

La Crónica Médica

APARTADO POSTAL 2563

LIMA - PERU



COMITE DE REDACCION

CARLOS A. BAMBAREN
Director

REDACTORES

EDMUNDO ESCOMEL

LUIS D. ESPEJO — RAFAEL M. ALZAMORA — JOSE MARROQUIN

ERNESTO EGO-AGUIRRE — JORGE AVENDAÑO HUBNER

LUIS QUIROGA QUINONES — HUMBERTO PORTILLO

JOSE B. JIMENEZ CAMACHO

GUILLERMO KUON CABELLO

Año 72.- Núm. 1109

Noviembre 1955

SUMARIO

NUMERO MONOGRAFICO

Acción del alfa-tocoferol sobre la ascorbinemia del conejo, por la Srta. María Angélica Maldonado Veliz.

Introducción, pág.	209
Acción de las vitaminas sobre el ácido ascórbico del organismo animal, pág.	210
Acción de los tocoferoles sobre la ascorbinemia, pág.	214
Investigaciones efectuadas, pág.	216
Discusión e interpretación de los resultados, pág.	220
Conclusiones, pág.	221

Bibliografía.— Pharmacopoea Internationalis.— Vol.

1.— pág.	224
---------------	-----

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América



Con el **LEDERMON Lederle** el médico cuenta con un recurso altamente eficaz para detener el progreso de las anemias comunes, débense a la deficiencia de hierro o sean de tipo megaloblástico.

El **LEDERMON** viene en cápsulas y líquido para adultos, y el **LEDERMON Fórmula Infantil** es la dosis terapéutica para niños.

Ledermon* LEDERLE

hierro-B₁₂-C-ácido fólico-
estómago-fracción de hígado



... apoyo del médico

*Marca registrada

Lederle Laboratories Division, Cyanamid INTER-AMERICAN Corporation, 49 West 49th St., New York 20, N. Y.

DISTRIBUIDORES EN EL PERU:

LA QUIMICA SUIZA S. A. — Avda. Uruguay 172
G. BERCKEMEYER y Cia. — Avda. Argentina 232

Cátedra de Farmacología de la Facultad de Farmacia de Lima
Catedrático Dr. Carlos A. Bambarén

Acción del alfa-tocoferol sobre la ascorbinemia del conejo



Por la Srta. **MARIA ANGELICA MALDONADO VELIZ**

La acción coincidente de varias vitaminas en los procesos nutritivos, es comprobación fisiológica que cada día adquiere mayor relevancia en el campo de la bioquímica, dando sustentáculo a interpretaciones farmacodinámicas. La mayor parte de las vitaminas actúan en sinergia, de la cual se descubren paulatinamente complejas manifestaciones. De ahí que muchos síndromes avitaminósicos, acompañados por deficiencias nutricionales, sean a veces trasunto de una perturbación de la sinergia bioquímica entre distintos factores carenciales.

El resultado del desequilibrio bioquímico se sobrepone a la carencia vitamínica, propiamente dicha, dependiente de una aportación alimenticia deficiente en varias vitaminas.

Las manifestaciones de esa disinerergia de la actividad vitamínica, se comprueba en tejidos y órganos y en muchos procesos morbosos metabólicos. Por otra parte, la falta de vitaminas produce verdaderos procesos patológicos, capaces de res-taurarse únicamente por la administración oportuna de medicamentos de ese origen.

Este trabajo, que trata de la influencia de los tocoferoles sobre la ascorbinemia del conejo, con el fin de llevarlo a cabo en forma ordenada y metódica, consta de las siguientes partes: En la primera, hago un pequeño esbozo de las variaciones del contenido de vitamina C en el organismo, por influjo de otras vitaminas; en la segunda, trato de los cambios ascorbinémicos por la exclusiva acción de los tocoferoles; en la tercera parte expongo las investigaciones llevadas a cabo en conejos, machos y hembras, empleando diversas dosis de tocoferoles; en la cuarta parte comento los resultados obtenidos e interpreto las investigaciones realizadas; por último, formulo las conclusiones e indico la bibliografía consultada.

Este trabajo terminó de redactarse en setiembre de 1952.

Hago constar que el tema lo sugirió el Catedrático de Farmacología y Posología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Lima, Dr. Carlos A. Bambarén, a quien expreso mi más profundo agradecimiento, por su invaluable ayuda en la búsqueda bibliográfica, que ya es tarea bastante ardua, y por las facilidades que, con su amabilidad tan característica, ofrece a sus alumnos, salvando las dificultades que se presentan en toda investigación. También agradezco al Dr. Fernando Montesinos por los consejos muy útiles que me proporcionó para la parte práctica; igualmente a la Q. F. Victoria Vargas, del Laboratorio de Bioquímica Especial y Bromatología Aplicada, que me ayudó en la cuantificación fotocolorimétrica de la ascorbinemia.

ACCION DE LAS VITAMINAS SOBRE EL ACIDO ASCORBICO DEL ORGANISMO ANIMAL

Los experimentos llevados a cabo por Urbach, Hickman y Harris (28) sobre la correlación de varias vitaminas en el plasma sanguíneo, son particularmente interesantes. Después de determinar durante varias semanas seguidas la concentración normal de las vitaminas A, E y C en el plasma hemático de niños y adultos, administraron a éstos grandes cantidades de una u otra de estas vitaminas, con resultados sorprendentes. Así, por ejemplo, la vitamina C disminuyó de 10 a 20% a partir del día siguiente de administrar vitamina A (51,800 Unidades). Es de especial interés en el caso de la vitamina A, el antagonismo con otras vitaminas liposolubles, especialmente con la vitamina D y con algunas hidrosolubles, como el Acido Ascórbico. Este antagonismo se comprueba cuando se dan en exceso ambas vitaminas al mismo tiempo, ya que no se desarrolló hipervitaminosis A.

En ratas que se alimentan con dietas sin vitamina A, el Acido Ascórbico del corazón y probablemente de los riñones y del timo, está muy disminuido.

Los trabajos llevados a cabo por B. Sure, R. M. Theis y R. T. Harrelson (35) demostraron que cuando hay deficiencia de vitamina A, la disminución de ácido ascórbico en los pulmones es insignificante, pero en el hígado y riñones alcanza a 19 y 23%, respectivamente.

Con deficiencia de vitamina A el Acido Ascórbico disminuye en la siguiente forma:

Corazón	—	20. %
Riñones	—	27.3%
Timo	—	24.1%

En otros experimentos, obtuvieron las siguientes disminuciones:

Riñones	— 26. %
Timo	— 19.2 %
Hígado	— 45. %
Suprarrenales	— 12.4 %
Hipófisis	— 25.8 %
Tiroides	— 15.3 %

Continuando sus investigaciones sobre la influencia de la avitaminosis en el mecanismo de óxido-reducción del organismo animal, B. Sure, R. M. Theis y R. T. Harrelson (35), estudiaron durante 3 años el contenido de Acido Ascórbico de varios tejidos y glándulas endocrinas, en muchas enfermedades por deficiencia vitamínica. Así, por ejemplo, en las ratas que sintetizan Acido Ascórbico, hallaron gran disminución de esa vitamina en ciertos tejidos y glándulas endocrinas, cuando hay deficiencia de Tiamina y Riboflavina, demostrándose una definida correlación vitamínica.

Cuando hay deficiencia de Tiamina, la disminución más pronunciada de Acido Ascórbico se produce en los pulmones. Los resultados que obtuvieron son los siguientes:

Pulmón	— 35 %
Riñón	— 23 %
Hígado	— 19 %

Si la deficiencia vitamínica se prolonga, la disminución de vitamina C puede llegar a:

Riñón	— 75 %
Hígado	— 44.4 %
Timo	— 27.8 %

Tratando de descubrir si el ayuno influye sobre el contenido de Acido ascórbico de los tejidos y glándulas endocrinas, sometieron a ayuno a un animal durante 4 días, a otro 7 días, a dos 10 días y a uno 11 días; llegando a la conclusión que no hay ningún cambio en la concentración de vitamina C en los tejidos o glándulas endocrinas.

La disminución de Acido ascórbico en los tejidos es mayor en la deficiencia de Riboflavina. Las siguientes cifras de disminución de vitamina C se produjeron con deficiencia de Riboflavina:

Hígado	— 44.4 %
Riñón	— 45.4 %
Pulmón	— 41.2 %
Timo	— 35.7 %
Tiroides	— 20.7 %

No se comprobaron modificaciones en las suprarrenales e hipófisis.

Esta gran disminución de Acido Ascórbico en el Timo, cuando se coloca al animal en deficiencia riboflavínica, comparadas con las halladas en avitaminosis tiamínica, son importantes.

La sintomatología escorbútica se atenúa y la supervivencia se prolonga, si a cuyes alimentados con dieta carente de vitamina C se les suministra al mismo tiempo Riboflavina; esto se prueba cuando la dosis de ésta es de 0.6 a 1 mg.

Minich, Wright y Moore, han observado que la ascorbinemia disminuye en la arriboflavinosis. Hopkins (16) in vitro encontró en ausencia de metales y con pH 7.4 que la Riboflavina aumenta la sensibilidad de la oxidación fotocatalítica del Acido Ascórbico. Morgano y Sannazari (22) han comprobado recientemente, en cuyes con dieta completa, que el suministro de un exceso de Riboflavina aumenta en forma apreciable el contenido de vitamina C de las suprarrenales, gonadas y cerebro, mientras que disminuye en el hígado.

F. de Felice (7) realizó una serie de experimentos con el fin de estudiar las variaciones de los ácidos leve y dehidro-ascórbico de algunos órganos; por ejemplo, eje cerebro-espinal, hígado, riñones, intestino, útero con sus anexos, testículo y suprarrenales de cuyes pequeños (de los dos sexos) y de peso inicial más o menos de 250 gr. con dieta carente de vitamina C, pero que recibían simultáneamente por vía oral una dosis cotidiana de 0.61 mg. de Riboflavina. Esos animales se mataron en lotes de 2 o 3 sucesivamente después de 10, 15, 20, 25, 30, y 35 días de avitaminosis. Otros cuyes alimentados con sólo dieta escorbutígena, fueron muertos ya en avitaminosis y sirvieron de control.

Las comprobaciones demostraron que cuando integra la dieta escorbutígena una dosis de 0.61 a 1 mg. por día de Riboflavina, se retarda apreciablemente la disminución de vitamina C, especialmente en el hígado, riñones, intestino y de manera particular en el sistema nervioso, modificándose en estos órganos la relación entre la forma oxidada y la reducida de la vitamina C. La acción de la Riboflavina se explica aceptando que actúa como co-enzima, infiriéndose que en tales casos en que disminuye el Acido Ascórbico hay consumo exagerado de esa vitamina por sustitución de su acción genérica óxido-reductora, o bien que los mecanismos autorreguladores de la producción de vitamina C experimentan en los tejidos en que se inicia el proceso de su formación, una depresión o disminución como consecuencia de la falta de Riboflavina.

Es difícil aplicar a la especie humana los resultados de los experimentos en ratas, puesto que el organismo humano no dispone de iguales mecanismos autorreguladores de producción de Acido Ascórbico, que procede en su totalidad de los alimentos

ingeridos, pero no puede excluirse, tampoco, a priori la influencia de la Riboflavina sobre la vitamina C disponible.

En el escorbuto se observa con frecuencia trastornos cardíacos por focos hemorrágicos en el pericardio, a consecuencia de la discrasia sanguínea por carencia de Acido Ascórbico; pero en mucho casos se debe en realidad, como demostraron desde 1937 Weiss y Wilkins (37), a la coexistencia de un carencia de Tiamina, que desde luego acentúa ciertos síntomas de los producidos por falta de vitamina C.

La Piridoxina no influye grandemente en el contenido de Acido Ascórbico de los tejidos y glándulas endocrinas.

In vitro únicamente se comprobó que la vitamina B12 es incompatible con la vitamina C (36).

Las comidas con caroteno, según Besséy y Lowry (15), incrementan el Acido Ascórbico en el plasma sanguíneo. Dichos investigadores examinando los alumnos de las escuelas públicas de la ciudad de New York, encontraron que había correlación entre caroteno en el plasma y vitamina C.

W. J. Linghorne (19) ha relatado los detalles del experimento de la Real Fuerza Aérea Canadiense, cuyo personal fué sometido a influencia de la vitamina C. Dividieron en 4 grupos a los sujetos del experimento: Al primer grupo se le dió una alimentación basal cuyo análisis demostró que proporcionaba 8 mg. diarios de Acido Ascórbico; el segundo grupo recibió la misma dieta más un suplemento de col cruda que daba 15 mg. diarios de Acido Ascórbico, ingiriendo en total 23 mg. El tercer grupo recibió la misma dieta, con la adición de 70 mg. de Acido Ascórbico por día; en tanto que el cuarto grupo recibió la dieta habitual con 78 mg. de Acido Ascórbico al día. Después de determinar la cantidad de vitamina C en los leucocitos, los autores concluyen:

a).— Con la ingestión de 8 a 23 mg. diarios de Acido Ascórbico la cantidad de vitamina C de los glóbulos blancos, sólo se mantiene a la mitad de la alcanzada cuando se toma 78 mg. por día.

b).— Con 8 a 23 mg. diarios de vitamina C hay un déficit tisular, que llegó a casi 2 mgr. en relación con la máxima concentración.

c).— Cuando los glóbulos blancos tienen la mitad de la cifra normal de vitamina C, el Acido Ascórbico sérico está ausente o sólo ha alcanzado 0.1 a 0.4 mg. %.

d).— La cantidad de vitamina C en los glóbulos blancos, parece que es índice de la cantidad total de Acido Ascórbico en el organismo.

e).— Cuando se suministra una cantidad suficientemente grande de vitamina C, las cifras de tal vitamina en los glóbulos blancos y en el suero, llegan a lo normal en 24 hs. porque el organismo retiene muy grandes cantidades de Acido Ascórbico.

ACCION DE LOS TOCOFEROLES SOBRE LA ASCORBINEMIA

En 1930, Matill y Crawford (26), demostraron que la propiedad protectora de las oxidaciones que posee el aceite de germen de trigo, se debía a la presencia de ciertas sustancias grasas con "grupos oxidrilos".

A estas sustancias antioxidantes les dieron Matill y Olcott (21), así como otros autores, el nombre genérico de inhibitoles.

Desde los trabajos de Evans y Burr (11), en 1927, se ha comprobado que las sustancias antioxidantes no son saponificables y que por lo tanto las contenidas en el aceite de germen de trigo, como en otras grasas animales o vegetales, no pertenecen al grupo de los esteroides, ni al de los pigmentos carotenoides, ni a la vitamina A.

Por otro lado, Olcott y Matill (21), en 1934, así como Olcott y Emerson (26), en 1937, demostraron que las sustancias antioxidantes que existen en el aceite de germen de trigo, tenían la actividad biológica de la vitamina E.

Olcott y Emerson, en 1937, por procedimiento sencillo de regeneración a partir de los alofenatos, obtienen los alcoholes denominados tocoferoles, demostrando que hay tres que poseen en mayor o menor grado la actividad vitamínica E.

Las denominaron alfa, beta y gamma tocoferol; las tres actúan como antioxidantes, pero el alfa-tocoferol, según Olcott y Emerson, sería el más antioxidante.

En el año 1938, por primera vez, Karrer sintetizó alfa-tocoferol, de modo que se tuvieron tocoferoles sintéticos, con iguales propiedades fisiológicas a la vitamina E, antes que fuera conocida su constitución química.

Los resultados de las investigaciones de Evans, de una parte, y Karrer, de otra, demostraron que los ésteres de los tocoferoles son siempre más activos que los tocoferoles puros.

Hickman, Woosida, Kaley y Harris (13) han comprobado que los tocoferoles aumentan la concentración de vitamina A. Esta actividad es tal vez una propiedad que se extiende, en general, más allá de la vitamina A, razón por la cual se le denominó actividad "covitamínica E".

Davies y Moore (6), en la descripción de la sinergia de las vitaminas A-E en el hígado, concluyen que el incremento de la acumulación se debe a la supresión o disminución de oxidación por el tocoferol, el cual se comporta como antioxidante.

Las verdaderas sustancias antioxidantes inhiben la oxidación sin estar necesariamente relacionadas con las reservas de oxígeno del medio. En esta clase estarían situados los tocoferoles.

Los trabajos de preservación de la grasa y de las vitaminas a 37° en el cuerpo animal cargado con oxígeno y enzimas oxidativas, son muy difíciles.

La acción de los tocoferoles se debe, principalmente, a la disminución de la oxidación en el tracto intestinal.

El caroteno y otras sustancias oxidables se recuperan de las heces en cantidades proporcionalmente mayores, después de comidas simultáneas con tocoferoles.

La magnitud del incremento de recuperación hallada en esos experimentos, es cerca de 2 a 1, de la misma manera que mejora la utilización del caroteno en la rata, cuando come cantidades equivalentes de tocoferoles.

La vitamina E, debido a su actividad antioxidante, protege la vitamina A y el caroteno contra la oxidación, tanto en el tracto intestinal como en las células y como estas sustancias son particularmente sensibles a la oxidación, se puede aceptar, que su protección se logra con un antioxidante como la vitamina E. (24).

La vitamina E hace posible que los organismos animales subsistan con cantidades inferiores de vitamina A, logrando reservas de dicha vitamina con ingestión que, de otra manera, sería insuficiente para lograrlo. La existencia de un aumento en el consumo de oxígeno y de actividad de la succinoxidasa en el músculo deficiente de vitamina E, permite afirmar que es específica en los procesos de respiración tisular. Moderando el grado de destrucción oxidativa de importantes metabolitos (25), no sólo economiza sino potencializa a la vitamina A y los carotenos.

Esta propiedad antioxidante de la vitamina E, permite explicar que impida el enranciamiento de las grasas (2).

La misión de la vitamina E de proteger en el metabolismo celular a las sustancias fácilmente oxidables, contra posibles alteraciones, se extiende al metabolismo de los hidratos de carbono de los músculos y tejidos y a la vitamina C (12).

G. Cimino y A. Bernardini (3), del Instituto de Patología General de la Universidad de Catania, indagaron el comportamiento del Acido Ascórbico tisular, en animales tratados con Alfa-tocoferol. Emplearon con este fin dos especies distintas de animales, cuyos que no sintetizan Acido Ascórbico y ratas que, por el contrario, sintetizan. En todos los animales se determinó Acido Ascórbico en los siguientes órganos: hígado, riñones, suprarrenales y bazo. El método empleado fué el del azul de metileno de Martini y Bonsignore, con las modificaciones introducidas por Chalopin y Mudry (4), Wharren (38) y Zimerman (39).

Los experimentos llevados a cabo sobre el cuy se realizaron así: seleccionaron 40 animales de peso comprendido entre 300 a 400 gr., los alimentos con comida común de laboratorio y hojas de col que contienen abundante vitamina C.

A la semana de tal alimentación a un lote de 20 cuyes se les suministró diariamente 10 mg. de Alfa-tocoferol (Ephinal Roche) por vía oral, mientras un segundo lote de 20 animales servía de control.

Después de tres días, un tercio del total de los animales fué muerto al mismo tiempo que un número igual de los de control y se procedió a la determinación del Acido Ascórbico tisular. Al resto de los animales, tanto a los del experimento, como a los de control, se le suspendió el suministro de la dieta anterior, dándoles dieta escorbutígena de Randoni y Lomba (33). Días más tarde se mataron estos animales y se determinó el Acido Ascórbico, encontrándose que había aumentado 80% en las cápsulas suprarrenales, 57% en el bazo y 45% en el hígado.

En experimentos con ratas albinas de 65 gr. de peso, 12 fueron sometidas a la acción del tocoferol, recibiendo diariamente 5 mg. durante 30 días de Alfa-tocoferol (Evió) por vía oral y 6 por vía parenteral, (endoperitoneal).

Este lote fué alimentado con una dieta compuesta de:

Caseína amido	— 68%.
Aceite de pepita de algodón hidrogenado (manteca)	— 9%.
Mezcla salina de Osborne y Mendel	— 4%.
Aceite de hígado de bacalao	— 1%.

Antes de suministrar la mezcla alimenticia, con excepción del aceite de hígado de bacalao, se sometió a 120° por 4 hs. para eliminar de este modo cualquier traza de Acido Ascórbico. Esta dieta fué integrada oportunamente con un factor del complejo B.

El resto de las ratas que sirvieron de control no recibieron tocoferol y fueron alimentadas con la misma dieta.

Los resultados obtenidos después de determinar vitamina C en los diferentes órganos, permite afirmar que las ratas que recibieron alfa-tocoferol, incrementaron el Acido Ascórbico en las suprarrenales; tal acción es más notoria si la vitamina E, se dá por vía oral (91% de incremento); por vía parenteral, solo hay incremento de 31%.

INVESTIGACIONES EFECTUADAS

Se siguió para la cuantificación de ácido ascórbico el método dado por la Asociación Norteamericana de Químicos Vitaminólogos (23), y que está basado en los de L. P. Pepkowitz (27), W. B. Robinson y E. Stotz (31).

El método se basa en la decoloración del 2-6 diclorofenol-indofenol por el Acido Ascórbico. En ausencia de sustancias que interfieran, la cantidad de Acido Ascórbico presente en la muestra será proporcional a la cantidad de reactivo decolorado.

Reactivos.— Todos los reactivos deben ser Q. P. He utilizado los de la casa Merck de Alemania.

1.— Solución Buffer pH. 4.— Disolver 30 gr. de acetato de sodio anhidro con 70 cc. de agua bidestilada y 100 c.c. de ácido acético glacial.

2.— Solución de 2.6 diclorofenol-indofenol.— Disolver 6.26 mg. de la sal sódica del diclorofenol-indofenol en agua bidestilada caliente. Esta solución se conserva en frasco oscuro y en la refrigeradora en perfectas condiciones por espacio de 5 a 6 días.

3.— Solución de ácido metafosfórico al 6%.— Esta solución debe guardarse en frasco oscuro y en la refrigeradora, conservándose de este modo por espacio de 6 a 8 días.

En la preparación de estos reactivos he usado agua bidestilada recientemente.

4.— Xileno.— La calidad del reactivo Merck es satisfactoria.

Es importante que el xileno esté libre de materiales oxidantes.

La prueba para reconocer dichas sustancias, consiste en decolorar, una pequeña cantidad de solución coloreada con Acido Ascórbico y adicionar 5 cc. de xileno y agitar. Si después de 10 minutos de reposo, no aparece ningún color en el xileno, quiere decir que está apropiado para el uso; si aparece coloreado el xileno debe ser destilado.

Todos los reactivos, a excepción del xileno, han sido renovados cada tres días, a fin de contar con soluciones frescas.

5.— Standard de Acido Ascórbico.

Preparación de la solución Stock.— Se pesó 100 mg. de Acido Ascórbico (standard de la Farmacopea de los Estados Unidos), que se disolvió en ácido metafosfórico al 6% y luego se completó a 100 cc.

Entonces, 1 cc. contendrá 1 mg. de vitamina C.

Standard de trabajo.— De la solución anterior se miden 10 cc. que se llevan a 100 c.c. con ácido metafosfórico al 6%.

Por tanto, 1 c.c. contendrá 0.10 mg. de vitaminas C.

Determinación de la constante K.— Se preparan 8 fiolitas bien limpias y secas de 10 c.c. y después de numerarlas se miden en la N° 1 0.4 c.c. del standard de trabajo; en la N° 2, 0.6 c.c.; en la N° 3, 0.8 c.c.; y así sucesivamente hasta 1 c.c., 2 c.c. y 3 c.c. en la fiola N° 8. Se enrasan todas a 10 c.c. con ácido metafosfórico al 6%.

De cada dilución se toman 5 c.c. que se trasvasan a los tubos de prueba previamente numerados. Enseguida, se agrega a cada tubo 5 c.c. del buffer, 2 c.c. del colorante y se agita suavemente, luego se adicionan 10 c.c. de xileno, se tapan los tubos y se agitan vigorosamente durante 6 a 10 segundos. Se dejan reposar, decantando después las porciones xilénicas que así quedarán listas para llevarlas al fotocolorímetro.

Blanco.— Se preparó midiendo en un tubo de prueba 5 c.c. de ácido metafosfórico al 6% 5 c.c. del buffer, 2 c.c. del colorante; agitando suavemente se adiciona al final 10 c.c. de xileno, se tapa el tubo y se agita vigorosamente durante 6 a 10 segundos.

Tanto los standard como el blanco se prepararon al mismo tiempo, efectuándose la lectura de cada uno de ellos, respectivamente, en el fotocolorímetro de Klett-Summerson, usando el filtro 500 mu. y ajustando el aparato a 0 de densidad con xileno puro.

La apreciación de los standard y del blanco recibieron diversas denominaciones; así, para los primeros tenemos Os igual a densidad óptica de cada dilución, Ot igual a densidad óptica del colorante total, luego el valor K (constante del aparato) se determinó según la siguiente fórmula:

$$K = \frac{\text{Mg. de Acido Ascórbico por tubo}}{\text{Ot} - \text{Os}}$$

Teniendo en cuenta el número de standard se obtuvo un promedio de los valores K individuales.

El valor de K promedio hallado en la determinación de la constante fué 0.055. Teniendo el valor de K se procede a la determinación del problema.

Determinación de vitamina C en plasma.— Se recibió la sangre en tubos de centrifuga que contenían oxalato de potasio al 20%, procurando evitar la hemólisis que provoca disminución de vitamina C en el plasma (Kellie y Zilva, Bersook y Colaboradores, Buttler, Cushman y Bessey).

Enseguida, se procedió a centrifugar durante 15 minutos a 20,000 revoluciones por minuto. Después, con toda precaución, se mide del plasma que sobrenada 2 c.c., adicionando a ellos 2 c.c. de ácido metafosfórico al 6%. De esta mezcla bien agitada se mide 1 c.c. y completó a 10 c.c. con la solución de ácido metafosfórico. Habiendo agitado completamente los líquidos anteriores se filtra a través de papel Whatman N° 12.

De este filtrado se miden 5 c.c. en tubo de prueba grande, a esto se adiciona 5 c.c. del "buffer", 2 c.c. del colorante, se agita suavemente y se agregan 10 c.c. de xileno, tapando el tubo con un corcho se agita vigorosamente durante 6 a 10 segundos para extraer el exceso de colorante.

Se deja reposar para luego verificar la decantación del xileno y proceder a la lectura.

La fórmula para realizar los cálculos es la siguiente:

mgrs. de Acido Ascórbico por 100 c.c. de plasma.

(Ot - Ou) x K

= $\frac{\quad}{\quad}$ x 100

c.c. de plasma usado.

Ot - densidad óptica a 500 mu. para el colorante total.

Ou - densidad óptica a 500 mu. para la muestra problema.

K - constante del aparato.

Ejemplo:

Lectura de Ot 240. Densidad 0.48

Lectura de Ou 220. Densidad 0.44.

$$\text{Mg. \% de vitamina C} = \frac{(0.48 - 0.44) \times 0.055}{0.25} = 0.88 \text{ mg. \%}$$

Precauciones.— El buffer y el xileno deben adicionarse en forma rápida y seguida, porque el Acido Ascórbico es inestable después de la adición del buffer, y un contacto excesivamente largo con el colorante permitiría que las reacciones de las pequeñas sustancias reductoras se conviertan en apreciables.

Algunas veces al agitar, se produce una emulsión entre el xileno y las proteínas, para romper dicha emulsión se puede usar sulfato de sodio anhidro o una pequeña cantidad de filtro super-cell.

Para la separación de la capa xilénica también puede usarse una pipeta, pero tanto en este método como en el de simple decantación, debe cuidarse que no se unan la capa acuosa con el xilol. Si esto ocurriese se centrifuga consiguiéndose una rápida separación.

Observaciones.— El tiempo que transcurre entre el final de la última agitación y la lectura debe ser siempre más o menos constante.

Si no se tiene papel Whatam N° 12 para verificar la filtración, puede usarse el N° 40, como se hizo, comprobándose que da buen resultado. Nunca se usa papel de filtro corriente, ya que siempre pasa el plasma desproteinizado, con aspecto opalescente.

La última agitación o sea después de haber agregado xileno, debe verificarse con el tubo de prueba colocado en posición ligeramente oblicua, empezando lentamente y después ya en forma vigorosa; si no se toman estas precauciones, se produce una emulsión inconveniente.

Los tubos de fotocolorímetro en los que se echa xileno, deben estar bien secos, aún cuando se use éter con tal fin, debe esperarse que se haya volatilizado totalmente.

Todo el material con que se trabaja, debe estar bien limpio, enjuagado con agua bidestilada y seco.



DISCUSION E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La concentración plasmática de las vitaminas, es menor que la concentración en los tejidos; siendo sus variaciones mucho más ostensibles que las de otros componentes de la sangre, según Krebs (18).

El influjo de los tocoferoles sobre la cantidad de Vitamina C en tejidos, órganos y sangre, es asunto estudiado por varios investigadores, que comprobaron incremento indiscutible.

He estudiado las variaciones de la ascorbinemia por acción de los tocoferoles, comprobando que aumenta en forma bastante notoria, sobre todo cuando la administración de vitamina E se efectúa por vía oral.

Se han usado para los experimentos ampollas y comprimidos de vitamina E sintética; acetato de Alfa Tocoferol, de la casa Roche de Nutley (Ephinal "Roche"), que lo proporcionó bondadamente "La Química Suiza" S. A. de Lima.

Los experimentos se llevaron a cabo con conejos hembras y machos, dado que el sexo influye en los requerimientos de vitamina E.

Cuando inyecté vitamina E por vía peritoneal, se administró 50 mg. aumentando la dosis gradualmente a 100, 200 y 400 mg. comprobando que la ascorbinemia aumentó en la proporción de 0.047 mg. %, 0.110 mg. %, 0.085 mg. % y 0.170 mg. %, respectivamente a las 12 hs. y 0.067 mg. %, 0.176 mg. %, y 0.120 mg. %, respectivamente a las 24 hs.

La ascorbinemia de los conejos hembras fué menor que la de los machos; también reaccionan ante diversas dosis de tocoferol en menor proporción que los machos.

El aumento de la ascorbinemia es mayor cuando se administra la vitamina E por vía oral, pudiendo explicarse esta reacción teniendo en cuenta que los tocoferoles, en este caso, actúan desde el intestino, impidiendo la oxidación de la vitamina C que trae consigo su destrucción, razón por la cual la ascorbinemia es reducida. Además, por vía digestiva, los ésteres de los tocoferoles se descomponen dando Tocoferol libre, que posee gran poder antioxidante que impide la destrucción del Acido Ascórbico y la consiguiente hiperascorbinemia.

Quackembush y sus asociados (30), han dicho que el tocoferol funciona como un antioxidante en el tracto gastro-intestinal, más bien que como usa vitamina, regulando esta fase del metabolismo. El tocoferol actúa sobre la vitamina C con carácter químico, ya que evita que enzimas y otros agentes oxidantes ejerzan su acción sobre el Acido Ascórbico durante la digestión intestinal.

Samuel H. Epstein y Sergius Morgulis (9), con el fin de eliminar los factores variables de la destrucción intestinal, han hecho una serie de experimentos con inyecciones intramuscula-

res, del acetato de Alfa-tocoferol, comprobando que las ratas aparentemente utilizan el éster inyectado. También Knowlton, Hines y Brinklous (17), afirman que las ratas utilizan el éster tocoferol inyectado, y aunque era razonable suponer que los conejos también tubiesen esta aptitud, Mattill (20) probó que las inyecciones de los éster acetato de tocoferol eran ineficientes en los conejos con distrofia muscular. En 12 conejos inyectados con 5 a 10 mg. no comprobó ningún efecto curativo, siendo necesario administrar 20 mg. para que se recuperase el animal distrófico. Mattill sugirió que posiblemente el éster de tocoferol que se utiliza debe primero hidrolizarse, siendo necesario la intervención de una enzima que sólo se encuentra en el intestino.

CONCLUSIONES

1a.— Se ha estudiado por primera vez en el Perú, las variaciones en el conejo de la ascorbinemia por acción del Alfa-tocoferol.

2a.— Se empleó la técnica de la Asociación Norteamericana de Químicos Vitaminólogos, usando el fotocolorímetro de Klett-Summerson y filtro de 500 mμ. para determinar el contenido de vitamina C en la sangre, comprobando que aumenta el Acido ascórbico por acción del Alfa-tocoferol.

3a.— El mayor aumento de vitamina C se comprueba al administrar Alfa-tocoferol por vía oral a conejos machos, así lo prueban las determinaciones llevadas a cabo 12 y 24 horas después de administrar Alfa-tocoferol, que encontraron 0.836 mg. %, y 0.88 mg. % hasta 1.9 % de ascorbinemia.

4a.— Los conejos hembras, en general, ofrecen menor incremento de ascorbinemia, pues sólo llegaron a 1.7 mg. % por acción del Tocoferol.

5a.— Cuando se administró Alfa-tocoferol por vía parenteral (peritoneo), solo aumenta hasta 1.3 mg. % para los conejos machos y 1.18 mg. % para las hembras.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— Aloisi M. e Polanyi V.: Sulla natura polineuritica delle paralisi da noi riscontrate in ratti in avitaminosi E, e sul sinergismo tra le vitamine B e C.— "Bolletino della Società Italiana di Biologia Sperimentale".— Vol. 15.— Pág. 451.— Napoli 1940.
- 2.— Abderhalden E. y Mouriquand G.: Vitaminas y Vitaminoterapia.— Pág. 33.— Madrid 1951.



3.— Cimino G. e Bernardini A.: Influenza dell Alfa tocoferolo sul contenuto in Acido Ascòrbico del tessuti.— "Bolletino della Società Italiana di Biologia Sperimentale".— Vol. 27.— Pág. 505.— Napoli 1951.

4.— Chalopin H. y Mudry M.: Recherches sur le dosage de l'acide ascorbique per le bleu de methylene.— "Bulletin della Société de Chimie Biologique".— Vol. 26.— Pág. 256.— Paris 1944.

5.— D'Agostino L.: Ney studies on intervitamin correlation Urinary elimination of Ascorbic acid and reduced Ascorbic acid after oral administration of vitamin E in man.— "Bolletino della Società Italiana di Biologia Sperimentale".— Vol. 20.— Pág. 628.— Napoli 1945.

6.— Davies A. W. and Moore T.: Interaction of vitamins A and E.— "Nature".— Vol. 147.— Pág. 794.— London 1941.

7.— De Felice F.: Sul contenuto di acid l-ascòrbico e deidroascòrbico in alcuni organi di cavie carenzate e trattate con riboflavina.— "Bolletino della Società Italiana di Biologia Sperimentale".— Vol. 27.— Pág. 217.— Napoli 1951.

8.— Eddly W. H. and Dalldorf: The Avitaminosis.— Pág. 323.— Baltimore 1944.

9.— Epstein Samuel H. and Morgulis Sergius: The minimum requirement frabbits ford ialfatocopherol.— "The Journal of Nutrition".— Vol. 22.— Pág. 4150.— Philadelphia 1941.

10.— Evans H. M. and Emerson G.: Effect of vitamin E deficiency upon growt.— "The Journal of Nutrition".— Vol. 14.— Pág. 169.— Philadelphia 1937.

11.— Evans H. and Burr M.: Development in the suckling young of mothers deprived of vitamin E.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 76.— Pág. 273.— Baltimore 1928.

12.— Friedman I. and Mattill H. A.: The oxigen consumption of skeletal muscle from animals deprived of vitamin E.— "American Journal of Physiology".— Vol. 131.— Pág. 595.— Chicago 1941.

13.— Hickman K. C. D., Wooside Marian, Kaley and Harris P. L.: The sparín section of natural tocopherol concentrates in vitamin A.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 152.— Pág. 303.— Baltimore 1944.

14.— Hickman K. C. D. Woodside Marian, Kaley and Harris P. L.: The sparing equivalence of the tocopherols and mode of action.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 152.— Pág. 321.— Baltimore 1944.

15.— Hickman K. C. D. and Harris P. L.: Tocopherol Interrelationships.— "Advances in Enzymology".— Vol. 6.— Pág. 469.— New York 1946.

16.— Hopkins Gowland F.: Lactoflavin as a sensitizer in the photocatalyct oxidation of Ascorbic acid.— "Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg".— Vol. 22.— Pág. 226.— Paris 1938.

17.— Knowlton G. C., Hines H. M., and Brinhouc K. M.: Cure and prevention of vitamin E deficient muscular dystrophy with synthetic Alfa tocopherol acetate.— "Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine".— Vol. 42.— Pág. 804.— New York 1939.

18.— Krebs H. H.: Chemical Composition of Blood Plasma and Serum.— "Annual Review of Biochemistry".— Vol. 19.— Pág. 409.— Scheffield 1956.

- 19.— Linghorne W. J. and others: Relation of Ascorbic acid intake to gingivitis.— "Canadian Medical Association Journal".— Vol. 54.— Pág. 106.— Montreal 1946.
- 20.— Mattill H. A.: Muscular dystrophy in rabbits and the autoxidation of animal fats.— "The Journal of Nutrition".— Vol. 19.— Pág. 13.— Philadelphia 1940.
- 21.— Matill H. A. and Olcott H. S.: Vitamin, E some chemical and physiological properties.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 104.— Pág. 423.— Baltimore 1934.
- 22.— Morgano G. e Sannazari P.: Contributo alla conoscenza delle correlazioni intervitaminiche. 1.— L' influenza della vitamina del complesso B sulle quote tissulari di vitamina C.— "Archivio E. Maragliano di Patologia e Clinica".— Vol. 5.— Pág. 315.— Genova 1950.
- 23.— N. N. Association of Vitamin Chemists: Methods of Vitamin Assay.— Indophenol xylene-extraction method.— Pág. 37.— New York 1951.
- 24.— N. N. Conocimientos actuales sobre la vitamina E.— "Nutrición".— Vol. 4.— Pág. 323.— México 1946.
- 25.— N. N.: Conocimientos actuales sobre las relaciones vitamina-enzima.— "Nutrición".— Vol. 5.— Pág. 196.— México 1947.
- 26.— Oliver Pascual: Vitaminas en Patología. Química de la vitamina E.— Pág. 11.— Barcelona 1941.
- 27.— Pepkowitz L. P.: The rapid determination of Ascorbic acid by the adaptation of Stotz's method to plant materials.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 151.— Pág. 405.— Baltimore 1943.
- 28.— Pittaluga G.: Vitaminas y Sangre. Vitaminas E.— Pág. 23.— La Habana 1948.
- 29.— Philip H. Mitchell, A. Textbook of Biochemistry.— Pág. 205.— New York 1950.
- 30.— Quackenbush P. W., Cox R. P. and Steenbock H. Tocopherol and the stability of carotene.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 145.— Pág. 169.— Baltimore 1942.
- 31.— Robinson W. B. and Stotz E.: The indophenol-xylene extractions for interfering substances.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 160.— Pág. 217.— Baltimore 1945.
- 32.— Rosenberg H. R.: Chemistry and Physiology of the vitamins.— Pág. 332.— New York 1945.
- 33.— Radoin Mme. y Lomba J.: Production of scurvy in the guinea pig and in the young rabbit by bans of a nep ration, biochemically complete and balanced, and uniquely deprived of the factor C.— "Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences".— Vol. 176.— Pág. 1003.— Paris 1923.
- 34.— Smith L. I. Ungnade R. E. and Richard W. W.: Chemistry of vitamin E; structure and synthesis Alfa tocopherol.— "Science".— Vol. 88.— Pág. 37.— New York 1938.
- 35.— Sure B., Theis R. M. and Harrelson R. R.: Vitamins interrelationships.— "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 129.— Pág. 245.— Baltimore 1939.
- 36.— Trenner N. R., Buhs R. P., Bacher F. A. and Gakenheimer W. C.: A note concerning the incompatibility of vitamin B12 and Ascorbic acid.

— "The Journal of the American Pharmaceutical Association".— Vol. 39.— Pág. 39.— Washington D. C. 1950.

37.— Weiss C. and Wilkins R. W.: Disturbance of the cardiovascular system in nutritional deficiency.— "The Journal of the American Medical Association".— Vol. 109.— Pág. 786.— Chicago 1937.

38.— Wharen H.: Über die Bestimmung des Vitamin C in Serum unter Benutzung des Stufenphotometers.— "Klinische Wochenschrift".— Vol. 16.— Pág. 1496.— Stuttgart 1937.

39.— Zimmermann Wilhelm Von: Studie Über Die Photometrische Vitamin C Bestimmung mit Der Methylene Blaumethods.— "Klinische Wochenschrift".— Vol. 17.— Pág. 1728.— Stuttgart 1938.

Bibliografía

Pharmacopoea Internationalis.— Volumen I.— 427 páginas.
— Edición en español.— 1954.

La Pharmacopoea Internationalis (2 volúmenes) — la primera farmacopea internacional — contiene la nomenclatura y las normas internacionales que se recomiendan para las preparaciones farmacéuticas de uso general.

El volumen I consta principalmente de: 199 monografías, que dan normas para varios medicamentos y preparaciones, incluyendo los sueros antitóxicos y algunos de los más recientes antipalúdicos; y 43 apéndices donde se facilitan pormenores sobre reactivos y soluciones reactivas, soluciones utilizadas para análisis volumétricos, pesos y medidas, pesos atómicos internacionales y dosis usuales y máximas para adultos, de los medicamentos incluidos en el volumen I. También se describen en estos apéndices los métodos de verificación y determinación de las actividades de ciertas sustancias mencionadas en las monografías. El volumen contiene, además, instrucciones generales, la explicación de ciertos términos empleados y un índice alfabético.

La Pharmacopoea internationalis, la ha elaborado un grupo de técnicos de la Organización Mundial de la Salud.