfieren (excepto el taquisterol).- Sin embargo, Milas y colaboradores descubrieron que en presencia de vitamina A los resultados requieren una corrección.

Ritsert encuentra al método no apropiado para productos que contengan ergosterol, 7-dehidrocolesterol y otras provitaminas, así como tampoco para los aceites de hígado de pescado que contengan vitamina A o soluciones biológicas cuya concentración en vitamina D sea baja.- En estos casos sugieren una eliminación de interferencias por cromatografía.

Racoul y Meunier (22) emplean una combinación de los reactivos de Brockmann y Chen y de Liebermann, con lo cual eliminan la interferencia de los esteroides de configuración trans, pudiéndose así diferenciar entre sí los esteroides que poseen actividad biológica de los otros y de la vitamina A.- El reactivo consiste en una solución saturada de cloruro de antimonio adicionada de anhídrido acético y ácido sulfúrico.

Las vitaminas D₂ y D₃, que poseen tres dobles enlaces, producen una coloración azul que se desvanece rápidamente, pero muy intensa; el lumisterol y el 7-dehidrocolesterol, que poseen dos enlaces dobles conjugados, originan una coloración que permanece constante y el colesterol, que posee un solo doble enlace, reacciona en forma muchísimo más lenta.

Nield, Russell y Zimmerli (23) sustituyen el cloruro de hidrógeno y el anhídrido acético por cloruro de acetilo, con lo cual obtienen un reactivo que permanece estable durante varias semanas (nueve) y es tres veces más sensible que el de Brockmann y Chen; el máximo de color se obtiene a los tres minutos de agregado el reactivo.

Las concentraciones de cloruro de acetilo y de cloruro de antimonio pueden tener variaciones de 1 a 5 % y 20 a 30 % respectivamente sin que

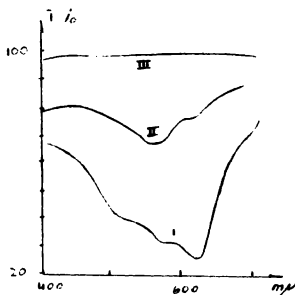
se alteren los resultados.- El límite de sensibilidad es 0,2 mcgr de vitamina D.

Milas, Heggie y Reynolds (21), siguiendo una modificación del método de Brockmann y Chen obtuvieron resultados concordantes con el método biológico, siempre que se introdujeran las correcciones correspondientes a vitamina A, carotenos y provitaminas D.- Como la modificación es engorrosa y requiere el uso de material costoso, propusieron la destrucción de los interferentes con anhídrido maleico (vitamina A, carotenos y posiblemente el colesterol).

La técnica consiste en tratar el insaponificable con anhídrido maleico en dioxano y eliminar los esteroides por enfriamiento a -10 a -15°C y filtración a la misma temperatura; las muestras así tratadas son saponificadas y extraídas nuevamente con éter, y los residuos etéreos tomados con cloroformo y sometidos a reacción con cloruro de antimonio.

Esta eliminación de interferencias ofrece el inconveniente de someter las muestras a un manipuleo excesivo (doble saponificación y extracción etérea) con fases muy reducidas en volumen. Si bien ello redundaría en perjuicio de la exactitud, la otra variante, que es el método cromatográfico, lo hace muy aceptable.

Se transcribe a continuación un gráfico sobre la eliminación de la vitamina A con anhídrido maleico, obtenido por los autores (21):



- I) Sin tratamiento
- II) Después de 15 minutos de calentamiento con anh. maleico.
- III) Después de 60 minutos de

Otra modificación introducida al reactivo de Brockmann y Chan, que ofrece excelentes perspectivas, es la de De Witt (24), quien encontró que el reemplazo del cloroforma por dicloruro de etileno tiene efecto estabilizante sobre el reactivo y produce una reacción de mayor sensibilidad.

Recientemente, Wilkie, Jones y Aline (25) han introducido el uso de blancos con anhídrido acético, a causa de la observación de que éste inhibe la reacción de la vitamina D con cloruro de antimonio, pero no lo hace con la mayoría de las sustancias interferentes, entre las cuales se encuentra, y principalmente, la fase degradativa de la vitamina A.- El reactivo utilizado para inhibir la reacción es una mezcla de anhídrido acético-dicloruro de etileno (1:1), para el reactivo de De Witt; el autor usará en la técnica que sigue, una mezcla similar clorofórmica.

Resumiendo, en el presente trabajo se usará:

- 1) Extracción y purificación según la técnica de Milas, Haggie y Reynolds.
- 2) Colorimetría según técnica de Mielé, Russell y Zimmerli.
- 3) Inclusión de blancos según técnica de Wilkie, Jones y Aline.
- 4) Inclusión de un blanco del inhibidor.

c) Técnicas1) Reactivos

Hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N: disuelva 28,0 gr. de HOK, perlas, en etanol 95 % y lleve el volumen a un litro.- Prepare diariamente.

Eter dietílico: lávelo con SO_4Fe 1 % para eliminar los peróxidos y luego 10 veces con agua destilada para eliminar el alcohol.- Séquelo sobre P_2O_5 , filtre y conserve sobre sodio metálico.- Destile antes de usar.

Hidróxido de potasio 0,5 N: disuelva 28,0 gr. de HOK, perlas, en agua destilada y lleve el volumen a un litro.

Sulfato de sodio anhidro: granular.

Nitrógeno: libre de oxidantes.

Etanol absoluto: químicamente puro; no debe contener peróxidos u otros oxidantes.

Benceno: pro análisis.

Mezcla etanol-benceno: a un volumen de etanol absoluto agregue cuatro de benceno.

Metanol anhidro: destile sobre P_2O_5 y recoja el destilado sobre sílica-gel, desprecando el primero y último 20 %.- Conserve sobre sílica-gel.

Nieva carbónica

Acetona: grado técnico.

Dioxano: recientemente destilado; libre de peróxidos.

Anhidrido maleico: químicamente puro; puede obtenerse destilando una mezcla 1:1,5 de ácido maleico y P_2O_5 .

Anhidrido maleico 10 % en dioxano: pese, por diferencia, una cantidad de anhidrido maleico aproximada a 10 gr. (para no humedecer el reactivo) y vuélquela sobre 50 ml. de dioxano.- Ajuste la dilución en forma tal de obtener la concentración del título.

Cloruro de acetilo: recientemente destilado.

Anhidrido acético: pro análisis.

Inhibidor del color: mezcle 25 ml. de anhidrido acético con 25 ml. de cloroformo (reactivo siguiente).

Cloroformo: lave 3 litros de cloroformo pro análisis con agua destilada, seque sobre P_2O_5 o Cl_2Oa anhidro y destile descartando el primer 10 %.- Cierre la circulación de agua del refrigerante en forma tal de que salgan vapores por el mismo (para drenar el agua condensada); abra nuevamen-

te la circulación de agua de refrigeración y recoja el condensado hasta que la temperatura llegue a 61 °0.- Conserve en frasco caramelo conteniendo CO_2 , anhídrido y Duroc.

Reactivo: pese un frasco cerrado de O_2 pro análisis y vuelque una cantidad aproximada a 54 gr. sobre 100 ml. de cloroformo.- Calcule la pesada por diferencia y agregue cloroformo hasta tener una concentración del 18%. Agite hasta disolver y filtre por papel de poro grueso lo más rápidamente posible.- Agregue 3 ml. de cloruro de acetilo por cada 100 ml. de reactivo. Conserve en frasco color caramelo y en heladera.

Solución standard de vitamina D: pese 25 mgr. de vitamina D y disuelva en éter dietílico.- Lleve a 100 ml. con el mismo solvente.- Diluya 5 ml. de esta solución a 50 ml. con éter dietílico.- La concentración final será de 25 mgr./ml., equivalente a 1000 U. I./ml.

Solución standard de vitaminas D y A: pase a un matraz aforado de 50 ml. 5 ml. de la primera dilución de standard de vitamina D y 5 ml. de una solución etérea de vitamina A que contenga 250 U. I./ml.- Enrase con éter. Cada ml. de esta solución contiene 25 mgr. de vitamina D y 25 U. I. de A.

2) Saponificación y extracción

Pese 10,0 gr. de muestra y páselos a un erlenmeyer de 125 cc. al cual se pueda adaptar un refrigerante a aire (N).

Pase a un erlenmeyer similar 5 ml. de standard de vitamina D (St_{D}).

Pase a un erlenmeyer similar 5 ml. de standard de vitaminas D y A ($\text{St}_{\text{D+A}}$).

Agregue a todos 50 ml. de HOK alcohólico 0,5 N y caliente a reflujo, sobre baño maría ebulliente, durante 45 minutos, agitando a menudo.

Deje enfriar y decantar y pase el líquido sobrenadante a ampollas de decantación de 125 ml.- Lave el residuo con 2 porciones de 10 ml. de agua destilada, luego con 25 ml. de éter dietílico y pase todo a la ampolla.

Extraiga la fase hidroalcohólica y pase el extracto etéreo a una ampolla de decantación de 250 ml., previo pasaje de la fase acuosa a otra ampolla de 125 ml.- Repita esta operación 8 veces.

Lave el extracto etéreo con 25 ml. de HOK 0,5 N y luego con agua destilada hasta eliminar la alcalinidad a la fenolftaleína.

Seque el extracto etéreo con 2-3 gr. de SO_4 , anhídrido y páselo (por la boca de la ampolla) a un vaso de precipitados de 250 ml.

Evapore sobre la plancha del baño maría hasta obtener un concentrado de 10-20 ml.- Pase éste a un vaso de ppdo. de 50 ml. y continúe evaporando bajo corriente de nitrógeno, justamente hasta sequedad.

3) Purificación

Agregue al residuo 2 ml. de la mezcla etanol-benceno y lleve a seco sobre la plancha del baño maría, bajo corriente de nitrógeno.

Al nuevo residuo agregue 4 ml. de metanol anhidro.

Enfríe entre 10 y 15 °C. bajo cero usando un baño de nieve carbónica y acetona.

Filtre en frío, por placa filtrante media- previamente enfriada- usando una moderada succión.- Lave con 1-2 ml. de metanol anhidro frío.

Pase los filtrados a un vaso de ppdo. de 50 ml. y evapore sobre la plancha del baño maría, bajo corriente de nitrógeno, hasta obtener un nuevo residuo.-

Agregue a éste 10 ml. de anhídrido maleico 10 % en dioxano y caliente una hora sobre el baño maría.- Esponga el dioxano a medida que se evapora.

4) Nueva saponificación y extracción

Deje enfriar a temperatura ambiente y agregue 10 ml. de HOK alcohólico 0,5 N y deje en reposo 15 minutos.

Pase el contenido del vaso a una ampolla de decantación de 125 ml. y extraiga 9 veces con porciones de 25 ml. de éter dietílico, juntándolos en una ampolla de decantación de 250 ml.

Lave el extracto etéreo con 15 ml. de HOK 0,5 N y luego con agua destilada hasta eliminar la alcalinidad, a la fenoltaleína.

Pase el extracto etéreo, previamente secado con SO_4Na_2 anhidro, a un vaso de ppdo. de 250 ml. y evapore sobre la plancha del baño maría hasta obtener un concentrado de 10-20 ml.- Pase éste a un vaso de ppdo. de 50 ml. y siga evaporando, ahora bajo corriente de nitrógeno, hasta llegar justamente a seco.

Disuelva el residuo con 10 ml. de cloroformo (volumetricamente).

5) Preparación de los standards

En sendos vasos de ppdo. de 50 ml. evapore, sobre la plancha del baño maría y bajo corriente de nitrógeno, 5 ml. de la solución standard de vitamina D (St_D) y 5 ml. de la solución standard de vitaminas A y D (St_{DA}).

Agregue a ambos 10 ml. de cloroformo (volumetricamente) y disuelva los residuos.

6) Espectrofotometría

Mida las absorciones de standards y muestras a 265 m μ ., usando cloroformo como blanco.- El autor usó un espectrofotómetro Beckman, modelo D U y células de sílice de un cm. de paso de luz.

7) Colorimetría

Disponga para cada muestra o standard de una serie de tubos de ensayo de 4" x 1", numerados de 1 a 5.

Pase 1 ml. de cada muestra o standard a cada uno de los cinco tubos de su serie.

A los tubos N $^{\circ}$ 1 agregue 5,5 ml. de cloroformo.

A los tubos N $^{\circ}$ 2 y 3 agregue 0,5 ml. de cloroformo.

A los tubos N $^{\circ}$ 4 y 5 agregue 0,5 ml. de inhibidor.

A los tubos N $^{\circ}$ 2, 3, 4 y 5 agregue consecutivamente 5 ml. de reactivo de antimonio, en forma tal de que pueda medirse su absorción a 500 m μ . exactamente a los 3 minutos de haberse agregado.- Es de suma importancia que el lapso sea exactamente el mismo para todos los tubos más que el valor de su duración.- Use como blanco el respectivo tubo N $^{\circ}$ 1.

El autor usó el mismo aparato que en la espectrofotometría y células Gorex de un cm. de paso de luz.

8) Cálculos

$$\frac{I_m \cdot OFM}{I_{St_D} \cdot OFm} \times f, \text{ mgr. de vitamina D/gr. de muestra, expresado como vitamina D}_3.$$

donde I_m es la absorción de la muestra.

OFM_D es la concentración del St_D .

I_{St_D} es la absorción del St_D .

OFm es la concentración de las muestras.

f es la relación entre la absorción del standard externo al standard interno. $f = I_{St_D} / I_{St_M}$.

Cálculo de las concentraciones finales:

OFm : en todos los casos la pesada de muestra fué de 10,0 gr, y el integrante activo se diluyó en 10 ml. de cloroformo.

Queda pues una $OFm = 1,0 \text{ gr/ml.}$

Muestra No	Pesada (gr.)	Conc. Final (gr./ml.)
I	10,0012	1,0001
II	10,0008	1,0001
III	10,0013	1,0001
IV	10,0002	1,0000
V	10,0041	1,0004

QEnt_D: se pesaron 0,0250 gr de vitamina D₃ cristalina de la Pebock Fine Chemical Co., de potencia 40.000.000 U. I./gr., previamente secada al vacío sobre P₂O₅, durante 24 horas.- Se diluyeron a 100 ml. con éter dietílico y 5 ml. de esta nueva dilución se llevaron 50 ml. con el mismo solvente.- 5 ml. de ella se evaporaron y el residuo fué tomado con 10 ml. de cloroformo.

$$\frac{0,0250 \text{ gr}}{100} \cdot \frac{5}{50} \cdot \frac{5}{10} = 0,000125 \text{ gr./ml.}, \text{ equivalente a } 12,5 \text{ mgr. de vitamina D}_3/\text{ml.}, \text{ equivalente a } 500 \text{ U.I./ml.}$$

QEnt_{DA}: 5 ml. de la segunda dilución del primer standard (St_D) se trataron exactamente igual que las muestras.- La concentración final es igual a la del anterior.

QEnt_{DA}: con el objeto de controlar la eliminación de la vitamina A como interferencia, se incluyó en ambos standards anteriores la presencia de una concentración final de vitamina A de 12,5 U.I./ml.

$$\frac{0,0250 \text{ gr Vit D}}{100} \quad \frac{5}{50} \cdot \frac{5}{10} = 12,5 \text{ mgr. de vit. D} = 12,5 \text{ U.I. de vit. A por ml.}$$

QEnt_{DAI}: se corrió un standard interno, en forma similar al anterior con 5 ml. de la primera dilución mixta.- La concentración final de este standard es igual que la del externo.-

En ambos standards combinados se eligió una concentración final de vitamina A semejante a la que normalmente se usa en las determinaciones corrientes.

9) Experimental

	St _D	St _{DA}	St _{DA}	St _{DAI}	I	II	III	IV	V
Abs. 265 m.μ.	0,428	0,425	Mayor de 20	Mayor de 20	Mayor de 20	Mayor de 20	Mayor de 20	Mayor de 20	Mayor de 20
Tubos N° 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Tubos N° 2	0,478	0,555	0,452	0,475	0,522	0,775	0,562	0,780	0,511
Tubos N° 3	0,476	0,558	0,458	0,465	0,520	0,769	0,561	0,772	0,505
Tubos N° 4	0,123	0,195	0,146	0,151	0,179	0,210	0,179	0,468	0,168
Tubos N° 5	0,109	0,107	0,111	0,108	0,126	0,138	0,137	0,189	0,120
Promedio de Tubos 2 y 3	0,477	0,557	0,455	0,470	0,521	0,772	0,562	0,776	0,508
L ₄ -L ₅	0,014	0,088	0,035	0,043	0,053	0,072	0,042	0,279	0,048
L _{12,3} - (L ₄ -L ₅)	0,463	0,469	0,420	0,427	0,468	0,700	0,522	0,497	0,460
f=0,463/0,420=1,102									
Resultados (u./gr.)					558	834	622	592	548
Resultados (mgr/gr)					13,9	20,9	15,5	14,8	13,7

d) Resultados obtenidos y comentarios

MUESTRA Nº	Alga	U. I./gr. sobre muestra: tal cual	sobre muestra: anhídria
I	Macrocistys pyrifera	556	680
II	Lessonia flavicans	634	937
III	Lessonia fassia	622	690
IV	Iridea laminaroides	592	672
V	Iridea cordata	548	623

Se ha determinado el contenido de vitamina D mediante la reacción colorimétrica de Brookmann y Chen.

Se eliminó la interferencia de la vitamina A y esteroides según la técnica de Milas, Haggie y Reynolds por destrucción de la primera con anhídrido maleico y precipitación de los segundos a baja temperatura.

Se adicionó un standard de vitamina D con vitamina A, en proporciones analíticas, y se comprobó por las lecturas que la eliminación es en esas condiciones satisfactoria; un standard similar corrido solamente en la colorimetría indicó que esa misma concentración la presencia de vitamina A eleva las lecturas.

Se introdujeron blancos de reactivos según técnica de Wilkie, Jones y Kline, por inhibición del color con anhídrido acético.- Si bien en los standards internos se notó el efecto de la vitamina A agregada, éste se observó con mayor intensidad en las lecturas de las muestras, que hubiesen sido mucho mayores de no mediar la corrección por inhibición.

Se intentó dosar espectrofotométricamente la vitamina D de los extractos por medición de la absorción a 265 m μ .- encontrándose resultados satisfactorios sólo para los standards externos.- Evidentemente el tratamiento introduce interferencias a este método.

Los resultados obtenidos indican cantidades de vitamina D mucho más altas de las que era dable esperar, máxime si se tiene en cuenta que por tratarse de tejidos vegetales sólo podemos encontrar en ellos vitamina D obtenida por irradiación, y que alimentos naturales ricos en ella la poseen en cantidades mucho menores.

e) Bibliografía

- 1) May E. W y Wigannt M.- Archiv. Paediatrie 4,1,10 (1939).
- 2) Jeans P. G.- J. Am. Med. Assoc. 106, 2066 y 2150 (1936).
- 3) Ride T. H., Sperti G., Goode G. y Cassidy H.- J. Am. Med Assoc. 106, 452 (1936).
- 4) Sets P.- Z. physiol. Chem. 215, 183 (1933).
- 5) Reed O., Struck H. y Steck I.- Univ. Chicago Press 63 (1939).
- 6) Ooward K.- Bull. Org. d'Hyg. Soc. Nat. 9, 449 (1940-1).
- 7) Töpelmann H. y Schuknecht W.- Zeit. Vitaminf. 4, 111, (1935).
- 8) Shear M. W.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 23, 546 (1926).
- 9) Levine J.- Bioch. J.- 27, 2047 (1933).
- 10) Tsoni H.- Biochem. Zeit. 287, 18 (1936).
- 11) Sebel A., Mayer M. y Kramer B.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 17, 160 (1945).
- 12) Campbell J. A.- Anal. Chem. 20, 766 (1948).
- 13) Brockmann H. y Chen Y.- Z. physiol. Chem. 241, 129 (1936).
- 14) Wolff L.- Zeit. Vitaminf. 7, 277 (1938).
- 15) Villiella G. G.- Vitaminas, 99, (1948).
- 16) Irving D. T., Schlabach T. D. y Rosell M. J.- Anal. Chem. 26, 1406 (1954).
- 17) Tschapke H. y Fleessing M.- Die Pharmazie 12, 262 (1957).
- 18) Tschapke H. y Fleessing M.- Intern. Z. Vitamin. 20, 390 (1958).
- 19) Schall B. y coautores.- J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed. 47, 839 (1958).
- 20) Nakamiya y Keimmi - Bull. Inst. Phys. Chem. Research (Tokio) 19 1275 (1940).
- 21) Milas M. A., Heggie R. y Reynolds A. J.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 13, 227 (1941).
- 22) Raoul Y. y Mounier P.- Comp. rend. 209, 546 (1939).
- 23) Nield O., Russell W. y Zimmerli A.- J. Biol. Chem. 136, 73 (1940).
- 24) De Witt J. B.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 18, 117 (1946).
- 25) Wilkie J. B., Jones S. W. y Kline O. L.- J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed. 47, 385 (1958).

VITAMINA PP

La vitamina PP o antipelagrosa, o preventivo-pelagra, está constituida por dos compuestos íntimamente relacionados: el ácido nicotínico (niacina) y su amida, la nicotinamida (niacinamida, niámid).

El factor denominado vitamina B₃ (eluido de tierras Fuller) parece ser idéntico al ácido nicotínico (1).

A) Antecedentesa) Características biológicas

Existen en los tejidos animales en estado libre, y en combinación con nucleótidos y fosfatos formando la coenzima I (nucleótido de difosfopiridina) y la coenzima II (nucleótido de trifosfopiridina).

Las coenzimas I y II toman parte en el transporte de hidrógeno indispensable para las reacciones de óxido reducción celular.

La avitaminosis ha sido estudiada fundamentalmente en el hombre y en el perro; se la conoce propiamente en el primero como Enfermedad de Casal dado que no siempre se presentan, en el hombre, lesiones cutáneas.

Una serie de síntomas son la irritabilidad del carácter, pérdida de la memoria, astenia, insomnio y, en fases más avanzadas, las formas delirantes y de inconciencia, con movimientos retrógrados del tipo de succión y prensión.

Son frecuentes también lesiones de tipo polineurítico; el adelgazamiento es uno de los síntomas más precoces, al igual que la sintomatología de carácter hemático (anemia macrocitaria, de tipo perniciosiforme).

Las lesiones cutáneas con que se la distingue, no siempre se presentan; en caso afirmativo, se producen en el dorso de las manos, de los pies, y en el cuello, y acaban en un estado atrófico de la piel.

También aparecen alteraciones digestivas: hipoclorhidria y estreñimiento.- En fases más avanzadas se producen lesiones del intestino más intensas, como enteritis y colitis que pueden llegar a ulcerosas.

La hiperdosificación no produce cuadros tóxicos, aunque pueden presentarse alteraciones agudas de intolerancia.

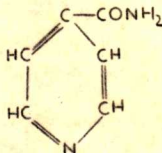
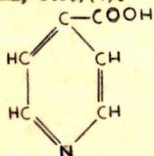
La necesidad diaria en el hombre es de 15 a 23 mgr., según la actividad y el sexo.

La amida parece ser una forma de reserva hepática.

b) Características químicas y físicas

En el año 1937 Elvehjem (2)(3) consigue identificar el ácido nicotínico como la vitamina antipelagrosa; también la amida fué identificada con tal característica, en extractos hepáticos.

Junto con ellos, se identificaron otros compuestos de la misma serie, pero de actividad mucho menor (ácido picolínico, isonicotínico, coramina, trigonelina, etc.)(4).



El ácido nicotínico es el 3-piridin-carboxílico.

Cristaliza en agujas de color blanco que funden a 235,5-236,6 °C. y subliman sin descomposición.

Es soluble en agua (1,67 gr./100 ml.), en alcohol etílico (0,73 gr./100 ml.) y en piridina (10,03 gr./100 ml.).

Es poco soluble en éter sulfúrico, acetona, isobutanol, benceno y dioxano, en insoluble en éter de petróleo y tolueno.

Es anfótero a causa de la presencia del grupo carboxilo y de la basicidad del nitrógeno piridínico; entre las sales, son bien conocidas el clorhidrato, el nitrato y el picrato; y entre los derivados básicos, la más conocida es la nicotinamida.

Es muy estable a la acción de los ácidos y álcalis, del oxígeno del aire, y en general a la acción de reactivos oxidantes.

No es higroscópico.

Absorbe en la zona ultravioleta del espectro, con un máximo a los 385 mμ. (5).

La nicotinamida es también un sólido cristalino blanco; funde a 129°C

Es soluble en agua (100 gr./100 ml.) y en disolventes orgánicos tales como el éter etílico, alcohol etílico (66,6 gr./100 ml.), cloroformo, glicerina (10 gr./100 ml.), butanol y benceno.- La extracción con agua y solventes orgánicos hace que el ácido permanezca en la fase acuosa.

Tiene un espectro de absorción en la zona ultravioleta que posee dos máximos: 210 y 365 m μ . respectivamente.

Las propiedades antipélagricas parecen estar ligadas al anillo piridínico, si lleva un grupo carboxilo en posición 3.

El anillo nitrogenado es aparentemente insustituible, dado que la trigonelina (metil betaína del ácido nicotínico) es inactiva (7), lo cual es comprensible desde que el átomo de nitrógeno es el punto de unión en la molécula enzimática.

Aunque no sea precisamente amido, cualquier esterificación conserva las propiedades siempre que en el organismo pueda quedar libre el grupo -COOH.

Como ya se dijo, otros compuestos relacionados tienen actividad antipélagrica, aunque en grado mucho menor, y se acepta que estos productos son convertidos en nicotinamida en el organismo; tal es el caso de la N-metilnicotinamida, nicotinato de etilo, ioduro de glucósido-nicotinamida, ácido nicotinúrico, etc. (6).

Por ejemplo, ácidos quinolínicos, pirazin-carboxílico y pirazin-2-3-dicarboxílico, tienen actividad 50-60 veces menor, y ofrecen la particularidad de no producir el efecto vasodilatador del ácido nicotínico (6)(8).

B) Desarrollo del método de determinacióna) Determinación química y/o física en general y elección del método.

La determinación espectrofotométrica solo se utiliza en soluciones puras o en muestras de composición conocida.

Para la determinación en tabletas y ampollas el método del A.O.A.O. (Association of Official Agricultural Chemists), consiste en la sublimación del ácido nicotínico y pesada o titulación del sublimado.

La reacción de Vongerichten con 2-4-dinitro-cloro-benceno fué propuesta por su autor en el año 1899 para la determinación de piridina; por acción del reactivo en solución alcohólica y en caliente, e hidróxido de sodio en frío se produce una coloración violeta.- El ácido nicotínico la da, pero más débilmente.- Karrer y Keller (9), y con anterioridad otros investigadores (10), desarrollaron técnicas cuantitativas basadas en ella.

Daroga propuso la precipitación con ácido fosfomolibdico, disolución en álcali y desarrollo del color azul de molibdeno con cloruro estañoso, (11).- Este método es sensible pero poco específico.

Teeri y Shimer desarrollaron un color con m-fenilendiamina en medio ácido, y lo utilizaron cuantitativamente (12).

La reacción más utilizada es la de Koenig, que se produce con bromuro de cianógeno; puede leerse directamente la absorción del compuesto de adición formado entre el reactivo y el ácido nicotínico, o bien del compuesto coloreado que se forma por acoplamiento posterior con aminas aromáticas (13)(14).- Esta última es la propiamente conocida como reacción de Koenig.

Los compuestos piridínicos sustituidos en las posiciones α y δ no reaccionan.

El mecanismo importa la apertura del ciclo piridínico; el complejo amarillo obtenido con una amina aromática es probablemente un derivado del aldehído glutacónico (15).

Se han propuesto varias aminas para la producción del color, sin que ello produzca variantes de importancia en el resultado.- (15') (15").

Entre ellas, la más usada es la anilina (16)(17)(18)(19)(20)(21), y

le sigue en la serie p-aminoacetofenona (22)(23)(24)(25) y parametilaminofenol (13).

En todos los casos el complejo formado es de color amarillo.

Según Baudier y Hald (13) el metol al 5% produce una intensidad de color mayor que la de la anilina y también mucho más estable: llega a su máximo después de una hora y permanece inalterada hasta 72 horas, siempre que se encuentre al abrigo de la luz.- El calentamiento a 75-80 °C. favorece la reacción.

Las técnicas con anilina tienen la ventaja de ser más rápidas (máximo en 3 minutos) y no necesitan calentamiento; además el color puede extraerse con alcohol amílico - según recomienda Swaminathan - lo cual representa una ventaja en la eliminación de colores interferentes.

Algunos autores prefieren el butanol, pues el alcohol amílico puede contener derivados piridínicos.

También son mejores en cuanto a que la concentración de amina no influye en los resultados (puede variar entre 0,5 y 5 %), mientras que la concentración del metol es muy importante, lo mismo que la influencia de la luz.

El autor ha utilizado la técnica con anilina con muy buenos resultados y en un todo comparable a la determinación por medio de la lectura de absorción del compuesto ácido nicotínico-bromuro de cianógeno, es decir sin el uso de las aminas aromáticas.

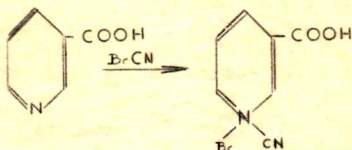
Este último método tiene sobre el primero la ventaja de incluir un reactivo menos, por lo cual el autor la prefiere para el caso de una muestra muy compleja, como de la que se trata.

b) Determinación colorimétrica por el bromo-cianocompuesto.Fundamento y comentarios.

El método se basa en la medición del color amarillo producido por el compuesto de adición que se forma entre el ácido nicotínico y el bromuro de cianógeno, en medio amoniacal.

El máximo de absorción se encuentra a 410 m μ ., y su intensidad es proporcional a la concentración de ácido nicotínico.

En parte, la reacción que se produce es:



Probablemente el ión amonio también intervenga en el compuesto de adición, aún cuando no hay mucha información al respecto.

Para derivados sustituidos en la posición 6, la intensidad de la reacción varía como sigue: ácido nicotínico 100, nicotinamida 142, ácido nicotinúrico 42, amino-piridina 15, coramina 6.

La β -picolina casi no reacciona, y la trigonelina lo hace sólo luego de hidrólisis alcalina.

El color producido por el ácido nicotínico tiene un coeficiente de absorción (1 %. 1 cm.) de 4300-4600.

El tiempo en que se produce el máximo de intensidad depende de la concentración del reactivo: BrCN al 10 % produce el máximo a los 2-2½ minutos, mientras que concentraciones de 5 ó 7 % lo producen en 3-5; la concentración no influye en cambio, en lo que respecta a la vitamina.

La nicotinamida también produce la reacción, aún cuando con distintas características: máximo de absorción a 398 m μ ., con el máximo de intensidad a los 6 minutos.

La presencia de la vitamina en forma de coenzima hace necesaria la hidrólisis de las muestras.

Bandier, Jones y otros autores (23)(24) proponen la hidrólisis alcalina, dado que se encontró que las coenzimas y la nicotinamida son hi-

drolizadas por ácido o álcali 1 N, pero el ácido nicotínico no lo hace en una hidrólisis tan moderada.

El ácido nicotínico se convierte en nicotínico en medio alcalino y además, cantidades variables de trigonelina se transforman en productos que reaccionan como la niacina (26); para evitar este tipo de error, se ha propuesto la hidrólisis ácida, con ácidos clorhídrico y nítrico, que transforma la nicotinamida, las coenzimas y el ácido nicotínico, pero no la trigonelina.

A posteriori, Friedeman y Frazier (29) introducen la hidrólisis alcalina con una suspensión de hidróxido de calcio, pues según ellos las dos anteriores producen la descomposición de azúcares y proteínas en sustancias amínicas reactivas y coloraciones extrañas, respectivamente.

Muestran que de esta manera producen el mismo grado de conversión, pero sin producir sustancias interferentes del tipo mencionado.

El autor ha usado con buenos resultados la hidrólisis ácida moderada, en medio clorhídrico 3 N (las antes mencionadas eran en ácidos clorhídrico y nítrico concentrados), y a baja temperatura (70 °C.), para evitar la caramelización de los azúcares, completada con una hidrólisis enzimática posterior a pH 4,5 y a la misma temperatura que en otros casos similares (50 °C.).

En cuanto a la eliminación de pigmentos interferentes, se han sugerido varios caminos.

Jones (23) propone el uso de acetona para precipitarlos.

Hale y coautores (24) recomiendan, con el mismo fin, alcohol etílico.

Arnold y coautores (22) desarrollan una extracción con acetato de etilo, lo cual deja las sustancias interferentes en la fase acuosa.

Dann y Handler (30) usaron reactivo de Lloyd como adsorbente, tratando luego el eluido con Nitrato de Plomo para eliminar las proteínas, para la determinación en tejidos animales. Remarcaron además la importancia de la decoloración del extracto final.

Friedeman y Frazier proponen para la hidrólisis y decoloración, la precipitación con hidróxido de zinc seguido de digestión con hidróxido de calcio.- Estos autores constatan además que, luego de la hidrólisis ácida, la decoloración con reactivo de Lloyd y nitrato de plomo es satisfactoria.

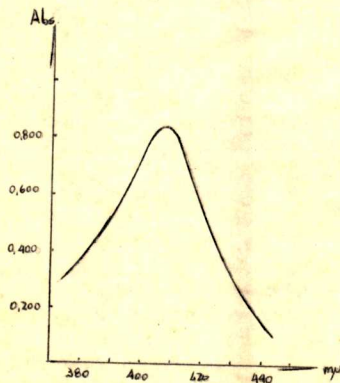
Swaminathan (31)(32) también utilizó hidróxido de zinc, pero James y coautores (25) indican que no es mejor que el uso de reactivo de Lloyd y nitrato de plomo, para la determinación en cereales y alimentos.

Con respecto a sustancias interferentes de tipo pirimidínico, Bandier encontró que la adición de fosfato monopotásico antes de la colorimetría disminuye al mínimo su reacción coloreada (33).- Nota.

Resumiendo: se hidrolizará en medio clorhídrico 3 N y enzimáticamente; se purificará el hidrolizado con reactivo de Lloyd y el eluido con nitrato de plomo.

La técnica de purificación es una modificación de la de James, Norris y Wokes (25), quienes usan la determinación con anilina.

El dosaje se hará según el método de Mueller y Fox (26)(27), con la variante de leer la absorción a 410 m μ . en lugar de 408 m μ como indican los autores del método, y documentan con la curva que se indica a continuación.



Nota: se refiere a la reacción incluyendo la copulación con anilina.

c) Técnicas1) Reactivos

Ácido clorhídrico 3 N: diluya 100 ml. de ClH concentrado con 300 ml. de agua destilada.

Solución de enzima: se prepara diariamente, por agitación de 6 gr. Takadiastasa (Parke Davis & Co., Detroit, Mich.) con acetato de sodio 2,5 N hasta completar 100 ml..- Pueden usarse también Clarasa, kylase u otras fosfatasa.

Acetato de sodio 2.5 N: disuelva 205 gr. de $C_2H_3O_2Na$ anhidro, ó 345 gr. de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ en agua destilada y lleve el volumen a 1000 ml.

Reactivo de Lloyd:

Ácido sulfúrico 0.2 N: diluya 5,6 ml. de SO_4H_2 concentrado a 1000 ml. con agua destilada.

Ácido clorhídrico 0.1 N: diluya 8,5 ml. de ClH concentrado a 1000 ml. con agua destilada.

Hidróxido de sodio 0.5 N: disuelva 20,0 gr de HONa, perlas, en agua destilada, y complete el volumen a 1000 ml..

Nitrato de plomo: pro análisis.

Fosfato de potasio. tribásico: pro análisis.

Solución amoniacal buffer: disuelva 87,0 gr. PO_4H_2K en 500 ml. de agua destilada, agregue 107,0 gr. de $ClNH_4$ y efectúe la disolución; agregue 6,7 ml. de $HONH_4$ concentrado, diluya con agua destilada al volumen de 1 litro y homogenice.- Si fuese necesario, filtre antes de usar.

Cianuro de potasio al 10 %: disuelva 20 gr de ONK en agua destilada y lleve a 200 ml.

Agua de bromo: debe ser saturada.

Solución de bromuro de cianógeno: pase a un erlenmeyer de 250 cc., con tapón esmerilado, 190 ml. de la solución de Br_2 y enfríe en baño de hielo; agregue la solución de ONa, gota a gota, hasta decoloración del agua de Br. y un exceso destinado a la observación de la máxima decoloración obtenible.- Agregue 10 ml. de agua de Br y titule exactamente hasta este punto final.- la solución de BrON tendrá una concentración aproximada 4%.

Manténgase helada hasta el momento de usar.

Solución standard de ácido nicotínico: Pese 100 mgr. de ácido nicotínico

de potencia conocida y diluya a 500 ml. con agua destilada.- Diluya 5 ml. de esta solución a 200 ml., también con agua destilada.

Cada ml. de la segunda dilución contendrá 5 mcgr. de niacina.

Ácido fosfórico al 20 %: diluya 23,5 ml. de PO_4H_3 85 % a 100 ml., con agua destilada.

Ácido fosfórico al 4 %: diluya 20 ml. del anterior a 100 ml., con agua destilada.

2) Extracción e hidrólisis

Pese 5,0 gr. de muestra y páselos a un erlenmeyer de 125 ml., con tapón esmerilado.

Haga lo mismo con 10 ml. de la primera dilución de standard.

Agregue 40 ml. de $\text{OLH } 3 \text{ N}$ y agite hasta que toda la masa de muestra se haya puesto en contacto con el ácido.

Mantenga durante 1,5 hora a 70°C . en baño de agua, agitando periódicamente.

Lleve a temperatura ambiente y agregue $\text{CH}_3\text{COONa } 2,5 \text{ M}$ hasta viraje del verde de bromocresol, o hasta pH 4,6 en pHmetro.

Agregue 2 ml. de la solución de enzima e incube unas 12 horas a 60°C .

Deje tomar temperatura ambiente, agitando constantemente mientras ello se realiza, en forma rotativa.

Agite energicamente durante 10 minutos.

Filtre, utilizando vacío, hasta obtener un filtrado claro; lave el residuo con 3 porciones de 10 ml. cada una de $\text{OLH } 0,1 \text{ N}$ y lleve el filtrado y los lavados hasta pH 0,5-1,0 con ácido clorhídrico.

Si se produjese turbidez, filtre nuevamente.

3) Purificación

Pase el filtrado a un erlenmeyer de 125 cc. con tapón esmerilado, y agregue 4 gr. de reactivo de Lloyd.

Agite energicamente durante 5 minutos, pase el contenido a tubo de centrifuga y centrifugue a 500 r.p.m. hasta obtener un sobrenadante claro; decante, desmante el el líquido y lave el residuo con 25 ml. de SO_4H_2 0,2 N por agitación suave.

Centrifugue 5 minutos y descarte nuevamente el sobrenadante.

Agregue al residuo, en el mismo tubo de centrifuga, 15 ml. de HClNa 0,5 N y agite vigorosamente durante 3 minutos.

Centrifugue 5 minutos y pase el sobrenadante a otro tubo de centrifuga; lave el residuo por agitación con 5 ml. de HClNa 0,5 N, centrifugue y una el sobrenadante con el anterior; repita la operación.

Agregue al líquido así obtenido (el residuo de la operación anterior se desecha) 1-2 gotas de fenoltaleína 1% y luego cristales de $(\text{NO}_3)_2\text{Pb}$ hasta color ligeramente rosado (aproximadamente 1 gr.).- Si es necesario centrifugue, y prosiga con la fase líquida.

Agregue cristales de PO_4K_3 hasta nuevo viraje de la fenoltaleína, y si es necesario, centrifugue y prosiga con el sobrenadante.

Agregue 1-2 gotas de PO_4H_3 20 % y lleve a pH 4,5 con PO_4H_3 4 %.

Pase a matraz aforado de 50 ml. y enrase con agua destilada.

4) Reacción y colorimetría

Para cada una de las muestras, incluyendo el standard interno, disponga la siguiente tanda de 4 erlenmeyers de 50 ml., con las cantidades indicadas:

Erlenmeyer Nº 1: Blanco de reactivos.

A 4 ml. de agua destilada, agregue 5 ml. de buffer amoniacal.

Erlenmeyer Nº 2: Standard de comparación.

A 4 ml. de la solución standard, agregue 5 ml. de buffer amoniacal.

Erlenmeyer Nº 3: Muestra y Standard interno.

A 4 ml. de solución final, agregue 5 ml. de buffer amoniacal.

Erlenmeyer Nº 4: Blanco de muestra y standard interno.

A 4 ml. de solución final, agregue 5 ml. de buffer amoniacal y 5 ml. de agua destilada.

A los erlenmeyers Nºs 1, 2, 3, agregue rápidamente y en ese orden, 5 ml. de solución de BrON .

Mida las absorciones de los erlenmeyers Nºs 2, 3 y 4, conservando el orden, a 410 m μ ., usando como blanco el blanco de reactivos.

Repita la lectura de las absorciones de las tres soluciones a razón de una tanda cada minuto, hasta que la diferencia entre las lecturas de 2 y 3 lleguen a un máximo, y luego varias tandas de lecturas descendentes para asegurarlo.

Las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU, usando células Corex de 1 cm. de paso de luz.

5) Cálculos

El resultado final se calcula según la siguiente fórmula:

$$f = \frac{L_3 - L_4}{L_2} \cdot \frac{OFst}{OFm} = \text{mgr. de ácido nicotínico/gr. de muestra.}$$

donde: f es la relación entre las concentraciones inicial y final de St_1

L_3 es la absorción de la muestra.

L_4 es la absorción del blanco de la muestra.

L_2 es la absorción del standard.

Se refiere a las máximas absorciones.

$OFst$ es la concentración final del standard.

OFm es la concentración final de la muestra.

Cálculo de las concentraciones finales:

$OFst$: se pesaron 100,0 mgr. de ácido nicotínico U.S.P. Reference Standard, y se diluyeron a 500 ml. con agua destilada.- 5 ml. de esta dilución se llevaron a 200 ml. con el mismo medio.

$$\frac{0,1000}{500} \cdot \frac{5}{200} = 5 \text{ mgr./ml.}$$

$OFst_1$: se introducen en el proceso 1,0 ml. de la primera dilución del standard, y se lleva a 50 ml.

$$\frac{0,1000}{500} \cdot \frac{1}{50} = 4 \text{ mgr./ml.}$$

OFm : se pesaron 5,0 gr de cada muestra, que luego del proceso se diluyeron a 50 ml.

$$\frac{5,0}{50} = 0,1 \text{ gr./ml.}$$

<u>Muestra N°</u>	<u>Pesada (gr.)</u>	<u>Concentración final (gr/ml)</u>
I	5,0032	0,1001
II	5,0013	0,1000
III	5,0007	0,1000
IV	5,0006	0,1000
V	5,0019	0,1000

6) Experimental

Standard interno				Muestra No I			
I_2	I_3	I_4	I_3-I_4	I_2	I_3	I_4	I_3-I_4
0,240	0,196	-0,004	0,200	0,185	0,253	0,067	0,186
0,272	0,205	-0,005	0,210	0,230	0,277	0,069	0,208
0,293	0,220	-0,006	0,226	0,275	0,302	0,068	0,234
0,315	0,226	-0,007	0,233	0,304	0,322	0,067	0,255
0,320	0,234	-0,007	0,241	0,325	0,335	0,066	0,269
0,332	0,241	-0,007	0,248	0,340	0,339	0,067	0,268
0,338	0,246	-0,007	0,253	0,346	0,342	0,068	0,274
0,342	0,249	-0,007	0,256	0,348	0,346	0,069	0,277
0,342	0,251	-0,006	0,257	0,350	0,347	0,068	0,279
0,340	0,250	-0,006	0,256	0,349	0,344	0,067	0,277
0,337	0,248	-0,006	0,254	0,340	0,340	0,067	0,273
0,332	0,245	-0,006	0,251	0,325	0,338	0,067	0,271
0,325	0,232	-0,006	0,238	0,309	0,339	0,067	0,272
Máximo de St: 0,342				0,281	0,336	0,067	0,269
Máximo de St ₁ : 0,257				Máximo de standard: 0,350			
Resultado St ₁ : 3,75 mgr./ml.				Máximo de muestra: 0,279			
Factor f_1 : 4,00/3,75; f_2 1,066							

Muestra No II							
I_2	I_3	I_4	I_3-I_4				
0,181	0,098	0,070	0,028	0,346	0,115	0,072	0,043
0,232	0,104	0,068	0,036	0,342	0,113	0,072	0,041
0,270	0,108	0,070	0,038	0,339	0,110	0,072	0,038
0,297	0,112	0,070	0,042	0,337	0,110	0,073	0,037
0,315	0,114	0,069	0,045	Máximo de standard: 0,348			
0,329	0,117	0,069	0,048	Máximo de muestra: 0,050			
0,342	0,122	0,072	0,050				
0,342	0,117	0,068	0,049				
0,348	0,119	0,072	0,047				
0,348	0,119	0,072	0,047				

Muestra Nº III

L_2	L_3	L_4	L_3-L_4
0,282	0,137	0,106	0,031
0,298	0,146	0,107	0,039
0,321	0,158	0,108	0,050
0,334	0,165	0,108	0,057
0,338	0,172	0,107	0,065
0,344	0,186	0,108	0,078
0,348	0,192	0,108	0,084
0,349	0,197	0,107	0,090
0,346	0,199	0,108	0,091
0,341	0,195	0,108	0,087
0,337	0,191	0,108	0,083
0,337	0,186	0,108	0,078
0,335	0,180	0,108	0,072

Máximo de standard: 0,349

Máximo de muestra: 0,091

Muestra Nº V

L_2	L_3	L_4	L_3-L_4
0,169	0,601	0,571	0,030
0,226	0,610	0,570	0,040
0,265	0,614	0,568	0,046
0,293	0,616	0,564	0,052
0,337	0,628	0,564	0,064
0,341	0,631	0,563	0,068
0,343	0,633	0,562	0,071
0,346	0,634	0,562	0,072
0,349	0,634	0,562	0,072
0,348	0,631	0,562	0,069
0,346	0,630	0,562	0,068
0,342	0,626	0,562	0,064
0,338	0,621	0,562	0,059

Muestra Nº IV

L_2	L_3	L_4	L_3-L_4
0,228	0,413	0,342	0,071
0,292	0,433	0,340	0,093
0,320	0,437	0,340	0,097
0,345	0,445	0,338	0,107
0,350	0,446	0,337	0,109
0,346	0,442	0,334	0,108
0,342	0,440	0,335	0,105
0,336	0,432	0,337	0,095
0,335	0,430	0,336	0,094
0,333	0,429	0,332	0,087

Máximo de standard: 0,350

Máximo de muestra: 0,109

0,335	0,615	0,562	0,053
-------	-------	-------	-------

Máximo de standard: 0,349

Máximo de muestra: 0,072

d) Resultados obtenidos y comentarios

Muestra N ^o	Alga	Wogr./gr. tal cual	sobre muestra: anhídria
I	<i>Macrocyctys pyrifera</i>	42,5	51,9
II	<i>Lessonia flavicans</i>	7,7	8,6
III	<i>Lessonia fassia</i>	13,8	15,3
IV	<i>Iridea laminaroides</i>	16,6	18,8
V	<i>Iridea cordata</i>	11,6	12,5

Se ha determinado vitamina PP, como ácido nicotínico, por el método colorimétrico de Mueller y Fox.

Las muestras se extrajeron previa hidrólisis ácida y enzimática, con las mismas características que ya han sido descritas en este mismo ítem para vitamina B₁ y otras.

La vitamina se extrajo de los hidrolizados por adsorción en reactivo de Lloyd, y elución alcalina.

Se eliminaron del eluido las proteínas, por precipitación con nitrato de plomo.

Se corrió un standard interno que introdujo un factor de corrección f= 1,066, que corresponde a un rendimiento de la operación de 93,8 %; con respecto a otros rendimientos obtenidos en casos anteriores, esta cifra podría indicar la ventaja de la adsorción en columna sobre la adsorción por agitación.

Los resultados obtenidos están dentro de lo expectable, si se tienen en cuenta otros valores citados por la bibliografía de otros autores sobre el mismo tema.

e) Bibliografía

- 1) Carter C. W. y O'Brien J. R.- Biochem.J. 33, 1810 (1939).
- 2) Elvehjem O. A. y coautores- J. Am. Chem. Soc 59, 1767 (1937).
- 3) Elvehjem O. A. y coautores- J. Biol. Chem. 123, 137 (1938).
- 4) Anigh B. O.- Biochem.J. 31, 731 (1937).
- 5) Hfiencke H.- Ber. 60,1451 (1927).
- 6) Vilter R. W.y Spies T. D.- Lancet II, 423 (1939).
- 7) Woolley D. W.,Elvehjem O.A. y otros- J. Biol. Chem 124, 715 (1938).
- 8) Walker A. A., Spies T. D. y Woods A. M.- J. Med. Assoc. 113, 1481 (1939).
- 9) Karrer P. y Keller H.- Helv. Chim. Acta 22, 1292 (1939).
- 10) Vilter S. P., Spies T. D. y Mathews A. P.- J. Biol. Chem. 152, 85 (1938).
- 11) Daroga R. P. - J. Soc. Chem. Ind. 60, 263 (1941)
- 12) Teeri A. E. y Shimer S. R.- J. Biol. Chem. 153, 307 (1944).
- 13) Bandier E. y Hald J.- Biochem. J. 33, 264 (1939).
- 14) Martineck R. G.,Kirch R.H. y Webster G. L.- J. Biol. Chem. 139, 675 (1941).
- 15) Swaminathan M.- Ind. J. Med. Res. 29, 325 (1941).
- 15a) Dennis P. O. y Rees H. G.- Analyst 74, 461 (1949).
- 15b) Klatskin O., Morris F. W. y Wokes F.- Analyst 74, 447 (1949).
- 16) Swaminathan.M.- Nature 141, 83C (1938).
- 17) Melnick D. y Field H.- J. Biol. Chem. 134, 1 (1940).
- 18) Melnick D.- Cereal Chem. 19, 553 (1942).
- 19) Melnick D., Oser B. L. y Siegel L.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 13, 879 (1941).
- 20) Lamb F. W.- Ind. Eng. Chem., Anal.Ed., 15, 352 (1943).
- 21) Waisman H. A. y Elvehjem O. A.- Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 13, 221 (1941).
- 22) Arnold A., Schreffler O. B. y Lipsius S. T. - Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 13, 62 (1941).
- 23) Jones W. S.- J. Am. Pharm. Ass., Sc. Ed., 30, 272 (1941).
- 24) Hale E. B., Davis G. R. y Baldwin H. R.- J. Biol. Chem. 164, 553 (1942).
- 25) James F. M., Norris F. W y Wokes F.- Analyst 72, 327 (1947).

- 26) Mueller A. y Fox H. S.- J. Biol. Chem. 167, 291 (1947).
 - 27) Mueller A. y Fox H. S.- J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 40, 513 (1951).
 - 28) Perlzweig W. A., Levy E. D. y Sarett H. P.- J. Biol. Chem. 136, 729 (1940).
 - 29) Friedman T. E. y Frazier E. I.- Lab. off Abbott Fund., circular Nº 13, Abril de 1945.
 - 30) Denn W. J. y Handler P.- J. Biol. Chem. 140, 201 (1941).
 - 31) Swaminathan M.- Indian J. Med. Res. 30, 397 (1942).
 - 32) Swaminathan M.- Ann. Biochem. Exptl. Med. 6, 69 (1946).
 - 33) Bandier E.- Biochem. J. 33, 1130, (1939).
- ~~~~~

III CUADRO DE RESULTADOS Y COMPARACION CON OTROS VALORES ALIMENTICIOS (VEGETALES).

	PROV. A	Vit. A	Vit. B ₁	Vit. B ₂	Vit. B ₆	Vit. C	Vit. D	Vit. PP
Unidad de gra- mo sublimado	Moqr. p caroteno	U.I.	Moqr. clorido	idem	idem	Moqr. Ascorb.	U.I.	idem
1) Macroalgas								
Pyralina I	3,0	93,9	0,68	13,5	17,6	132		51,9
Lessera		99,5				200	680	
Flavina II	1,0	53,6	0,41	4,8	9,9	175		8,6
Lessera		50,4				127	937	
Fusca III	9,3	52,8	0,01	7,6	11,9	192		15,3
Lessera		59,7				116	690	
Irises		32,6				130		
Lessera IV	0,4	25,1	1,46	18,7	1,8	428	672	18,8
Irises		28,7				242		
Lessera V	1,0	28,9	0,36	17,9	8,1	239	623	12,5
2) Macroalgas secas	6,85		2,65	8,55		25,0		69,4
Lessera	2,18		0,25	4,16		60,0		83,6
Macroalgas triplicas	3,41		0,50	2,77		133,0		50,3
3) Algas								
Alga	52,3	130	0,50	4,88			1,2-0,5	17,97
Alga seca	42,7	84	2,97	11,78			0,02	38,54
Alga	0,1	0,17	15,756	1,28				14,4
Alga		0,22	6,50	1,00	5,0			50
Alga	16,0	18,0	4,5			460		60
4) Algas								
Algas		0	3,6	0,6	1,2			50
Algas	26,0	13,0	6,2	2,0	1000			100
Algas		0	7,5	2,6		20		20
Zamorras	1020	5,0	50,0	15,0	800			40
Remojados	140	2,1	27,0		4700			200
Alga		0	8,0	6,3		1100		60
Lessera		109	8,0	15,0		1500		40
Spinaca		1100	3,5	27,0	11,0	8000		80
Marula		24	8,0	0,4	0,4	4000		20
Marula		6	2,5	2,0	2,0	300		10
Uva		5	3,3	2,2		200		10
Tomate		190	10,0	7,0	12,0	4000		80

1) Algas analizadas.- 2) Otras algas.- 3) Remojados.- 4) Otros vegetales.

Quando figuran dos datos en un mismo casillero, corresponden a dos métodos en el orden en que se hizo la determinación.

Bibliografía: "Vademecum del Veterinario"-P. Garrido-Ed. Teconos-1954

"Vademecum de Veterinaria"-H. E. Brion-Ed. Gea-1955

"Handbook of Food and Agriculture"-Ed. F. Blanck-1955

"Vitamin Value of Foods"-L. Boothby, E. Hertzler y E. Newman
J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 38, 196 (1949)

NOTA: muchos de los valores han sido transformados a las unidades indicadas.

IV CONCLUSIONES Y DISCUSION

Se ha determinado, por métodos químicos y/o físicos, el contenido de provitaminas A y vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, D y E de cinco especies de algas del litoral atlántico argentino: *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia flavicans*, *Lessonia fasciata* - pardas- e *Iridaea laminarioides* e *Iridaea cordata*- rojas- numeradas respectivamente I, II, III, IV y V.

Las muestras corresponden a cosechas del período Marzo-Abril y han sido secadas por exposición al aire, a la sombra, en el lugar de recolección.

En la Introducción (parte I) se ha dado una idea general de los conceptos elementales para la comprensión del trabajo y de las razones que lo motivaron, y una somera relación de los antecedentes sobre el tema.

En la parte II- Determinación- se ha hecho, para cada vitamina, un breve resumen de las propiedades biológicas, físicas y químicas, del panorama analítico general y de los métodos utilizados; estos últimos han sido tratados con mayor detenimiento y se acompañan además de una descripción detallada de la técnica, cálculos y resultados.

Los métodos usados son los consagrados por la práctica analítica corriente, excepción hecha de la determinación de vitamina D, sobre la cual aún no existe un criterio definido.

Se ha determinado vitamina A por colorimetría (Carr-Price) y espectrofotométricamente.- Los resultados obtenidos ofrecen una excelente concordancia entre ambos métodos.- Se pone en evidencia la eficacia de la técnica de irradiación destructiva de Demarest en el espectrofotométrico y la interferencia despreciable de los carotenos en el colorimétrico.

Se ha determinado colorimétricamente provitaminas A.- Los valores obtenidos difieren de la inferencia que proporciona la lectura residual de cloruro de antimonio para vitamina A.- Cabe destacar que la sensibilidad de este método es menor y que la especificidad del aquí utilizado también.

Se ha determinado vitamina B₁ por transformación en tiocromo y fluorimetría, previa cromatografía en Decalco.

Se ha determinado el contenido en vitamina B₂ fluorimétricamente, previa adsorción y elución de Florisil.

Se ha determinado vitamina B₆ por el método de Scudl, previa eliminación de interferencias.

Se ha determinado vitamina C por colorimetría, según dos métodos: re-