

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



"Tiamina y ácido nicotínico en pan y harina de panificación"

Tesis presentada para optar
al grado de
Doctor en Bioquímica y Farmacia

p o r

JORGE HUGO AMOR

1946



Escribo de Tesis

Profesor Dr. Arnaldo Novelli

El trabajo fué realizado en el laboratorio de Química Orgánica Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia y, parte de él, en el Instituto de Investigaciones de la misma Facultad.

Agradezco a mi padrino de tesis, Profesor Dr. Armando Novelli, la eficaz dirección y sabios consejos que facilitaron enormemente mi tarea.

También, mi agradecimiento al personal de la cátedra por los favores dispensados.

S U M A R I O

Introducción y datos históricos.

PRIMERA PARTE: Tiamina en pan y harina de panificación.

Capítulo 1º.- Historia-Prop. físicas y químicas

- " 2º.- Distribución.
- " 3º.- Importancia terapéutica.
- " 4º.- Métodos de valoración.
 - a) biológicos
 - b) bioquímicos
 - c) químicos

Capítulo 5º.- Parte experimental - Método de Kinnersley y Peters.

- " 6º.- Valores obtenidos. Influencia del bromato de potasio utilizado en la panificación, sobre la tiamina contenida en el pan.
- " 7º.- Conclusiones.
- " 8º.- Bibliografía.

SEGUNDA PARTE: El ácido nicotínico en pan y harina de panificación

Capítulo 1º.- Reseña histórica - Prop. físicas y químicas

- " 2º.- Distribución.
- " 3º.- Prop. farmacológicas y acción fisiológica.
- " 4º.- Métodos de valoración
 - a) Biológicos
 - b) microbiológicos
 - c) químicos

Capítulo 5º.- Parte experimental - Método de Harris y Raymond.

- " 6º.- Valores obtenidos. Influencia del bromato de potasio utilizado en la panificación sobre el ácido nicotínico contenido en el pan.
- " 7º.- Conclusiones.
- " 8º.- Bibliografía.

INTRODUCCION

Cada día es mayor la importancia que, desde el punto de vista alimenticio y terapéutico se asigna al complejo vitamínico B; gran número de dolencias son, atribuibles a deficiencias de este complejo, y especialmente de los factores B1 (Tiamina) y amida del ácido nicotínico, objetos del presente trabajo.

Como consecuencia de las distintas manipulaciones que sufren los alimentos antes de ser consumidos, la proporción de vitaminas de los mismos disminuye sensiblemente, llegando en algunos casos a desaparecer completamente. Siendo el pan blanco, el alimento fundamental de nuestra población, en razón de su reducido costo, nos propusimos determinar en él el contenido en tiamina y ácido nicotínico.

Stiebling y Phippard en 1939 (94) demostraron que en Estados Unidos las dietas del jornalero y empleado presentan deficiencias de varias vitaminas y sustancias minerales, particularmente de las vitaminas hidrosolubles B, y de Ca y Fe.

De las 3000 calorías necesarias para un adulto, aproximadamente la cuarta parte deriva de harina blanca (casi libre de Ca y Fe y empobrecida de vitamina B) y en el total el 50 % de las calorías son provistas por alimentos que solo aportan 50 U.I. de las 600 necesarias de vit. B1 y prácticamente no tienen minerales; de ahí la necesidad del enriquecimiento de los alimentos; Sin embargo no debe fortificarse todo alimento; como regla general, el alimento a fortificar debe ser de preferencia, vehículo de la vitamina que se enriquece en ella.

En Inglaterra en Julio de 1940 y en Estados Unidos en Noviembre de 1941 se estimuló por los gobiernos la fortificación del pan, con el fin de conservar su blancura tan apetecida por el público.

Con el objeto de que la harina contenga las cantidades primitivas de vitaminas y elementos minerales del grano entero de trigo, se usan varios procedimientos.

En primer lugar se podría hacer una molienda especial, incorporando a la harina el 85 % del grano total, como se dispuso en Inglaterra desde 1941; esto tiene el inconveniente del color pardo oscuro del pan que se obtendría con esa harina y no sería del agrado de gran número de personas.

Se podría agregar minerales y vitaminas a la harina por el molinero o panadero, con lo cual el pan no cambiaría de aspecto; también se podría combinar ambos procedimientos con lo cual el pan sería de color ligeramente oscuro y con sabor a trigo.

Otro procedimiento consistiría en usar levaduras enriquecidas en tiamina.

El gobierno de Estados Unidos indica que una harina enriquecida debe contener de 2,0 a 2,5 mg. de vit. B1, de 1,2 a 1,5 de vit. B2, de 13 a 16,5 mg. de hierro y de 16 a 20 mg. de niacina o su amida por libra de harina (Science pág. 675, junio 29/45).

La incorporación de estos factores a la harina se efectúa en general bajo la forma de compuestos cristalinos para las vitaminas durante la molienda, no alterándose las características de la harina en forma alguna.

DATOS HISTORICOS

La primera evidencia de la existencia de ciertos factores en la dieta indispensables para la vida, proviene de N. Lunin (1881) de la escuela de Bunge (2) quien concluyó que proteínas, azúcares, grasas y elementos minerales son incapaces de sostener la vida y estableció que alimentos naturales, como la

leche, deben tener, por consiguiente, al lado de estos principios conocidos, pequeñas cantidades de sustancias aún no conocidas, esenciales para la vida.

En 1897 Hopkins efectuó investigaciones del beriberi en la India Oriental Holandesa, concluyendo que éste resulta de la continua alimentación con arroz decortinado.

En 1901, Wildiers, en Lovaina (95) descubrió que las levaduras necesitaban para su alimentación lo que él denominaba con el nombre de "Bios" y que luego se conoció como complejo B.-

En 1906 Hopkins concluyó que la leche contiene factores accesorios de alimentación.

En 1911 Funk, bioquímico del Instituto Lister de Londres, aisló del salvado de arroz una sustancia que era capaz de curar polineuritis en palomas en dosis de 20 mg.

Estudios efectuados en América por Osborne y Mendel, indican la existencia en la manteca de una sustancia que ejerce influencia en el crecimiento.

Mc Collum denominó a esa sustancia esencial promotora del crecimiento "soluble en grasas" "A".

Al otro factor cuya deficiencia produce detención del crecimiento lo llamó "soluble en agua" "B".

El primitivo concepto de la única naturaleza de la vit. B es reemplazado por evidenciarse que esa vitamina no es una sola sustancia sino un complejo que contiene un componente promotor del crecimiento lábil al calor, que previene los síntomas polineuríticos en ratas y aves y otro, promotor del crecimiento, estable al calor que previene dermatitis en ratas.

En 1926, Goldberger (2) demostró que la sustancia que cura la pelagra humana previene o cura dermatitis en ratas y el "Black tongue" (lengua negra) de los perros.

En 1929 la American Society of Biological Chemistry retiene el término vit. B a la parte termolábil anti-neurítica del complejo y designa con el nombre de vit. G (en homenaje a Goldberger) a la parte termoestábil o antipelagrosa.

Los británicos denominaron vit. B a todo el complejo, B1 a la parte termolábil y B2 a la termoestábil. Contrastando con la naturaleza simple del componente termolábil, el termoestábil es muy complejo.

Williams (2) indica los siguientes factores:

Factores termolábiles:

Vit. B1, tiamina o aneurina

Vit. B3 - necesaria en adición a la tiamina para mantener el peso en las aves.

Vit. B4 - considerada como necesaria para crecimiento de ratas y en los pollos y para protegerlos de parálisis específicas.

Factor W

y además otro factor quizá idéntico a la vit. B3.

Factores termoestábiles:

Riboflavina (B2) factor de crecimiento en ratas y preventivo de cataratas.

Acido nicotínico (factor P.P.) preventivo de la pelagra.

Vit. B5 - factor aumento de peso de aves.

Vit. B6 - promotor crecimiento en ratas.

Indica además otros factores de poca importancia.

PARTE PRIMERA: Tiamina en pan y harina de panificación

Capítulo primero

Historia-Propiedades físicas y químicas

En 1885 Takaki, médico japonés, director general de los Servicios Médicos de la Armada Japonesa fué el primero en descubrir el hecho que un cambio de dieta puede curar el beriberi, enfermedad que se presenta principalmente en los pueblos consumidores de arroz, de Japón, India y Malaya (1) Takaki, adicionando a la dieta harina, más carne y vegetales y reemplazando el arroz en parte por trigo y cebada, logró reducir notablemente el beriberi en las fuerzas navales.

Aunque esta enfermedad prevalece en los países del este asiático, también ha sido encontrada en los Estados Unidos, sobre todo en Instituciones penales y asilos insalubres.

Investigaciones científicas intensivas empiezan con el descubrimiento de Eijkman (1897), de que gallinas y pollos desarrollan una enfermedad (polineuritis de las gallinas) muy similar en sus síntomas al beriberi humano, cuando ellos se alimentan con arroz pulido. Gracias a estas experiencias Eijkman establece que una alimentación con arroz pulido desarrolla convulsiones y epistótonos, caracterizados en aves por retracción de la cabeza y movimientos del abdomen.

El sucesor de Eijkman, Grijns (1901) demostró que el beriberi es causado por una deficiencia de un factor esencial en la dieta, contenido en la corteza desechada del arroz; este trabajo de Grijns da la primera clara descripción de una enfermedad de deficiencia e inicia la investigación de las propiedades y distribución de los principios accesorios de la dieta (2). En 1906 Eijkman y Grijns demostraron la solubilidad de la vit. anti-beriberica en agua y alcohol diluido, la termolabilidad y su

difusibilidad al través de una membrana. Estos hallazgos son confirmados por Fraser y Stanton (1909) quienes introdujeron el uso de reactivos de alcaloides, particularmente cloruro de mercurio y observaron aumento de la labilidad del principio activo en solución alcalina.

En 1912 Suzuki (2) establece que la sustancia curativa presente en el arroz pulido puede ser ppda. por ácido fosfotúngstico.

En 1912 Funk, bioquímico del Instituto Lister de Londres (3), curó ratas con dietas polineuríticas por la administración de extractos acuosos de corteza de arroz.

Los investigadores americanos Vedder y Williams en 1913 ensayaron concentrar el constituyente antineurítico de la cáscara de arroz, antes que los documentos de Funk llegaran a las Filipinas. Ellos han mostrado que el principio activo debe pasar al través de una membrana, es adsorbido por el carbón y debe ser ppdo. por ácido fosfotúngstico.

En 1926 Jansen y Donath (4) obtuvieron por primera vez al estado cristalizado la vitamina B1 a partir de la corteza del arroz y le atribuyeron la fórmula $C_6 H_{10} N_{20}$, pero Windaus, Tschesche, Ruhkopf Laquer y Schultz en 1932 constataron que este cuerpo tiene además del N, S y que la fórmula bruta es $C_{12} H_{16} N_4 O S$.

Ohdake en 1932 por un método de aislamiento similar al de Jansen y Donath obtiene el clorhidrato cristalino de una sustancia de menor potencia, compuesto sulfurado que funde a 250° con la composición $C_{12} H_{16} N_4 O_2 S$.

En 1936 (5) Williams e independientemente Grewe explicaron la estructura química de la vitamina B1. En ese mismo año la síntesis de esta vitamina es efectuada por Williams y Cline y por Andersag y Westphal.

Williams y sus colaboradores (6) idearon un método para asegurar liberados consistentes de clorhidrato de vitamina antineurítica de

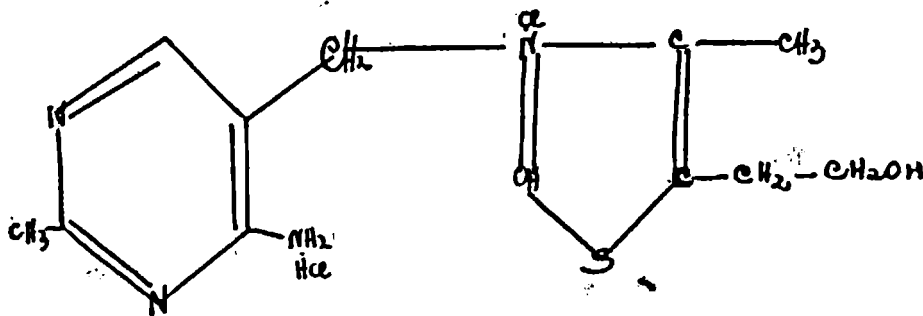
aproximadamente 5 gramos por tonelada de arroz pulido o sea el 25 % de la cantidad presente en el arroz pulido.

El primer rendimiento obtenido es muy pequeño, pero trabajos últimos han mejorado la técnica; Ohdake obtiene 1,6 g. del clorhidrato de 11,500 Kg. de cáscara de arroz, pero Williams obtiene 0,45 g. de 100 Kg.

En 1937 (5) Lehman y Schuster aislaron cocarboxilasa cristalina de la levadura y probaron su constitución como ester pirofosfórico de vitamina B1.

Propiedades físicas y químicas

La vitamina B1 conocida también con los nombres de tiamina, aneurina, orizamina, torulina (nombre histórico, 7) es, químicamente el cloruro clorhidrato del 4 metil 5 beta hidroxietil N (2 metil 4 amino pirimidil (5) metil tiazol.



El clorhidrato de vit. B1 es soluble en agua (1 g. en 1 cm³), en alcohol (1 g. en 100 cm³ de alcohol de 95° o en 315 de alcohol absoluto), en glicerina (1 g. en 18 cm³) y ácido acético.

Es insoluble en éter, cloroformo, benceno y acetona.

La vit. B1 es ópticamente inactiva. El clorhidrato cristaliza de soluciones acuoso alcohólicas como el hemihidrato, fundiendo a 248 - 250°C. (Cline, Williams y Finkels-tein) (8) (9).

El bromuro bromhidrato se presenta en rosetas de agujas que funden a 229 - 231°C. El punto de fusión de otras sales es como sigue: sulfato 203 y 276 - 78. (10);

nitrate 164 - 5; picronolato dimosfo 165 y 229; picrato 208; sal de oro 189; rufinato 291.

Al permanecer en aire húmedo, cristales de vit. B1 absorben humedad en una cantidad de un mol.

En lo que respecta a su estabilidad frente al calor (1) por experiencias animales se demuestra que la tiamina no es apreciablemente modificada por una hora de abullición en solución acuosa; a una alta temperatura 120 - 30°C. en un autoclave es deteriorada en un corto tiempo y continuando el calentamiento completamente destruida. Esta es la principal diferencia con la vit. B2 que es más estable al calor.

Levadura autoclavada no demuestra efecto curativo sobre el beriberi. La vitamina es estable a altas concentraciones de hidrogeniones pero es rápidamente destruida por álcalis, así por ej., calentada 1 hora a 96° a pH 4,5 se destruye el 25 %; calentada 1 hora a 96° a pH 7 el 30 %; calentada 1 hora a 96° a pH 10 se destruye el 80 % y se descompone totalmente por calentamiento de 4 horas a la temperatura de 30 - 40°C. Sin embargo la vitamina contenida en los alimentos naturales a su temperatura de cocción no sufre pérdidas, pero pasada ésta la destrucción es importante.

Si se calienta 1 hora a 110°C no sufre ninguna pérdida; calentando 1 hora a 120°C se pierde el 50 %; a 130°C 90 % de pérdida y a 140°C 100 % de pérdida (11).

Que la actividad antineurítica de los alimentos sea sólo destruida en pequeño grado por cocimiento puede ser debido al hecho de que la vitamina se presenta en forma combinada en una extensión más grande que libre.

La aneurina es adsorbible de soluciones acuosas por varios agentes, gel de sílice, alúmina, tierra de fuller, carbón animal, zeolitas, permutita y soluble según técnica

especiales. Por su condición de amina ppta. cuantitativamente por el ácido fosfotúngstico, lo cual permite separarla de los extractos que la contienen. No ppta. con acetato básico de plomo, ná con el nitrato de plata en solución ácida, ni con sulfato de mercurio, pero sí con el bicloruro de mercurio en sol. acuosa con carbonato de sodio.

En solución acuosa ppta. con el ácido picrolónico y cloroáurico, pero no ocurre así en solución alcohólica. Con el ácido pírico ppta. de las soluciones impuras no así de las puras.

Se ha señalado la deliquesencia de la vit. B1, pero el agua de cristalización ha sido referida a media, una o aproximadamente una molécula de agua por una de vitamina, problema éste que ha sido estudiado por Bastedo, Trenner y Webb. (12), preparando varios hidratos en forma pura, midiendo luego su tensión de disociación a temperatura constante de 25° entre 1 y 19 milímetros. Según estos autores a la tensión de vapor de solución saturada 20,9 mm. el grado de hidratación corresponde aproximadamente a una molécula de agua de cristalización por molécula de vitamina.

Para trabajos experimentales la tiamina es desecada completamente al vacío sobre ácido sulfúrico al 95 %.

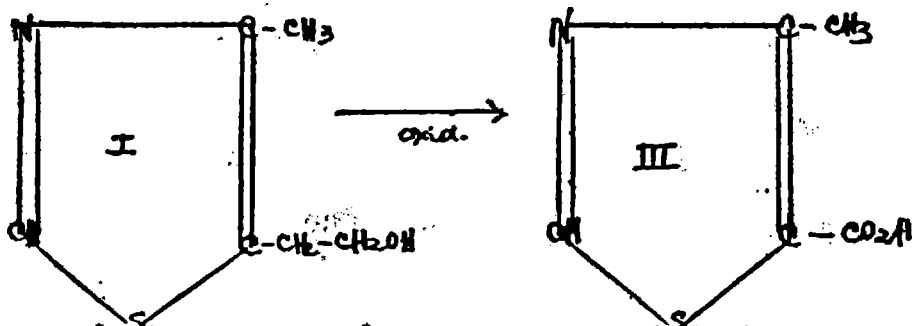
La tiamina es solo conocida en la forma de sus sales. La base libre que debe ser cuaternaria no puede ser obtenida pura.

Considerable conocimiento en la estructura de la molécula es obtenido por Williams y sus colaboradores (13) quien fundó que la vit. B1 en una solución de sulfato ácido de sodio sufre una división de acuerdo a la ecuación:

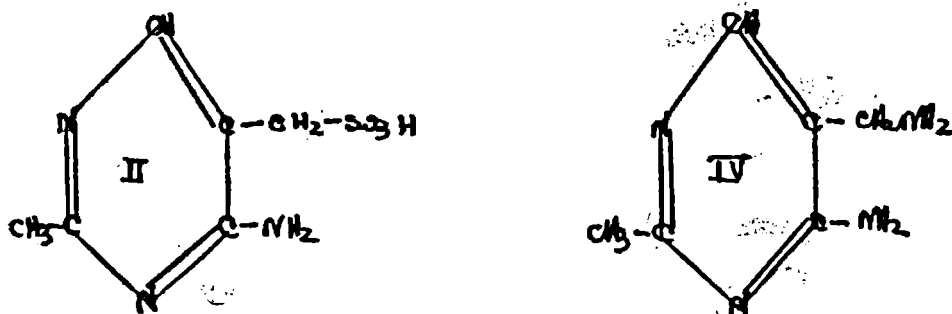


El producto de división (I) es sintetizado por Clarke y Gurin (14) y muestra ser 4 metil 5 beta hidroxietil-tiazol (I). Por oxidación da 4 metil tiazol 5 ácido carboxílico (III); éste ácido,

aunque no reconocido al tiempo ha sido anteriormente obtenido por oxidación de la vitamina con ácido nítrico.

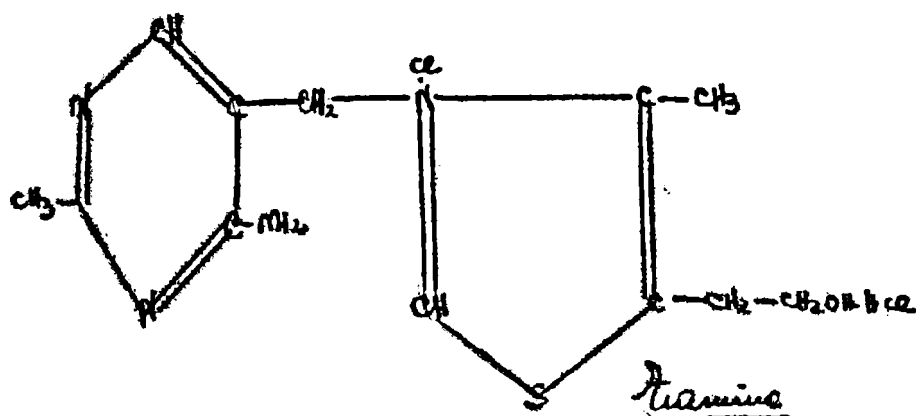


Williams (15) estableció que el segundo (II), producto de división es una pirimidina ácido sulfónico por la similitud de su espectro de absorción con el de 6 amino pirimidina ácido sulfónico y sugirió que la vitamina es una sal pirimidil tiazol. Más tarde es mostrado que esta sugestión es errónea (16), (17) y que el segundo producto de división es idéntico con el sintético 2 metil 4 amino pirimidina 5 etil ácido sulfónico (II) (18) (19):



La estructura del segundo producto de división ha sido establecida teniendo en cuenta que la vit. B1 es una sal pirimidil 5 metil tiazol (Williams, loc. cit.).

Una conclusión similar es determinada independientemente por Grewe quien mostró que la base sintética (IV) 2 metil 4 amino 5 amino metil pirimidina es idéntica con la base reducida por suave oxidación de la vitamina con permanganato de bario.

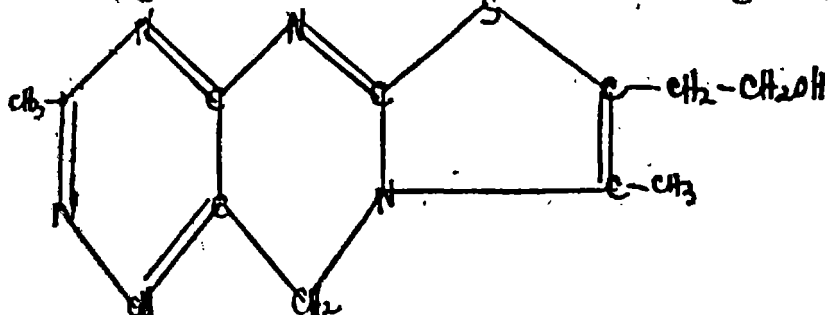


La tiamina (20) cristaliza en forma de agujas finas, en agrupación de estrellas. Las soluciones puras, de reacción neutra, se esterilizan calentando a 100°C sin que pierdan la actividad. Soluciones neutras y en particular las básicas son termolábiles.

El espectro de absorción ultravioleta de el clorhidrato de tiamina muestra dos bandas a pH 7 (^{o mayor} ~~o menor~~) a 235 milimicrones y 267 respect. (21) y una sola banda a pH 5,5 (o menos) a 245 - 247 milimicrones. Entonces el espectro de absorción de la tiamina es una función de la conc. de hidrogeniones. (22) Esta conducta puede ser atribuida al componente pirimidínico de la molécula de vitamina (23) y (24).

La vitamina B1 es muy sensible a la oxidación y reducción. Por suave oxidación es llevada a tioromo. Por suave reducción se forma dihidrocompuesto.

Mediante una oxidación esmerada (por ej. con ferricianuro de potasio) la tiamina incolora y fluorescente se transforma (con pérdida de dos H) de manera irreversible en un colorante amarillo de intensa fluorescentaa azul. Esta sustancia el tioromo, de cristalización fácil, se puede obtener de la levadura y carece de la actividad biológica de la vit. B1. Tiene la siguiente fórmula:



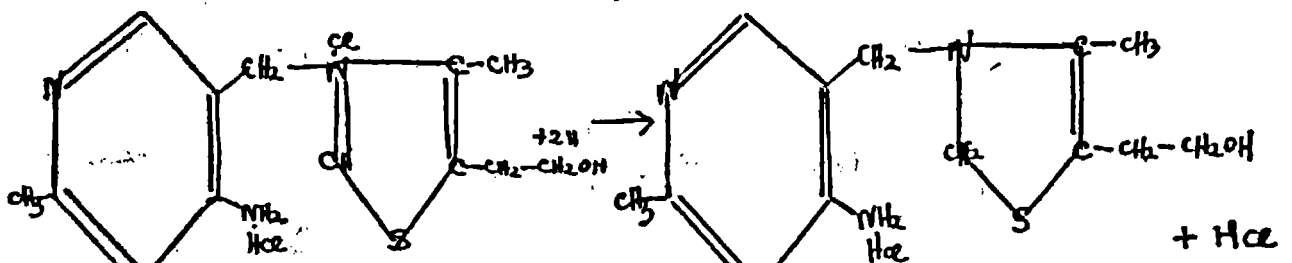
Por otra parte la aneurina se reduce por H a una dihidro compuesto incoloro (fórm. III) (25).

O'Brien y Peters (26) han preparado dos sulfatos con la composición aproximada $2X(SO_4)_3$ y $2X(SO_4)_4$ donde X representa un mol de la base con puntos de fusión 203 y $276 - 78$ respectivamente y un nitrato con descomposición fina a $164 - 165^{\circ}\text{C}$

La vit. B1 no es sensible a la oxidación atmosférica. De acuerdo a Kinnersley, O'Brien y Peters, pequeñas cantidades de tiocromo son formadas cuando soluciones alcohólicas de tiamina permanecen a la temperatura ambiente por varios meses. Muy poco es formado en sol. acuosa a pH 2, pero es producido más rápidamente al aproximarse a pH 7.

Reducción: Cuando trata con negro de platino o con hidrosulfito la vit. B1 es fácilmente reducida, particularmente en fosfato o solución de bicarbonato.

Lipmann ha indicado la reducción como tomando lugar al doble lazo cerrado al N cuaternario y simultáneo partimiento del ion cloro(27)



Reducciones efectuadas con hidrosulfito son similares a las reducciones efectuadas por sustratos en la célula viviente.

La coenzima de Warburg que lleva amida nicotínica, y ambas, la enzima y la amida sufren una forma especial de reducción con hidrosulfito como comparando la reducción catalítica en la presencia de negro de platino. Peters (28) ha mostrado que ácido nitroso bajo suaves condiciones no afecta a la vit. B1, pero en la presencia de ácidos minerales calientes la vitamina es atacada por ácido nitroso con evolución de nitrógeno y posiblemente con la formación del correspondiente hidroxi compuesto.

La tiamina puede ser acetilada sin gran pérdida de actividad, aunque anh. acético a alta temperatura la inactiva.

La base libre de la tiamina es muy lábil y no se ha podido obtener al estado puro. De la fórmula estructural (20) se deduce que el S. se halla combinado en la molécula de la vitamina B1 en una forma (anillo de tiazol) que no se ha podido encontrar todavía en la naturaleza.

El punto isoelectrico se halla entre pH 9 y pH 10.

La constante de disociación en su forma ácida a 0°C en solución acuosa es pH 6,8.

Moggridge y Oguten (29) señalan la existencia de dos grupos básicos débiles a pH 3,4 y 4,8 y un grupo pseudo ácido en la región del pH 9.

Propiedades del tiocromo:

El tiocromo (30) tiene la fórmula empírica $C_{12} H_{14} ONS$.

El punto de fusión es de 228°C (Clorhidrato 217 - 221). Presenta absorción máxima a 358 - 375 milimicrones.

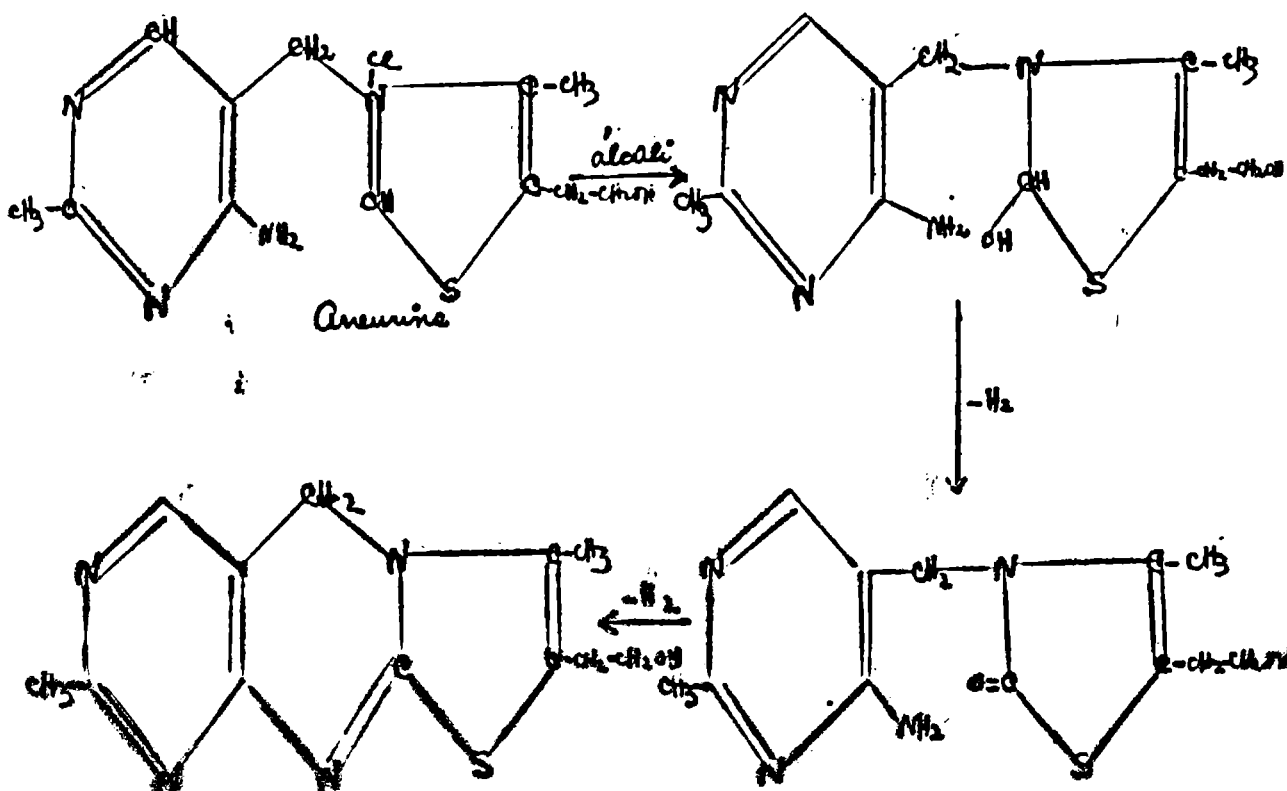
Ha sido aislado por Kuhn y colaboradores de la levadura; 4,050 Kg. de levadura dan 250 mg. de tiocromo.

Es soluble en agua y alcohol metílico; difícilmente soluble en acetona, cloroformo y éter.

Con agentes reductores, hidrosulfito de sodio e hidrogenación catalítica dos moles de hidrógeno son tomados con la formación de un leuco compuesto que es prontamente oxidado por oxígeno.

El mismo compuesto es obtenido por Barger, Bergel y Todd (31) por oxidación de una solución alcalina de tiamina con ferricianuro.

Esta relación entre tiocromo y aneurina es mostrada por sus fórmulas:



Cocarboxilasa: De acuerdo a Auhagen (1933) (2) la enzima carboxilasa es activada por una co-enzima, la co-carboxilasa, últimamente aislada por Lohman y Schuster (1937)¹, en el estado cristalino, del germen de la levadura e identificada como el ester pirofosfórico de la tiamina. La confirmación de esta estructura es suministrada por Stern y Hofer (1937) (32) quienes sintetizaron cocarboxilasa por la acción del oxiclóruo de fósforo en vit. B1 cristalizada en el frío.

Tauber (34) (34) últimamente obtiene cocarboxilasa sintéticamente de vit. B1 y ortofosfato por un sistema enzimático de lev. seca y también por un der. enzimático de la mucosa duodenal del lechón. El aislamiento de la coenzima pura no es sin embargo práctica debido a la presencia de proteínas y productos de autólisis y Tauber (1938) ideó un método de fosforilación vitamínica B1 por calentamiento con mezcla de pirofosfato de sodio y ácido ortofosfórico a 155°C 15.

Capítulo segundo

Distribución

El primer estudio sistemático de la distribución de la vitamina antineurítica en materiales alimenticios es hecho por el Lister Institute de Londres por Cooper en 1912, quién empleó la prevención de la polineuritis en palomas como criterio. A éste siguen los trabajos realizados por Chick y Hume en 1919; Plimmer y Raymond y Jansen y Dondth.

La tiamina se encuentra muy difundida, tanto en el reino animal como en el vegetal. En el reino vegetal son pocas excepciones (levadura, germen de trigo, salvado de arroz) su concentración es baja y difícilmente sobrepasa (20) a 0,5 mg.

Se encuentra particularmente en los gérmenes de trigo y en las semillas de ciertas legumbres (arvejas, chauchas y lentejas), vale decir, en todas aquellas partes donde se acumulan las sustancias nutritivas para el germen en desarrollo.

La vitamina B1 se presenta en la naturaleza como compuesto libre o en la forma de sus sales, como vit. B1 - complejo proteína (35); como vit. B1 - ester ácido pirofosfórico (co-carboxilasa) y como vit. B1-complejo fosforo proteína.

En el esqueleto y en el músculo del corazón la cantidad de la vitamina libre es mayor que el compuesto fosforilado, mientras que en el hígado y cerebro la co-carboxilasa (y su complejo proteína) se presenta predominante.

La tiamina se encuentra en cantidades que oscilan entre 0,1 a 2,0 gamas por gramo (aproximadamente 1 parte por millón) en una gran variedad de tejidos animales y vegetales. Estas proporciones son excedidas solo en semillas de granos y levadura en crecimiento. Vegetales, frutos y nueces contienen pequeñas cantidades; guisantes maduros y habas son materiales ricos.

Los principales materiales que contienen tiamina (2) son: cereales, todos los gérmenes, legumbres, yema de huevo, carne de cerdo, leche, patatas, ^{carnes} carboles y diversos vegetales. En lo que respecta a los frutos en general, no son materiales que tengan proporción apreciable de tiamina.

Bocher y Hartzler.(2) indican un concepto general de la distribución de la tiamina en alimentos en la siguiente clasificación:

Exoelentes:

(50 unidades internacionales o mas por onza)

Habas, guisantes secos, harina de avena, quaker, costillas de cerdo, jamón ahumado, habas secas y frescas.

Buenos:

(30 a 50 unidades internacionales por onza)

Habas poco maduras, harina de cereales blanca, yema de huevo, leche, ~~en~~ polvo de leche, arvejas poco maduras, centeno integral, nueces, trigo total.

Débiles:

(10 a 30 unidades internacionales por onza)

Espárragos, bifes, músculos flacos, brócolos, polluelos, harina de granos amarilla, cordero, hígado, patatas, ciruelas desecadas, trigo picado.

Los métodos usuales de cocimiento de alimentos y de descortezamiento de granos, procesos de moler, desecar, etc. alejan la porción rica de B1 que de otro modo resultará provechosa en la dieta proporcionada.

En lo que respecta a los cereales constituyen un material excelente para proveer calorías en la dieta humana, por su baratura, su alto contenido de almidón y su bajo contenido de agua. Sin embargo la elevada proporción de almidón hace necesaria una alta provisión de tiamina.

Los cereales comunes en la forma del grano entero tienen aproxima-

damente un contenido de 130 - 160 un. internacionales por 100 gramos con muy pocas diferencias.

La parte más rica es el embrión del germen dado que el pericarpio contiene mucho menos.

El endosperma, especialmente cuando está privado del pericarpio como en la preparación del arroz pulido o de harina blanca es deficiente en el factor antineurítico.

Pérdidas en el cocimiento son bien ilustradas por la investigación de los valores comparativos de espinaca y tomates en la dieta del niño, conducida por Tisdall y otros (1937) quienes demostraron que la pérdida de tiamina es debida no sólo al proceso de cocción sino también a la pérdida en el agua de cocimiento.

Los frutos como los vegetales tienen un alto contenido de agua. Ellos son sin embargo menos sujetos a pérdidas del cocimiento, porque su gran acidez protege a la vitamina de su destrucción y el cocimiento en agua es generalmente acompañado con azúcar como un jarabe.

En la cocción culinaria común, más de un 50 % del contenido de B1 en los elementos vegetales, especialmente en las verduras y patatas, pasa al agua usada para cocer. Las pérdidas son menores (10 - 25 %) si las verduras y patatas se preparan estofándolas. Entre los tejidos musculares de animales, el de cerdo parece contenerla en gran proporción, las concentraciones más altas se hallan en órganos (corazón, cerebro, riñón, hígado, etc.). La cantidad varía mucho con la especie, músculos de cerdo, por ej. tienen alrededor de 8 veces más tiamina que músculos de buey (34). La aneurina de los órganos procede de la alimentación; por un aporte deficiente de B1 disminuye el contenido de los órganos de esta sustancia, pero ni en el beriberi desaparece del todo; los tejidos retienen energíamente los últimos restos imprescindibles de la vitamina. La mayoría de los peces la contienen, pero las

más elevadas cantidades se hallan en los huevos, siendo muy ricos en este sentido, los de platija.

Se halla en las frutas frescas (manzanas, bananas, etc.) y en proporción superior en las secas (ciruela seca, almendra, castaña) y de ellas la más rica es la avellana.

En lo que respecta a la levadura los datos varían.

Para la levadura de pan de 15 a 80 gamas por gramo y para la de cerveza 42 a 160 y aún 360 gamas por gramo de levadura seca. Para el germen de trigo de 20 a 56 gamas; para el de cebada 42 gamas y para molienda de arroz 20 a 40 gamas por gramo, datos éstos suministrados por Stöpp y obtenidos por métodos biológicos.

En la sangre humana se hallaría entre 8 y 16 gamas % de aneurina.

Algunos microorganismos son capaces de sintetizar vit. B1. La facultad de la síntesis ya se comprueba en las plantas en sus grados evolutivos más primitivos.

Ciertas bacterias, como la coli, las de la panza del bovino y del ciego de la rata, bacilos del ácido láctico, smegma y timotex, levaduras, esquizomicetas (actinomicetas y aspergillus) son capaces de sintetizar la tiamina (Guerrant, Sunderlin, Schieblich). Bacterias que producen B1 también viven en el ganado que gruñe, carnero, etc. (37).

Otros microorganismos no poseen la facultad de sintetizarla, para su crecimiento y desarrollo es indispensable la presencia de tiamina en los cultivos (por ej. estafilococo áureo, bacterias del ácido propiónico, estreptotrix y otros microorganismos más primitivos como ficomicetes, ricopus, mucor).

Se deduce de ello que la necesidad de tiamina, comprobada hasta para los seres más primitivos, es una propiedad característica de todas las células vivientes.

La tiamina se encuentra además en todas las partes vivas de las plantas de mayor grado evolutivo, incluso en las plantas parasitarias libres de clorófila.

En lo que respecta a la síntesis se efectúa sólo en las hojas y con irradiación. De las hojas la tiamina es transportada a las partes que la necesitan, en particular a las semillas, retoños y raíces. Especialmente el desarrollo de las raíces es estimulado por vestigios de aneurina.

Es sumamente interesante el hecho de que las ratas sometidas a un régimen exento de vit. B1, pero rico en H. de carbonos no suelen enfermar de beriberi si tienen acceso a sus propios excrementos (coprofagia) (20).

Las bacterias y levaduras intestinales de las ratas así alimentadas son capaces de sintetizar la B1 que entonces pasa a las heces y vuelve a la rata por coprofagia. Esta síntesis bacteriana de la vit. B1 se efectúa principalmente en el ciego. En el bovino, que resiste a la carencia de B1 largo tiempo, las bacterias del contenido de la panza, especialmente el *flavobacterium vitarum* son capaces de sintetizar la aneurina; esta vitamina procedente del metabolismo bacteriano se absorbe directamente por el estómago y pasa por ej. a la leche de la vaca cuyo contenido de B1 depende pues de la alimentación de una manera muy relativa.

En cambio el contenido de B1 de la leche humana varía con la alimentación y desciende a cero si la comida carece de B1.

En el ser humano la síntesis de la B1 se efectúa sólo en el lactante, predominando en la síntesis el bacilo *bifidus* (especie de *streptotrix*); esta síntesis se efectúa en el cólon del lactante.

La carne es solo un material débil del factor antineurítico; sin embargo por estimaciones hechas en carne magra, separada como sea posible de grasas, tendones y huesos, de cerdo, se ha encontrado 1300 a 2000 u. internacionales por 100 gramos de mat. seco en contraste a las 30 u. internacionales en carne de vaca y 400 u. internacionales en ovejas.

Mickelsen y colaboradores han establecido que una suave destrucción de la tiamina tiene lugar al freirse, pero al asar o estofar la destrucción de la vitamina alcanza al 50 %.

El blanco del huevo no tiene B1, la yema contiene 100 - 150 unidades internacionales por 100 gramos. El total comestible contiene un promedio de 17 unidades internacionales para el huevo casero.

Las aves son un material pobre en tiamina; los peces, salmón, halibut, trucha, bacalao, sardina y camarones tienen bajo contenido en B1.

Las bebidas, café, té, cerveza, contienen una no significativa cantidad de B1, aunque el chocolate tiene un contenido de alrededor de una parte por millón.

A continuación transcribimos los valores dados por Cowgill de diferentes materiales alimenticios: (2)

C e r e a l e s :

Contenido de tiamina en unidades internacionales por 100 gramos de porción comestible:

Cebada 100; Cebada perlada 15; Maíz 100; Harina de maíz 25; arroz 100; arroz pulido 8; cáscara de arroz 420; trigo 100; harina 15; pan blanco 10;

V e g e t a l e s :

Alcachofas 50; espárragos 70; coliflor 12; lechuga 21; espinacas 12; patatas 20;

F r u t o s :

Manzanas 11; bananas; 15; pulpa de naranjas 17; peras 21; ciruelas 70;

C a r n e s - p e s c a d o s y p r o d u c t o s d e a v e s :

Carne de vaca cruda 25; carne de vaca seca 50; hígado de vaca crudo 160; huevo de gallina 27; yema de huevo 47; carne de cerdo 185; jamón 120;

V a r i o s :

Leche total 18; manteca 40; queso 10;

Capítulo tercero

Importancia terapéutica

La necesidad que presenta el hombre sano de vitamina B1 no tiene un valor fijo como otras, sino que depende de los alimentos; esa necesidad está relacionada al consumo de glúcidos y lípidos; cuanto mayor es la cantidad de glúcidos, mayor es dicha necesidad y menor cuanto mayor la cantidad de lípidos; esto significa que los lípidos actúan como ahorradores de tiamina mientras que los h. de carbono aumentan el consumo.

El consumo de proteínas no ejerce una influencia constante sobre la necesidad del organismo animal en B1. Williams - Spies realizaron análisis de numerosas modificaciones de la alimentación en diferentes partes del mundo y determinaron que la necesidad de B1 aumenta con el consumo de las proteínas. Esto es debido a que de las albúminas alimenticias se forman carbohidratos, siempre que el aporte de éstos no sea excesivo.

El peligro de hipovitaminosis B1 es grande, sobre todo en los pueblos civilizados muy consumidores de pan blanco, azúcar y féculas de origen industrial, los que en relación con su gran consumo de H. de carbono reciben de ordinario poca aneurina, de ahí también la frecuencia de hipovitaminosis B1 entre las clases pudientes (a diferencia de las hipovitaminosis A y D) porque la cantidad de B1 no coincide con la calidad de la alimentación.

Por otra parte al aumentarse el metabolismo general, por la tiroxina, estados hipertiroideos o por trabajo excesivo, se aumenta la necesidad de tiamina. En el alcoholismo que intensifica el gasto sustancial, se produce avitaminosis B1 y polineuritis.

Existe (20) una relación numérica directa entre la actividad muscular y el requerimiento de B1. Egan publicó en 1917 datos sobre una epidemia de a bordo que afectó con preferencia a fogoneros y mecánicos, mientras que los marineros o no enfermaron o lo hicieron en forma leve.

La temperatura ambiente (20) también presenta importancia, al aumentar la misma, aumenta la necesidad de B1, lo cual presenta interés en la patogenia del beriberi tropical y de los niños de pecho; en las enfermedades febriles también aumenta el requerimiento de B1, de ahí la frecuencia del beriberi en el curso de la malaria y otras enfermedades tropicales (particularmente en Brasil) y después de la difteria.

Durante el embarazo y la lactancia y en primavera, en que se encuentra aumentada la actividad hormonal y metabólica, aumenta la necesidad de tiamina. Una rata necesita en lactación 3 a 5 veces más cantidad de tiamina que en condiciones normales.

Por otra parte la raza parece también influir; así palomas blancas carentes de B1 en su alimentación y en igualdad de condiciones con palomas grises ú oscuras resisten al beriberi un tiempo mucho más prolongado.

La vit. B1 se absorbe por el intestino colgado y se deposita en los diferentes órganos; en caso de exceso se elimina por vía renal. Forma parte integrante del jugo gástrico, en condiciones normales. Cowgill y Williams luego de estudios realizados indican en 600 gamas la cantidad mínima de B1 que en condiciones normales protege contra el beri beri. El óptimo puede señalarse entre 1000 y 1500 gamas diarias para el adulto. Sinclair indica que en la sangre la vit. B1 se hallaría bajo la forma de co-carboxilasa. La co-carboxilasa no se elimina como tal en el organismo animal, sino que sufre una previa defosforilación en el riñón (Tauber 38). Por lo tanto la aneurina se elimina al estado libre por la orina, existiendo diferencias según el individuo en el tiempo de eliminación. Por las heces también se elimina en forma libre. Según Stepp y colaboradores el hombre normal elimina de 100 a 500 gamas de B1 por la orina diariamente.

La vit. B1 influye sobre la economía hidráulica del cuerpo, su

falta traedemas de origen extrarenal, sin aumento de la permeabilidad capilar y avides de los tejidos por sal y agua; hipoprotei-
nemia, derrames serosos e inhibición acústica del miocardio. Hay
lipemia e hipertrofia córtico-suprarenal y su presencia se hace
indispensable para el mantenimiento del tono de la musculatura
gastrointestinal, como también de la reabsorción de las grasas.
Con la vitamina A se halla en relaciones antagónicas puesto que
la avitaminosis B1 se exagera administrando el factor A.

Fisiologicamente la B1 desempeña su función principal en el meta-
bolismo de los H. de carbono.

La vit. B1 es indispensable para la combustión glúcida normal en
el cerebro. La necesidad del cerebro y de los ganglios basales en
B1 parece ser muy grande. El cociente respiratorio también se en-
cuentra disminuido en el cerebro de beriberi. La disminución de
la respiración cerebral va paralela exactamente con los síntomas
cerebrales de la enfermedad, los que se deben por lo tanto a los
trastornos del metabolismo glúcido en el cerebro.

En lo que respecta al mecanismo de acción de la vit. B1 en el co-
razón, también está dirigido de manera específica. Rigler pudo
demostrar que la B1 cristalizada estimula el latido de las aurí-
culas aisladas, siendo así una verdadera "automatina". La oxida-
ción del azúcar en el miocardio beriberico no se halla paralizada
sólo en la etapa del ác. pirúvico, sino en la del ác. láctico,
por lo cual en el estado precoz de la avitaminosis B1, se produce
en el miocardio una acumulación del ác. láctico, cuya consecuen-
cia directa es la bradicardia (Birch-Harris).

Las palomas avitamínicas acusan en espasmos, un tenor fuertemente
elevado de glicógeno en el hígado, lo que se explica no solo por
la menor necesidad de los tejidos en glucosa (inhibición del des-
doblamiento de los carbohidratos) sino también por el aumento de
la resíntesis a glicógeno del ác. pirúvico que se acumula en el
organismo.

En la bradicardia característica de la avitaminosis B1, parece intervenir además del ácido láctico, el ácido adenílico, que se acumula en el organismo en el caso de una carencia de B1. Inyecciones de ácido adenílico empeoran los síntomas cardíacos del beriberi mientras que la ingestión de B1 aumenta la excreción del ácido adenílico. Los trastornos debidos a la carencia de B1 pueden ser atribuidos a dos causas principales: a trastornos del catabolismo glucídico (de efectos pronunciados sobre el sistema nervioso central y periférico y sobre el corazón) y a alteraciones del metabolismo hídrico.

En la hipovitaminosis B1 se observa perturbación del metabolismo de los H. de carbono y trastornos de la economía hidráulica. El síndrome de la polineuritis notable en la gallina y paloma, lo mismo que en los mamíferos superiores, produce ataxia, opistótono y espasmo de retación. Histológicamente hay hemorragia, atrofia de los gránulos de Nissl, cromatolisis y degeneración de las vainas medulares y de los nervios periféricos.

Se producen sub-temperaturas por restricción de la combustión de los h. de carbono y atonía gastrointestinal.

La vit. B1 tiene indicaciones a más del beriberi en ciertas formas de hipovitaminosis provocada por regímenes alimenticios.

En debilidad muscular general, dolores y parestesis de las extremidades, hipoproteinemia y edemas que se han asimilado a hipovitaminosis, el factor B1 da excelentes resultados.

La administración de levadura rica en B1 en la mielosis funicular hace desaparecer la incontinencia, ataxia, parestesia y síntomas espásticos; como esta vitamina es un factor dietético neurótropo específico se ha ensayado con buen resultado en los estados neurálgicos, sobre todo ciática y neuralgia del trigémino.

Cabe mencionar también la acción sobre la diabetes mellitus por las estrechas relaciones entre el metabolismo de los H. de carbono y vit. B1, por la acción hiperglicémica o hipoglucosúrica de los

extractos de levadura, por eso hace que se indique en las formas semigraves de diabetes reemplazando a la insulina.

Los primeros síntomas de una hipovitaminosis B1 crónica: constipación, astenia, anorexia, cansancio, dolores de cabeza, jaqueca, parestesias, y sudores profusos no son específicos y solo se interpretan como síntomas de carencia B1 después de haber desaparecido por ingestión de alimentos ricos en B1 ó inyecciones.

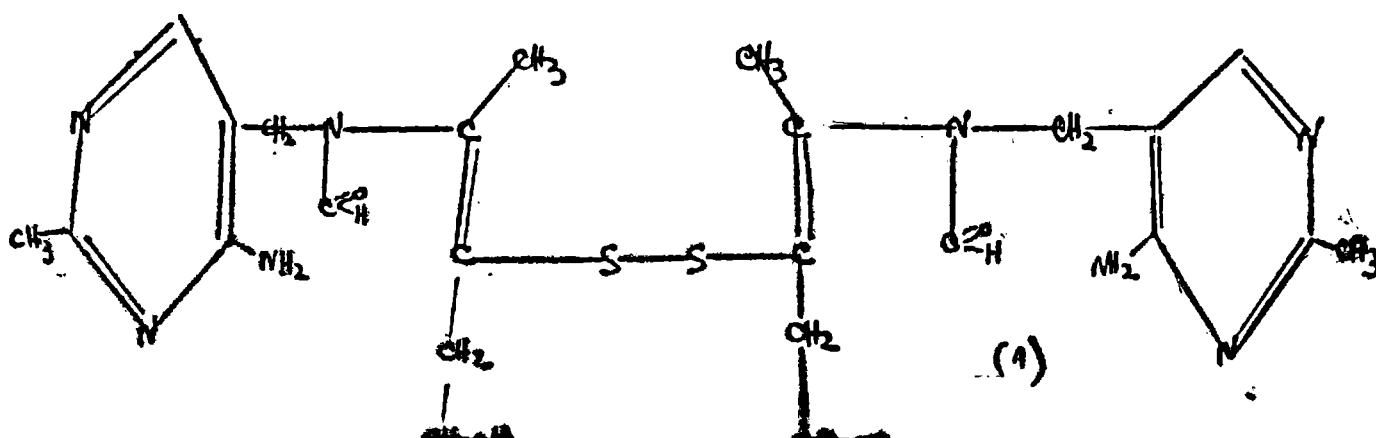
En el hombre la vit. B1 carece totalmente de toxicidad, aún administrando dosis terapéuticas elevadas. En los experimentos en animales, las dosis endovenosas mortales se elevan a 125 - 350 mg./kg según la especie del animal; las dosis mortales subcutáneas son 6 veces y las perorales 40 veces mayores.

La muerte sobreviene con síntomas de una parálisis cerebral (shock, convulsiones, parestias, síncope respiratorio) semejante a los de una intoxicación con curare.

El índice terapéutico (cociente de la relación entre la dosis mínima terapéutica y la tóxica) es de 600 en ratones, 5000 en ratas y 67000 en perros y va descendiendo con la talla y la progresión filogenética de las especies, de modo que en el hombre su empleo carece de todo peligro.

La acción vitamínica de la tiamina (5) parece estar relacionada con la estructura específica de la molécula. Las diferentes sales de vitamina, como el clorhidrato, bromhidrato, sulfato, etc. y el éster ácido pirofosfórico, cocarboxilada tienen una actividad correspondiente.

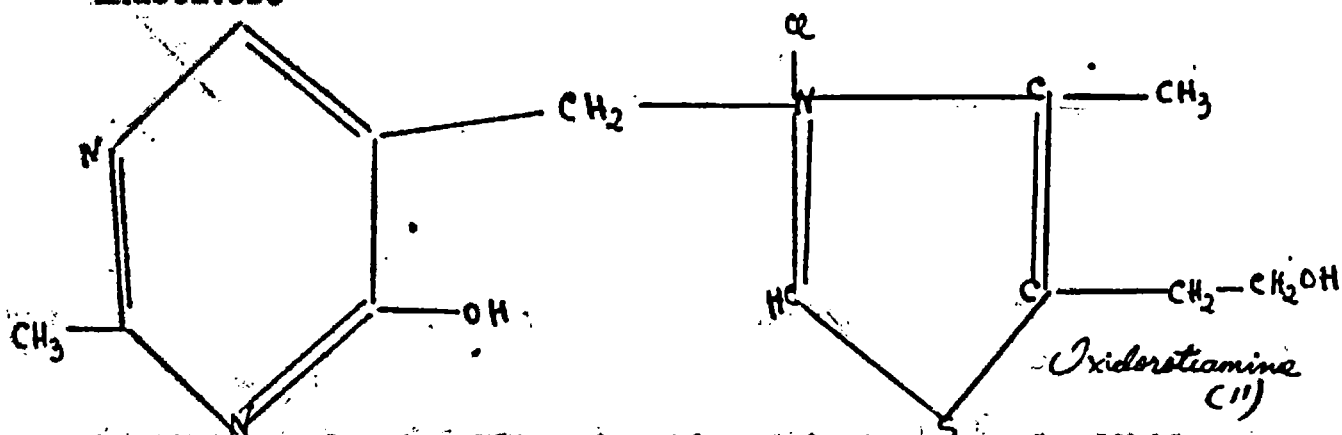
La vitamina B1 bisulfuro (1):



es tan activa como la vitamina B1.

Sin embargo alteraciones estructurales causan desaparición de la acción vitamínica.

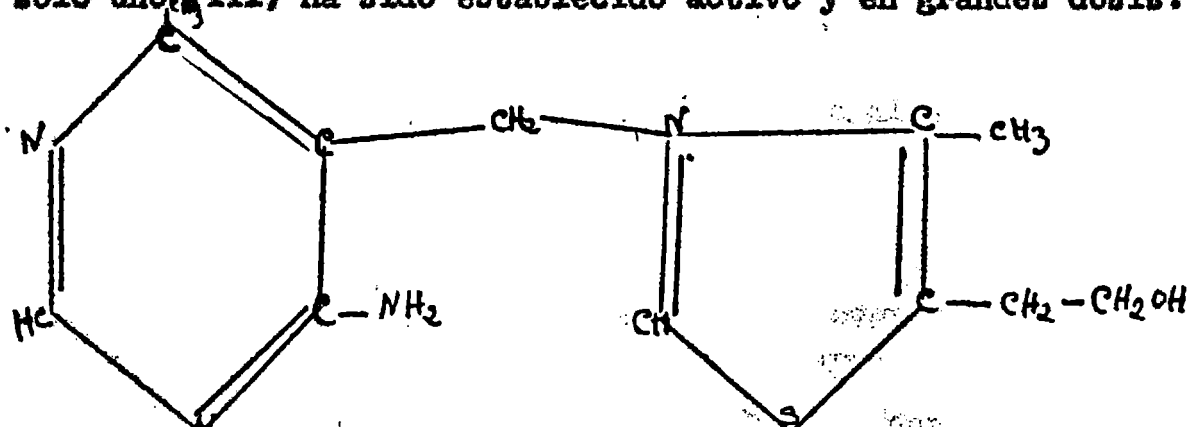
El tiocromo es inactivo (39); la oxiclortiamina (40) y el producto obtenido del partimiento de la vit. B1 (41) y (42) son también inactivos.



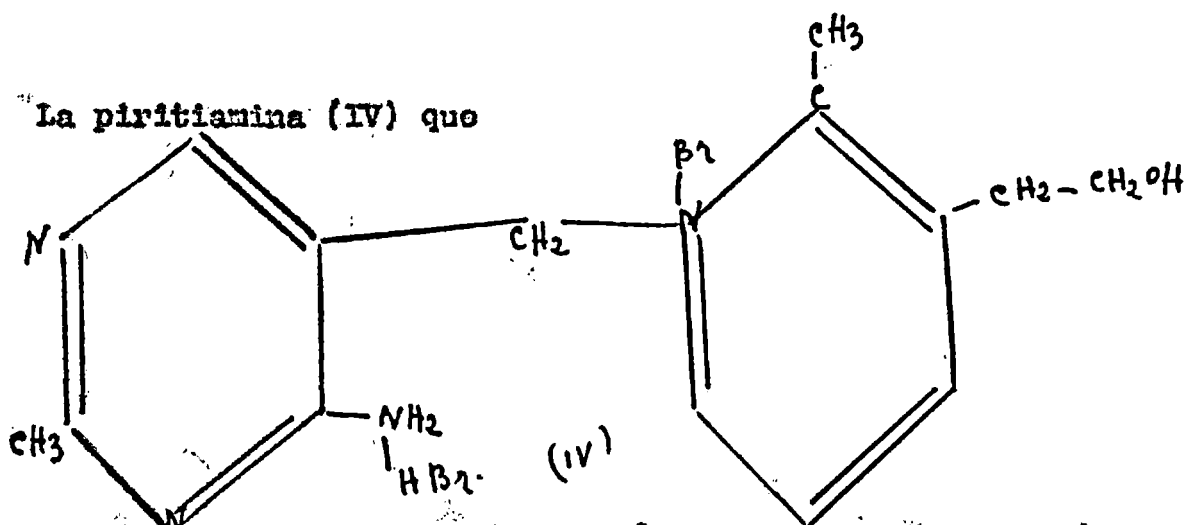
La dihidro vitamina B1 es inactiva, mientras que la dihidro co-carboxilasa es activa.

La polineuritis de las palomas, puede ser curada sin embargo por 4 amino 2 metil 5 bromo metil pirimidina y 4 metil 5 beta hidroxi etil tiazol si son dados simultaneamente.

Una gran cantidad de compuestos han sido preparados sinteticamente (43) con pequeñas diferencias en la estructura vitamínica; sólo uno (III) ha sido establecido activo y en grandes dosis:

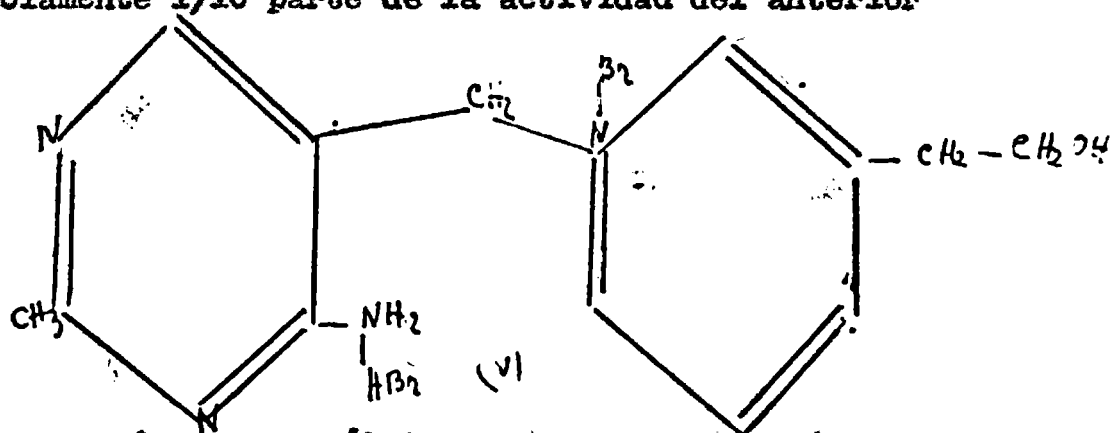


El anillo pirimidínico, el anillo tiazólico y el metileno entre ellos, un no sustituido amino grupo en posición 4 del anillo pirimidínico (43) el 5 hidroxialcali grupo (44) y una posición libre 2 en el núcleo tiazólico son necesarios para la acción vitamínica.



contiene en vez del anillo tiazólico un anillo pirimidínico tiene una actividad 1/26 de la de la B1 (45).

El homólogo (V) tiene un metilo en el anillo pirimidínico y tiene solamente 1/10 parte de la actividad del anterior



La aneurina posee múltiples acciones fisiológicas, pero solo reseñaremos las que ofrezcan importancia desde el punto de vista bioquímico:

- 1) Interviene en el metabolismo glucídico del sistema nervioso central (ver pág. anterior).
- 2) Influye en el metabolismo hídrico (ver pág. anterior)
- 3) Actúa estimulando la secreción de lipasa y tripsina pancreática
- 4) Aumenta fuertemente la diuresis. etc.etc.
- 5) En la fermentación anaeróbica de los carbohidratos, el ácido pirúvico es decarboxilado dando acetaldehído y dióxido de carbono

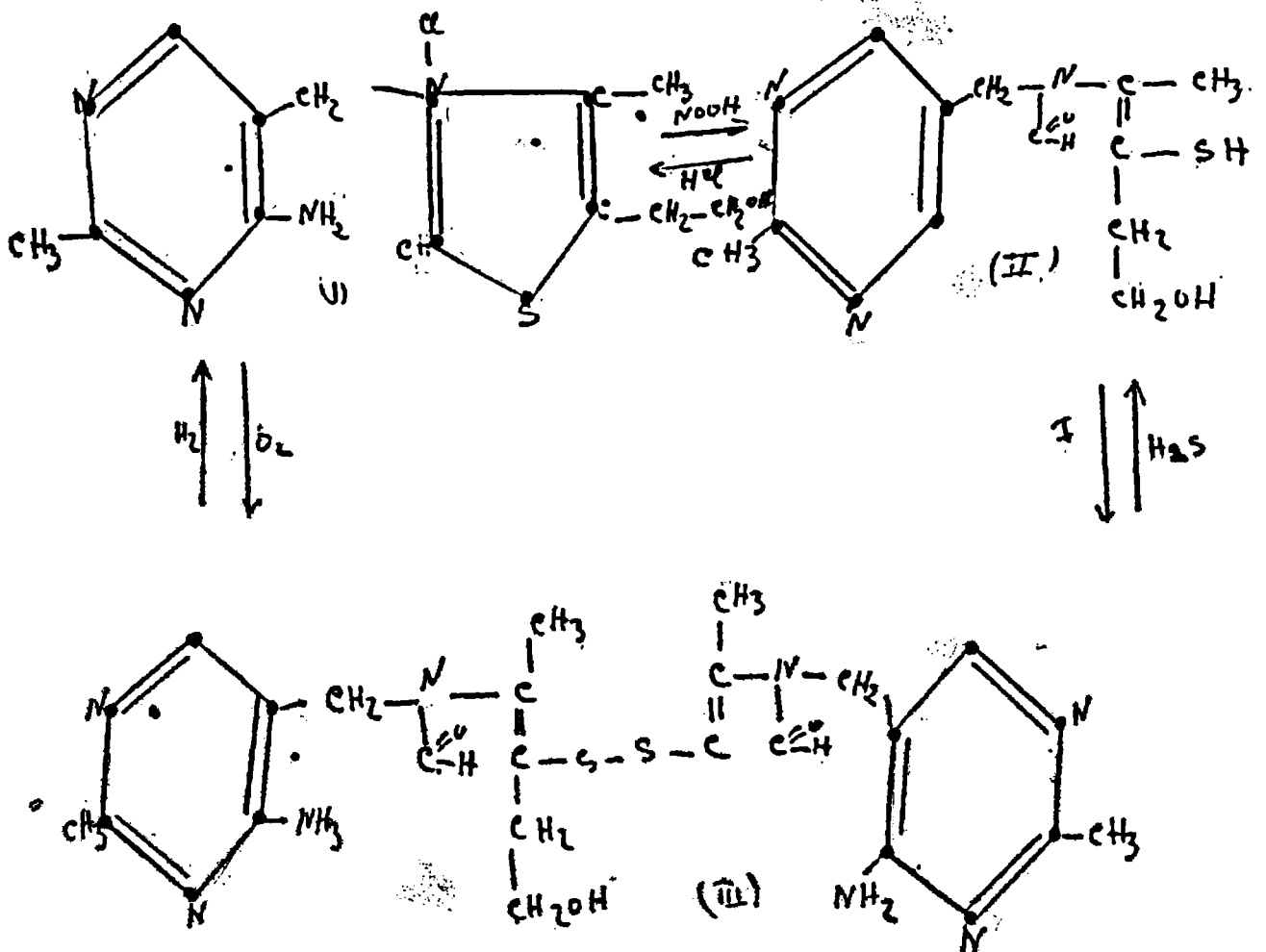
$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{C}^{\text{O}} - \text{COOH} \end{array} \xrightarrow{\text{Vit B}_1 \text{ pirofosfato}} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{C}^{\text{O}} - \text{H} \end{array} + \text{CO}_2$$
 Ha sido demostrado experimentalmente que en un sistema ajustado propiamente la tasa de CO_2 depende de la concentración de vit. B1 pirofosfato (46).

La vitamina B1 toma parte en la oxidación de tejidos de carbohidratos. Puede por eso ser supuesto que la B1 actúa como un compuesto capaz de oxidación y reducción reversible. Este es aparentemente el caso Vit. B1 (I) representa la forma reducida y puede ser oxidada a disulfuro (III).

Esta oxidación ocurre bajo condiciones fisiológicas, por ej. a pH 7,5 con peróxido de H ú oxígeno del aire, pero puede también ser oxidada en sol. alcalina con ioduro.

O de otra manera, el disulfuro puede ser reducido a la forma thiol (II) de vit. B1, por H. hidrógeno sulfurado, glutatión o cisteína y la forma thiol es convertida en tiamina por ácidos (por ej. HCl). En flúidos del cuerpo y tejidos, la reducción aparentemente no para en la etapa del thiol.

El disulfuro muestra la total actividad biológica de la vitamina misma y es alrededor de 5 veces menos tóxico que la vitamina.



Capítulo cuarto
Métodos de valoración

La determinación cuantitativa de la tiamina en los alimentos, órganos y líquidos orgánicos se hace por diferentes métodos, biológicos, bioquímicos y químicos.

Métodos biológicos:

Antes de conocerse la composición química de la tiamina, se usaban exclusivamente los métodos biológicos, que si bien tienen las ventajas de su elevada especificidad, precisión y sensibilidad, tienen el inconveniente del tiempo que requieren para efectuarlos, debiendo además el operador poseer gran habilidad. Los métodos biológicos están basados, ya sea en el efecto que ejerce la tiamina favoreciendo el desarrollo de las plantas y de estimular el desarrollo y prevenir o curar la polineuritis.

1) Test de las plantas (47) (48) (49)

Este test se encuentra basado en la actividad específica de la B1 sobre cultivos de *Phycomyces Blakes*. En condiciones bien determinadas el peso de los microorganismos desarrollados es proporcional a la cantidad de la vitamina B1 presente. Este test es utilizado para determinar la tiamina en la sangre. Sin embargo los resultados no son absolutamente exactos porque según Sinclair la sangre libre de B1 ejerce también un estímulo débil sobre ese desarrollo.

A pesar de ello, si se realiza cuidadosamente, se obtienen buenos resultados para el diagnóstico de una hipovitaminosis B1.

La comprobación de la B1 en la sangre se efectúa así:

Sol. nutritiva: 10 % de glucosa, 0,2 % de asparragina (para las sol. standard 0,4 %) 0,5 % sulfato de magnesio, 1,5 % bifosfato de potasio.

Sol. de ensayo: En un recipiente de Erlenmeyer de 50 cm³ de capacidad, se mezclan 6 cc. de la sol. nutritiva con 3 cc. de sangre

oxalatada (3 mg. de oxalato de potasio en 1 cm³ de sangre), se deja reposar en la heladera durante 12 horas; se añade 0,15 cm³ de NaOH n/10 y se completa con agua a 10 cm³.

Soluciones standard: En un Erlenmeyer de 50 cm³ de capacidad se mezclan 6 cm³ de la sol. nutritiva con cant. crecientes (0,5; 1; 2; 3; 3,5) de B1, en sol. acuosa (1 gama = 10 cm³).

Se calientan ambas soluciones a 107°C 10 minutos; se inoculan 0,2 cm³ de una suspensión de esporos de *Phycomices*, que en un cúbico contiene 1 (más o menos 0,1) millón de gérmenes; el recuento se efectúa en la cámara de Thoma Zeiss. Las soluciones se dejan reposar al oscuro, a la temp. ambiente 10 días. La capa de gérmenes se saca con la pinza, se lava, seca a 110° 2 horas y se determina el peso. El contenido de la sangre en B1 se calcula por intermedio de una curva, confeccionada mediante los resultados obtenidos con las sol. standard.

2) Métodos que utilizan animales:

Los animales usados por los métodos biológicos son: la paloma (y otros pájaros) y la rata. Con palomas el principal método ha sido principalmente el preventivo, mantenimiento del peso y curativos.

Métodos preventivos: Este tipo de método, basado en la prevención de la polineuritis es empleado por la rapidez en la obtención de los resultados. Eijkmann mantiene aves con una dieta de arroz pulido; Funk y otros mantienen a palomas en dietas con arroz pulido o sintéticas y Jansen y Donath usan el arroz de aves.

Este tipo de método determina una estimación de la ración diaria de un material alimenticio particular que es suficiente para prevenir síntomas neuromusculares en aves, cuando se adiciona a la dieta vit. B1 libre.

Igualmente un método recientemente elaborado por Jukes y Heitman (1940) (50).

El test de las palomas es el más usado pero exige mucho tiempo. Esta desventaja se evita haciendolo en forma curativa en la paloma (Kinnorsley y Peters) o en la rata (Smith): animales enfermos de polineuritis por haber sido sometidos a una alimentación con arroz pulido u a otros regimenes carentes de B1 durante 3 a 6 semanas, reciben una sola dosis de la sustancia a comprobar. El peso de la materia inyectada, dividido por el número de los días transcurridos hasta la reaparición de los síntomas polineuríticos, corresponde a una dosis diaria de paloma o bien a una dosis diaria de rata. La primera es de 2 gamas, la dosis rata (unidad Smith) es igual a 6 gamas de vit. B1. El test curativo en palomas es el método biológico más usado en Inglaterra. El test curativo en ratas ha sido aceptado como método standard por la comisión americana de vitaminas. El test curativo de las palomas de Kinnorsley y Peters y Reader usa la desaparición de espasmos y convulsiones tónicas (51). También ha sido utilizado un test profiláctico de palomas.

La Farmacopea de los Estados Unidos recomienda ratas como animales test en métodos curativos. (52).

La deficiencia de la vitamina B1 en ratas produce convulsiones y parálisis de las extremidades inferiores que son curadas por la administración de la vitamina. El test crecimiento de las ratas involucra la determinación de la mínima cantidad de vitamina requerida para el crecimiento y mantenimiento. (53).

Los llamados métodos de estímulos tienen una mera importancia histórica y servían de base para fijar dos patrones de vit. B1 frecuentemente usados en Inglaterra y EE.UU.: la unidad Chase Sherman o la cantidad (54) diaria de vit. B1 requerida por día para producir un aumento de 3 gramos de peso semanal, durante un período de 4 a 8 semanas; y la unidad Chick Roscoe (55) que representa la cantidad diaria de B1 necesaria para producir un aumento

de peso de 10 a 14 gramos semanales durante un período de 5 semanas.

En lo que respecta a la unidad patrón internacional de vit. B1 se halla representada por la actividad de 10 mg. de arcilla ácida activada por contacto con extracto de mondadura de arroz, siendo su comportamiento comparable a la unidad Chick - Roscoe, de modo que la velocidad de crecimiento preferida es de 10 a 14 gramos semanales.

Las ratas deben pesar de 40 a 60 g. y tener de 21 a 28 días de edad. Cowgill recurre al perro pero no es aconsejable por razones económicas.

Williams-Douglas Spies (56) suministran dietas de carbohidratos con un contenido mínimo de vit. B1 a los animales en experiencia hasta llevarlos al borde de la polineuritis, para luego en un momento dado, desarrollar ésta por un breve período de tiempo (2 - 3 días) para facilitar el ensayo de la sustancia.

Peters y colaboradores han usado palomas que presentan como desventaja una tendencia a la cura espontánea de la polineuritis.

Smith prefiere la rata y utiliza animales de unos 69 g. de peso, alimentados con dietas especiales que permitan el desarrollo de la polineuritis y a continuación ensaya la sustancia por vía oral o parenteral. La dosis curativa de aquella debe contener 6 gamas de tiamina por animal y por día (Unidad Smith).

Método de la bradicardia:

Drury, Harris y Mandelely (57) han ensayado sobre ratas el método de la bradicardia, consistente en someter aquellas a dietas deficientes en vit. B1, con lo cual y a medida que progresan hacia un estado polineurítico, se produce bradicardia y suministran la sustancia en ensayo cuando el número de revoluciones cardíacas desciende aproximadamente a 300 - 350 por minuto lo que ocurre en unos 40 días.

Se puede recurrir a la vía oral o parenteral bajo forma de dosis única. Encontrándose vit. B1 el número de revoluciones cardíacas acrece hacia lo normal, siendo la duración del efecto proporcional al tenor de aquella en la sustancia ensayada.

Este método ha sido perfeccionado por Birch y Harris (58); estos autores someten a ratas jóvenes a una dieta basal insuficiente en vit. B1 y después de alrededor de 3 semanas, cuando los animales comienzan a declinar el peso, son tomados electrocardiogramas. Entonces el corazón normal que late de 500 - 550 por minuto tiene caída a alrededor de 350 por minuto. Una sola dosis de la sustancia test es dada. El animal es reemplazado en su jaula y se da la dieta basal y agua como antes. Después de 24 horas se toma un nuevo electrocardiograma. Con una suficientemente grande dosis de vit. B1 el pulso es aumentado. Entonces la disminución gradual del pulso es medida cada 12 horas hasta que alcance el original bajo valor. El aumento en el pulso y el período sobre el cual el aumento dura es proporcional a la dosis dada.

El método de la bradicardia da resultados comparables con aquellos obtenidos por el método de la cura de las convulsiones en ratas y test del crecimiento de ratas. También da valores similares a aquellos dados por el test de las palomas en la cura de las retracciones del corazón. La exactitud del método de la bradicardia debe considerarse con mucha reserva, sin embargo el método es defendido particularmente por autores ingleses. Parade (Stepp, Kühnau y Schroeder) comprobó que una mera reducción de la alimentación de las ratas es suficiente para producir una bradicardia, siendo normal el aporte de tiamina. Esto explicaría en parte el hecho de que las cifras del contenido de vit. B1 en los alimentos, obtenidas por medio del test de la bradicardia, son mucho más elevadas e incluso duplicadas en comparación con las que se obtienen por

medio de otros métodos. Es un inconveniente que para un gran número de alimentos disponemos tan solo de cifras obtenidas con el test de la bradivardia, valores que tienen que reducirse término medio en un 50 %.

Otro método usando pollos como animales de ensayo determina la tasa de crecimiento, producido por la tiamina (59).

Otro test es el indicado por Church (60) quien propone como medida de la potencia anineurítica, un ensayo de la función vestibular en ratas, que consiste en hacer girar éstas en posición horizontal, con la cabeza en el centro de rotación y de este modo se inducen movimientos de los ojos que son prolongados en caso de deficiencia de vit. B1 y se normaliza mediante su administración.

Métodos bioquímicos:

Entre los métodos bioquímicos podemos citar el ensayo catatorulínico (Torulina = vit. B1).

Este test frecuentemente usado (61, 62 y 63) está basado en el aumento del oxígeno tomado, que se observa en solución de lactato como resultado de la adición de vitamina B1.

Al estudiar la potencia de preparados que contenían aneurina, sobre palomas, se observó que el oxígeno sobretomado por trozos de cerebro de aquellas en estado avitaminósico, aumentaba al adicionarle, concentrados de aneurina en solución de lactato, hecho que se atribuyó a un factor de naturaleza catalítica, designándosele con el nombre de "Catatorulínico", si bien existía la certeza que este fuera idéntico a la B1.

Con este motivo se ideó una técnica que consistía en determinar la aneurina presente, teniendo en cuenta dicha sobre toma de oxígeno por trozos de cerebro de palomas (Peters, Raydin y Thompson)

lo que permitía construir una curva que indica la relación entre la dosis de aneurina (gamas por ml. de solución) y sobretoma de oxígeno (miligramos por gramo horario) que no constituye una línea recta, sino una curva de suave pronunciación.

Test de la fermentación de levadura:

El efecto estimulante de la vit. B1 en la fermentación alcohólica ha sido desarrollado en un test cuantitativo (64).

Schultz, Atkin y Frey indican que en la presencia de una conveniente mezcla buffer, cristales de vit. B1 producen una estimulación pronunciada en la tasa de fermentación alcohólica. Por su método original ellos son capaces de estimar la presencia de 0,5 a 4,0 mg. de tiamina.

En este método se mide el volumen gaseoso desprendido en un intervalo de tiempo dado y el valor así obtenido es proporcional a la B1 presente.

Método del crecimiento de cocos:

Knight (65) demuestra que bajo condiciones convenientes, el crecimiento de *Staphylococcus aureus* es proporcional a la cantidad de vitamina B1 presente en el medio. Se determina la B1 sintetizada por el nódulo bacteriano *Rhizobium trifolium*.

West y Wilson han adaptado la observación de Knight a un rápido ensayo biológico aplicable a pequeñas cantidades de ordinarios cultivos medicos (66).

Cocarboxilasa:

La cocarboxilasa puede ser determinada cuantitativamente por la cantidad de anhídrido carbónico producido por descarboxilación de ácido pirúvico por levadura que ha sido liberada de cocarboxilasa en presencia de cantidades máximas de vit. B1 (67).

Métodos químicos

Se han propuesto para la determinación de la tiamina una cantidad de reacciones coloreadas, ninguna de las cuales, sin embargo, es totalmente de suma confianza, ya que la vitamina necesita ser concentrada antes que la determinación pueda ser hecha.

Desde el año 1937 algunos métodos químicos vienen empleándose cada vez más, permitiendo efectuar determinaciones bastante rápidas y exactas del contenido de la vitamina B1 en la orina, heces y diferentes órganos.

Método del tiocromo:

Este método está basado en que la vit. B1 en solución acuosa es oxidada por medio del ferricianuro de potasio a tiocromo, cuya fluorescencia es determinada fotoeléctricamente. (68) (69) (70).

La oxidación se efectúa a pH 10. La intensidad de la fluorescencia es una función de la alcalinidad de la solución y de la cantidad de tiocromo presente. La presencia de un exceso de ferricianuro de potasio destruye el tiocromo rápidamente formado. La irradiación también destruye al tiocromo.

Los resultados obtenidos por este método son concordantes con aquellos obtenidos por el método biológico de la bradicardia. Es preciso sin embargo denotar que solamente la vit. B1 liberada es determinada por este método, ya que solamente ella puede ser extraída por solventes orgánicos. Esta dificultad puede solucionarse digiriendo la muestra por pepsina, seguida de digestión con takadiastasa.

El método original de Jansen ha sido modificado por Conner y Straub (71) por Karrer y Kubli y más recientemente por Hennessey y Ceresedo quienes introdujeron el uso de una zeolita sintética (Decalso) para absorber la tiamina y con eso separarla de las

sustancias que interfieren con la reacción. Ellos emplean un instrumento sensible fotoeléctrico, el fluorómetro de Pfaltz y Bauer para la medida de la fluorescencia.

Generalmente de 3 a 5 gramos de muestra son usados en la determinación. La muestra debe ser finamente pulverizada y representativa del material a ser analizado. En el caso de vegetales frescos es conveniente primero congelar con dióxido de carbono sólido. Con materiales de gran cantidad de grasas puede ser necesario primero extraer una cantidad pesada del material con éter en un extractor de Soxhlet.

La muestra pesada es colocada en un tubo especialmente designado de cerca de 75 cm³ de capacidad, en donde se adicionan 50 cm³ de ác. sulfúrico 0,04 N dando un líquido denso en la relación de cerca de 10 a 1.

El pH 1 o 2 de esta mezcla de extracción es óptimo para la extracción de la vitamina y suficientemente ácido para prevenir su destrucción.

El calor requerido para la extracción puede ser suministrado por un plato eléctrico caliente o baño de agua caliente. Antes del calentamiento la mezcla debe ser agitada para prevenir el carbonizado de la muestra.

Se calienta una hora cerca del punto de ebullición/^{con}agitación continua.

Al término de la extracción cada uno de los agitadores es cuidadosamente lavado con 5 cm³ de agua destilada y los tubos son refrescados colocándolos en agua corriente.

Luego se aumenta el pH a 4 o 5 para obtener optimas condiciones para la hidrólisis enzimática.

Aunque Hennessy y Cerecedo emplean NaOH N 1 para este propósito,

es demostrado que el uso de este reactivo puede conducir a pérdida de tiamina debido al desarrollo de un área local de alta concentración alcalina. Por esto la enzima clarasa, usada para la hidrólisis es preparada en un buffer acetato de sodio - ác. acético, así que la mezcla de extracción, después de la adición de la solución clarasa da el pH deseado.

La solución buffer acetato de sodio-ác. acético (pH 4,5) es preparada por adición de 54,40 cm³ de ácido acético glacial a 66,938 gramos de acetato de sodio anhidro con suficiente agua destilada para obtener una solución de los reactivos y entonces transferir a frasco volumétrico de un litro y llevar a volumen con agua destilada.

Con algunos productos de cereales el pH de la solución durante la hidrólisis enzimática puede exceder 5, si se emplea NaOH para llevar cerca del pH deseado.

En el presente procedimiento, 10 cm³ de una solución al 5 % de clarasa son adicionados a cada tubo de extracción. El contenido de cada tubo es entonces agitado con un agitador de vidrio y el tubo conteniendo la varilla agitadora es transferido a un horno de incubación mantenido a una temperatura de 45°.

Los tubos son incubados por dos horas a esta temperatura con frecuente agitación.

Siguiendo al período de incubación, cada agitador es cuidadosamente lavado con 1 cm³ de agua destilada y los tubos de extracción son enfriados a la temperatura ambiente. Los tubos son entonces centrifugados a alta velocidad hasta que un líquido claro sobrenadante sea obtenido. Una parte alícuota conteniendo aproximadamente 5 mg. de tiamina es entonces pipeteada fuera del líquido sobrenadante en un bécquer conteniendo 5 cm³ de ác. acético al 2 %.

La solución de ác. acético conteniendo la tiamina es calentada justo a ebullición en un plato eléctrico caliente e introducida

en una columna de 5 cm³ de alto y 2 de ancho conteniendo Zeolita sintética (Decalso) activada (72).

El tubo de absorción está unido por medio de un tapón de goma a un frasco Kitasato de 125 cm³ de capacidad. Cuando la sol. conteniendo la B1 alcanza el fondo de la columna Decalso una suave succión es momentaneamente aplicada, para obtener una relación de corriente de aproximadamente 1 cm³ por minuto.

Después que la solución de vitamina ha pasado integramente, el bécquer y la columna son lavados varias veces con agua destilada y los lavados son pasados dentro de la columna.

Se absorbe así el 100 % de la B1 en la columna Decalso.

La vitamina es eluída de la columna por uno de una sol. caliente al 25 % de Cloruro de potasio (25 cm³) (puede usarse una solución de NaCl si la columna Decalso ha sido previamente activada con este reactivo en vez de KCl).

Se separan unos 5 cm³ de este elúido, se oxida con ferricianuro de potasio y se mide en el fluorómetro la fluorescencia del tiocromo. Recientemente (73) la Research Corporation Committee en conjunción con el Comité on Vitamin Fortification of The American Association of Cereal Chemistry, sugieren un procedimiento para la determinación de la vit. B1 que no es sino el método simplificado de Conner y Straub al que nos hemos referido.

Para separar la tiamina de las sustancias que interfieren en el proceso se emplean zeolitas sintéticas, tales como el Decalso, permutita o la Cristalita que absorben la vit. B1. Esta operación se efectúa en los tubos Hennessy o "Base exchange", en donde queda retenida la tiamina, que luego es eluída por el KCl. Se oxida a tiocromo, se extrae con isobutanol y la intensidad de la fluorescencia azul excitada por los rayos ultravioletados de determinada onda, se mide por comparación en un fluorómetro con un standard primario de tiamina de conocido título o con uno secundario de sulfato de quinina.

La reacción del tiocromo ha sido modificada para determinar la tiamina por Tauber (20) de modo que ya no se determina el tiocromo formado por la oxidación de ferricianuro, sino que su equivalente de reducción el ferricianuro de potasio, se somete como azul de Prusia a la lectura colorimétrica. El método es adecuado para materiales biológicos, siendo preciso eliminar previamente las sustancias reductoras.

Ritsert (74) para determinar tiamina en orinas elimina la adsorción previa de aquella con Franconita por hallarla complicada y adopta la observación directa de la fluorescencia con ayuda de la lámpara de Hanau. La solución ensayada se observa frente a la de comparación de contenido en tiocromo conocida y compensa la fluorescencia propia con la adición de isobutanol de fluorescencia clara, procedente de la prueba ciega. Este método ha sido aplicado para determinar la vit. B1 en las heces y órganos animales. Hennessy y Cerecedo (75) adoptan el método de Jansen para estimar la aneurina libre y fosforilada presente en soluciones puras y materiales biológicos practicando con tal fin tres procedimientos. El primero se refiere a soluciones puras de aneurina en cuyo caso se aplica la reacción conocida, debiendo observarse que en la capa acuosa que resta luego de la extracción butanólica, no exista fluorescencia mayor que la que pueda manifestar el ensayo en blanco, el cual consiste en adicionar a un volumen igual del líquido en ensayo todos los reactivos con excepción del ferricianuro de potasio.

Segundo: Utiliza la adsorción de la vitamina B1 con zeolita y posterior elución con el objeto de eliminar las sustancias que interfieren. El sustrato obtenido se remite al ensayo 1º y si la capa acuosa presenta fluorescencia, después de efectuar la extracción isobutanólica (presencia de cocarboxilasa) se somete al ensayo 3º que se aplica a la determinación de la aneurina fosforilada al esta

do de pirofosfato, que transforma en monofosfato mediante adecuada hidrólisis por una fosfatasa extraída del tejido renal.

El líquido obtenido se somete ~~ix~~ al ensayo 1^o o bien se adsorben las sustancias que interfieren según el ensayo 2^{do}.

Otros métodos:

Los métodos de Kinnersley y Peters, de Willstaed y Barany, de Hennesy (76), y de Melnick y Field, el último nombrado usando un reactivo propuesto por Prebluda y Mc Collum, dependen de la formación de un pigmento, presumiblemente formado por la copulación de la vitamina con una amina aromática diazotada. La medida por medio de la colorimetría o fotometría de la cantidad de pigmento producido se hace una medida de la cantidad de tiamina.

Las aminas aromáticas empleadas en estos métodos por aquellos investigadores son: H_2N -sulfánilico, 2-4 dicloro anilina y p-amino acetofenona respectivamente.

Recientemente Emmet, Peacock y Brown han simplificado el procedimiento de Melnick y Field, en la aplicación de ciertos materiales teniendo una mediana alta potencia (77).

Test Azo formaldehído de Kinnersley y Peters:

Este método está basado en que el H_2N -sulfanílico en medio clorhídrico y frente a una solución de nitrito de sodio produce HNO_2 que reacciona sobre aquel formado un derivado diazonio incoloro, el que copula con cuerpos de las serie aromática (con función amínica o fenólica) originando en medio alcalino azoicos coloreados.

Ya que esta reacción ataca al amino grupo 4 del núcleo pirimidico es obvio que una vitamina deaminada o el tiocromo no den esta reacción. (78).

La reacción se efectúa tan solo con la aneurina libre; para la

determinación de la aneurina total es preciso un previo desdoblamiento de la cocarboxilasa a pH 4 con takadiantasa.

Compuestos sintéticos de la misma estructura dan la misma reacción

(79) La presencia de sustancias reductoras interfieren en el desarrollo del color, como trazas de Ni, Co, Hg, Mn, Cd, Sn, Ce, Zn, y Cu por ej.

El uso de acetona en lugar de vitamina B1 da también el mismo color con los reactivos de este método.

La primitiva reacción de Kinnersley y Peters (1934) en la que el color rosado es estabilizado con una gota de formaldehído, es modificada en 1938 por los mismos quienes usaron una muestra en alcohol de 50° en vez de agua, extracción del color con alcohol butílico (sin formol) y tratamiento del extracto con HCl n/200.

Utilizan la observación directa como medio de estimación.

Willstaed y Barany proponen la determinación de la vit. B1 mediante el fotómetro de Pulfrich, utilizan (80) filtro S 50 y miden el color desarrollado por la acción del diazo reactivo en medio alcalino, con la 2 - 4 di cloro anilina.

Deviatnin (4) opera de la siguiente manera: extrae la tiamina con agua caliente, centrifuga, ppta. la vitamina con acetato de mercurio y de cloruro de platino, elimina los glúcidos y otras impurezas por lavajes del ppdo. y por descomposición con H₂S.

Después en un pequeño tubo de ensayo, mezcla 6 cm³ de reactivo (agua 100 cm³, soda N 100 cm³, bicarbonato de sodio 5,76 g., ác. sulfanílico diazotado a 0,5 % 2 cm³, formol a 40 % 3 gotas con 1 cm³ del ext. vitamínico, agita rápidamente y calienta 10 minutos al baño maría a 90 - 95° y hace en seguida la lectura al colorímetro.

Los detalles del método de Kinnersley y Peters se indican en la parte experimental.

Método colorimétrico de Prebluda y Mc Collum: (81).-

La p-amino acetanilida diazotada, p-amino acetofenona o metil p-amino acetofenona dan con vit. B1 un tinte rojo, específico para esta vitamina que puede ser extraído con solventes orgánicos tales como xileno, acetona, isobutanol, etc.

La sensibilidad de esta reacción es aumentada por la presencia de fenol o alcohol etílico o preferiblemente ambos (81), (82), (83). Melnick y Field han propuesto, utilizando como sustrato soluciones puras de aneurina, arrastrar con xileno el ppdo. originado como consecuencia de la reacción producida entre la aneurina y la p-amino acetofenona diazotada, apreciando luego por microcolorimetría la intensidad del color extraído.

La reacción se efectúa con solución de vitamina a pH 7 en medio alcalino, en presencia o no de fenol, dejando en contacto durante 24 horas, antes de proceder a la extracción del azo color.

Los autores señalan un posible error del 10 %.

Para los materiales biológicos es necesario previamente concentrar la aneurina mediante adsorción con permutita y posterior elución con sol. de KCl al 25 % a pH 2.-

Willstaed y Barany sugieren el uso (1938) de 2-4 dicloro benceno cloruro de diazonio, extracción del tono amarillo rojizo con éter y separación por adsorción de hidróxido de calcio.

Este método ha sido modificado cursando el análisis con ác. sulfanílico diazotado, con y sin la presencia de ferricianuro de potasio.

Ya que la vit. B1 no da color bajo estas condiciones y otros amino compuestos que pueden acompañar la tiamina dan color, la diferencia entre el valor del color da una medida de la cantidad de vit. B1 presente.

Los resultados de estos métodos se comparan favorablemente con los valores biológicos.

La vitamina C interfiere en el desarrollo del color (84), a menos que sea primero oxidada, por ejemp., por titulación con yodo o por adición de iones calcio.

Este método es determinado como específico para la vitamina libre, pero no para cocarboxilasa o monofosfato de tiamina y es mostrado que, por hidrólisis enzimática, la vit. libre puede ser liberada y determinada químicamente.

Marensi y Villalonga: (85)

Estos autores efectúan la determinación fotométrica de la tiamina en preparados comerciales, teniendo en cuenta el azo color que ésta origina al ser tratada con la p-nitro anilina diazotada en medio alcalino con ayuda del calor y posterior extracción de aquél con bencol.

Efectúan las lecturas con fotómetro de Pulfrich, filtro S 53 y utilizan cubas de espesor variable.

Los autores expresan que el método cumple la ley de Beer y que se presta para determinaciones comprendidas entre 50 y 600 gamas.

Método gravimétrico de Naiman: (86)

Este método está basado en la producción de un ppdo. anaranjado rojizo de vit. B1 con iodo bismutato de potasio.

Método de Spruyt: (87)

La vitamina B1 es separada como fosfotungstato y reducida con hidrógeno nascente. El color resultante marrón se cree que es proporcional a la cantidad de vitamina presente.

Reacción de Raybin: (88)

La tiamina en una solución de bórex de pH 9,6 forma con 2-6 di bromo quinona cloroimida un color anaranjado que gradualmente decrece en intensidad. El color formado puede ser extraído con cloroformo y medido en un fotómetro.

Otro método es el indicado por Stepp, Kühnau y Schoroeder que consiste en lo siguiente:

La tiamina se oxida por hipioduro absorbiendo 12 átomos de I_2 . Esta reacción es la base del método analítico de Slotta y Neisser. Su empleo se limita a la comprobación de cantidades elevadas de B1 (mayor 0,7 mg.) en sol. puras.

Comprobando la aneurina en medios que contienen sangre hay que tener en cuenta que la hemina y la hematina la destruyen o por lo menos la alteran hasta un grado que ya no se permite una comprobación química (Muller-Schroeder).

Lipmann (89) ha mostrado que un muy distinto color amarillento marrón aparece cuando soluciones al 0,5% - 1,0% de tiamina son reducidas con hidrosulfito.

Tauber (90) ha demostrado que calentando una mezcla de tiamina y para dimetil amino benzaldehido con ác. acético glacial hasta evaporación completa, enfriando y adicionando una gota de ác. acético produce un rojo ladrillo, base de Schiff.

Equivalencia entre las diferentes unidades de tiamina

1 mg. de vit. B1 clorh. cristalino equivale:	(333 unid. internacionales) 166 " curativas Smith (666 " Chase Sherman) 6666 miligramos equival.
--	---

1 unid. internacional equivale:	(0,5 unid. curativa Smith) 2,0 " Chase Sherman (3,0 microgramos vit. B1
---------------------------------	--

1 unid. Smith equivalentes	(6,0 microgramos B1) 2,0 unid. internacionales
----------------------------	---

1 unid. Chase Sherman equivale:	(1,5 microgramas vit. B1) 0,5 unid. internacional
---------------------------------	--

Capítulo quinto

Parte experimental

El trabajo tuvo por objeto determinar la cantidad de tiamina contenida en el pan del comercio y al mismo tiempo en la harina de panificación, para observar si se destruye parte de la vitamina en el proceso de elaboración.

Previamente efectuamos la identificación y ensayos de pureza de la vitamina B1 usada como patrón.

Para ello nos servimos de las siguientes reacciones:

La vit. B1 en solución acuosa ppta. con ác. pícrico, fosfotúngstico, cloruro de mercurio y oro, reactivo de Mayer y por ioduros. En solución alcalina incolora, por el ferricianuro de potasio se colorea en amarillo con fluorescencia azul, por formación de tioromo.

Determinado el punto de fusión éste es de $248 - 250^{\circ}\text{C}$.

Ensayos de pureza: (91)

La vitamina B1 humedecida con ác. sulfúrico y calcinada no deja más de 0,10 por mil de residuo.

Añadiendo a 5 cm^3 de sol. acuosa de vit. B1 al 2 %, 5 cm^3 de solución normal de NaOH y calentando suavemente, los vapores no colorean de azul al papel de tornasol rojo, ni producen coloración con sol. alcalina de ioduro de mercurio y de potasio (sales amoniacales).

Añadiendo a 10 cm^3 de una solución al 1 % de vit. B1 1 cm^3 de ác. clorhídrico diluido y 1 cm^3 de sol. de BaCl al 10 %; no aparece turbidez dentro del término de cinco minutos (sulfatos).

Añadiendo a 10 cm^3 de una sol. al 1 % de vit. B1, dos gotas de HCl y 10 cm^3 de solución de H_2S no se produce ennegrecimiento (metales pesados). Por desecación sobre ác. sulfúrico en el vacío durante 24 horas no pierde más de 5 % de su peso (agua).

Una vez determinada la pureza de la vitamina procedimos a desecarla al vacío sulfúrico durante 24 horas para luego preparar con ella nuestra solución tipo.

Para efectuar nuestras investigaciones aplicamos el proceso de extracción de Conner y Straub (71) y al extracto el método de Kinnersley y Peters (modificado por Samrajó)

La extracción consta de los siguientes capítulos:

a) Preparación de la Permutita:

La Permutita usada debe pasar por las mallas del tamiz nº 60 - 80 y debe ser convertida en sal de potasio.

Su activación y transformación en sal de potasio se realiza así:

a 200 gramos de Permutita se le añaden 2 litros de ác. acético al 3 %. Se agita por 15 minutos y se decanta. Se añade más ácido y después de 5 minutos se decanta otra vez.

Entonces se le añade 1000 cm³ de solución de KCl al 25 % y se agita durante 20 minutos con una varilla de vidrio. Se decanta. Se lava con agua destilada varias veces por decantación. Se repiten los lavados y decantaciones con ác. acético al 3 %. Se filtra en un embudo de Buchner y lava con agua destilada; por último se deja pasar aire y se seca.

b) Preparación de la muestra y extracción de la tiamina:

Se toman

100 gr. de pan o harinas desecadas a peso constante en estufa y se pulveriza finamente.

La muestra pesada es colocada en balón de 2 litros de capacidad en donde se adicionan 1000 cm³ de ácido sulfúrico 0,04 N.

El pH 1 o 2 de esta mezcla de extracción es óptimo para la extracción de la vitamina y suficientemente ácido para prevenir su destrucción. El calor es suministrado por un baño de agua caliente.

Antes de calentar la mezcla se agita para prevenir la carbonización de la muestra. Luego se calienta una hora cerca del punto de ebullición con agitación continua. Al terminar la extracción el agitador es cuidadosamente lavado con 5 cm³ de agua destilada y el balón es refrescado colocándolo en agua corriente.

El pH se eleva a 4,5 para obtener óptimas condiciones para la hidrólisis enzimática, con una solución buffer acetato de sodio-ác. acético. La solución se prepara por adición de 54,40 cm³ de acético glacial a 66,938 de acetato de sodio anhidro y suficiente agua destilada para un litro de solución.

Se adicionan para obtener el pH 200 cm³ de la sol. buffer y 5 g. de takadiastasa para hidrolizar la posible cocarboxilasa a tiamina.

El contenido del balón es entonces agitado con una varilla agitadora de vidrio y se incuba por dos horas a 45 - 55° con frecuente agitación. Siguiendo a este período de incubación, el agitador es cuidadosamente lavado con 1 cm³ de agua destilada y el balón es enfriado a la temperatura ambiente; se deja decantar hasta que un líquido claro sobrenadante sea obtenido. Ese líquido se decanta con todo cuidado y se coloca en balón de Engler con 50 cm³ de ác. acético al 2 %. Se concentra al vacío a unos 50 cm³ y se introducen en una columna de 5 cm³ de alto y 2 de ancho conteniendo la Permutita activada (92).

c) Absorción de la tiamina:

La tiamina en la solución ácida es selectivamente retenida en la columna de Permutita que se halla en el tubo de absorción, mientras que diversas impurezas pasan a través de ella.

El tubo de absorción está unido por medio de un tapón de goma a un frasco Kitasato de 125 cm³ de capacidad. Cuando la solución conteniendo la B1 alcanza el fondo de la columna una suave succión es

momentaneamente aplicada para obtener una relación de corriente de aproximadamente 1 cm^3 por minuto.

Después que la sol. de BI ha pasado integramente, el bécquer y la columna son lavados varias veces con agua destilada y los lavados son pasados dentro de la columna.

Se absorbe así el 100 % de la BI en la columna de Permutita.

Después de ello se corre aire a través del tubo durante un minuto.

d) Liberación de la tiamina:

Para extraer la tiamina de la permutita se deja pasar 25 cm^3 de sol. ácida de KCl caliente en dos porciones. Se recoge el líquido en un frasco de 25 cm^3 y se completa a la marca añadiendo más sol. ácida al tubo de absorción. La tiamina pasa totalmente en el eluido que es el filtrado de la sol. ácida de KCl.

Con el extracto obtenido se aplica el método de Kimmersley y Peters. Los 25 cm^3 de sol. ácida de KCl que contienen la vit. BI se concentran al vacío a 5 cm^3 .

En el método de Kimmersley y Peters cuyos fundamentos ya los hemos indicado en el capítulo anterior utilizamos los siguientes reactivos:

a) Solución de ácido sulfanílico: se obtiene disolviendo 4,5 gramos de ácido sulfanílico en 45 ml. de HCl al 37 %, luego se lleva a 500 ml. (93).

b) Solución de Nitrito de sodio: Se obtiene disolviendo 25 gramos de Nitrito de sodio puro en agua destilada, llevando a 500 ml.

c) Solución de ácido p-diázo benceno sulfónico: En un balón aforado de 50 ml. se miden 1 ml. de ácido sulfanílico en sol. (a) y 1 ml. de sol. de nitrito de sodio. Se inmerge en un baño de hielo 5 minutos. Se agrega 6 ml. de la solución de nitrito de sodio; se mezcla bien por rotación y se deja en el baño de hielo

otros 5 minutos. Se completa con agua destilada a 50 ml. y se deja en el baño de hielo, donde se conserva.

Hank y Koesler (loc.cit.) aconsejan no usar este reactivo por lo menos hasta 15 minutos después de su preparación. Este reactivo debe prepararse diariamente.

d) Reactivo alcalino de Kinnersley y Peters:

Se prepara con: 100 ml. de NaOH N
5,76 g. de Bicarbonato de sodio
100 ml. de agua destilada

e) Solución de formaldehído.

f) Solución tipo de tiamina: Se prepara desecando tiamina 24 horas sobre vacío sulfúrico, desecación que se efectúa al abrigo de la luz, para evitar su posible alteración.

Se pesan 10 mg., se disuelven en agua destilada, llevándose a 100 ml., de modo que cada ml. = 100 gamas de tiamina.

En un principio Kinnersley y Peters usaban la siguiente técnica experimental:

0,5 cm³ de ácido sulfanílico diazotado se adicionan a 1,25 ml. del reactivo alcalino y después de un minuto, una gota (0,03 ml.) de formol al 40 % y en seguida 0,1 a 0,3 ml. de la sol. de tiamina a pH mayor que 4.

Los autores estiman el color rosado que aparece lentamente, después de los 30 minutos, en que ya permanece constante, a simple vista o por colorímetro.

En 1938 modifican la técnica en la siguiente forma: A 0,1 - 0,3 ml. de una solución que contenga 10 a 20 gamas de tiamina y etanol al 30 % (reemplazan el formol por etanol al 30 %), se agrega después de un minuto, una mezcla de 1,25 ml. del reactivo alcalino y 0,5 de ácido sulfanílico diazotado, dejando en reposo durante 2 horas. Luego extraen el azo color dos veces con 2 ml. de butanol, combinan los extractos butanólicos y extraen con 2 ml. de HCl n/200 y luego con 1 ml.

La fase ácido clorhídrico se separa, se le agrega igual volumen de etanol y la solución obtenida se compara con patrones de aneurina igualmente tratados.

Nosotros adoptamos para nuestras experiencias la técnica propuesta por Gammaj6 en su tesis presentada en 1942 para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Farmacia, obteniendo como veremos óptimos resultados.

Técnica realizada:

Del extracto obtenido anteriormente (5 ml.) tomamos 1 ml. A ese 1 ml. de vit. a pH 6,5, se le adicionan XX gotas (aproximadamente 0,35 ml.) de etanol a 95%. Después de 30 segundos de contacto se le agregan 0,75 ml. del diazo reactivo. Se deja en contacto 15 segundos y finalmente se adiciona 1 ml. del reactivo alcalino de Kimmersley y Peters.

Aparece un color naranja que vira rápidamente a un rosa violado y luego de 10 a 15 minutos permanece constante.

Las lecturas se realizan con fotómetro de Pulfrich, con cubas de 0,5 cm y filtro S 50 (nº 3). El color permanece estable por lo menos durante 24 horas.

En la cuba testigo colocamos el producto de la reacción en blanco, que no origina azo color.

Cumplimiento de la ley de Lambert y Beer.

Realizamos lecturas con escala de tiamina desde 10 hasta 100 gamas, se efectuaron de cada tubo 10 lecturas (5 a la derecha y 5 a la izquierda) obteniéndose al final una representación gráfica satisfactoria que mostraba el buen comportamiento general de la reacción.

Tubo n° 1: A $0,10 \text{ cm}^3$ de solución de tiamina (10 gamas), se agregan XX gotas de etanol a 95%, prosiguiendo según técnica.

Tubo n° 2: Con $0,20 \text{ cm}^3$ de solución tiamina y prosiguiendo igual.

Tubos subsiguientes: Con 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90; y 1 cm^3 , prosiguiendo según técnica indicada.

Después de 10 - 15 minutos se realizan las lecturas con fotómetro de Pulfrich usando cubas de $0,5 \text{ cm}^3$ y filtro S 50 (n° 3). En la cuba testigo se coloca agua destilada.

Lecturas efectuadas:

Promedio de transparencias:

Tubo n°	1 - 10 gamas	- T =	77
" "	2 - 20 "	- T =	61,5
" "	3 - 30 "	- T =	49,4
" "	4 - 40 "	- T =	39,4
" "	5 - 50 "	- T =	31,3
" "	6 - 60 "	- T =	24,7
" "	7 - 70 "	- T =	19,6
" "	8 - 80 "	- T =	15,5
" "	9 - 90 "	- T =	12
" "	10 - 100 "	- T =	9,4

Siendo $K = E/l$, tenemos los siguientes promedios de coeficientes de extinción:

Tubo n°	1 - 10 gamas	- K =	0,228
" "	2 - 20 "	- K =	0,423
" "	3 - 30 "	- K =	0,608
" "	4 - 40 "	- K =	0,810
" "	5 - 50 "	- K =	1,010

Tubo n°	6	→	60	gamas	-	K = 1,215
"	"		7	-	70	" - K = 1,416
"	"		8	-	80	" - K = 1,620
"	"		9	-	90	" - K = 1,840
"	"		10	→	100	" - K = 2,054

Teniendo en cuenta que: $E = \alpha \cdot l \cdot c$

Siendo E = extinción

α = coeficiente específico de extinción

l = espesor de capa

c = concentración

deducimos que $\alpha = E/c \cdot l$ y como E/l es el coeficiente de extinción K tenemos que $\alpha = K/c$

De esto resulta que para:

10 gamas	$\alpha = \frac{0,228}{10}$	= 0,0228
20 gamas	$\alpha = \frac{0,423}{20}$	= 0,0211
30 gamas	$\alpha = \frac{0,608}{30}$	= 0,0202
40 gamas	$\alpha = \frac{0,810}{40}$	= 0,0202
50 gamas	$\alpha = \frac{1,010}{50}$	= 0,0202
60 gamas	$\alpha = \frac{1,215}{60}$	= 0,0202
70 gamas	$\alpha = \frac{1,416}{70}$	= 0,0202
80 gamas	$\alpha = \frac{1,620}{80}$	= 0,0202
90 gamas	$\alpha = \frac{1,840}{90}$	= 0,0204
100 gamas	$\alpha = \frac{2,054}{100}$	= 0,02054

Hallamos el promedio de alfa, sumando y dividiendo por 10 y obtenemos el valor promedio de 0,0206, este valor nos permitirá construir nuestra curva teórica, dada uno de cuyos puntos se halla multiplicando a este factor por la concentración respectiva.

10 gamas	=	0,0206	x	10	=	0,206
20 gamas	=	0,0206	x	20	=	0,412
30 gamas	=	0,0206	x	30	=	0,618
40 gamas	=	0,0206	x	40	=	0,824
50 gamas	=	0,0206	x	50	=	1,030
60 gamas	=	0,0206	x	60	=	1,236
70 gamas	=	0,0206	x	70	=	1,442
80 gamas	=	0,0206	x	80	=	1,648
90 gamas	=	0,0206	x	90	=	1,854
100 gamas	=	0,0206	x	100	=	2,06

Representamos estos valores en un sistema de coordenadas, fijando los valores de las concentraciones sobre eje de las abscisas y los valores leídos sobre las ordenadas.

La curva obtenida es una recta que pasa por el origen.

Marcando en el gráfico con crucesitas los valores obtenidos, observamos que ellos se alejan poco de la curva o bien coinciden con ella. Para efectuar la determinación de la concentración en vitamina de una determinada solución, el cálculo puede efectuarse mediante el trazado de la curva de titulación; para ello se determina un punto de cualquiera concentración (igual al producto de la concentración por alfa), se determina dicho punto, y se traza la curva que pasa por el origen.

Efectuada la reacción, se determina el K, se busca su valor en

las ordenadas y una vez hallado, se traza una paralela al eje de las abscisas hasta cortar a la curva. Se baja la ordenada y el punto donde corta al eje de las abscisas nos da directamente la cantidad de vitamina en gamas para la muestra tomada.

Puede evitarse la construcción de la curva, teniendo en cuenta que:

$E = \text{alfa} \cdot c \cdot l$ de donde despejando c tenemos:

$$c = \frac{E}{\alpha l} = E \times \frac{1}{\alpha l}$$

Vale decir que realizando la operación $\frac{1}{\alpha l}$ tenemos

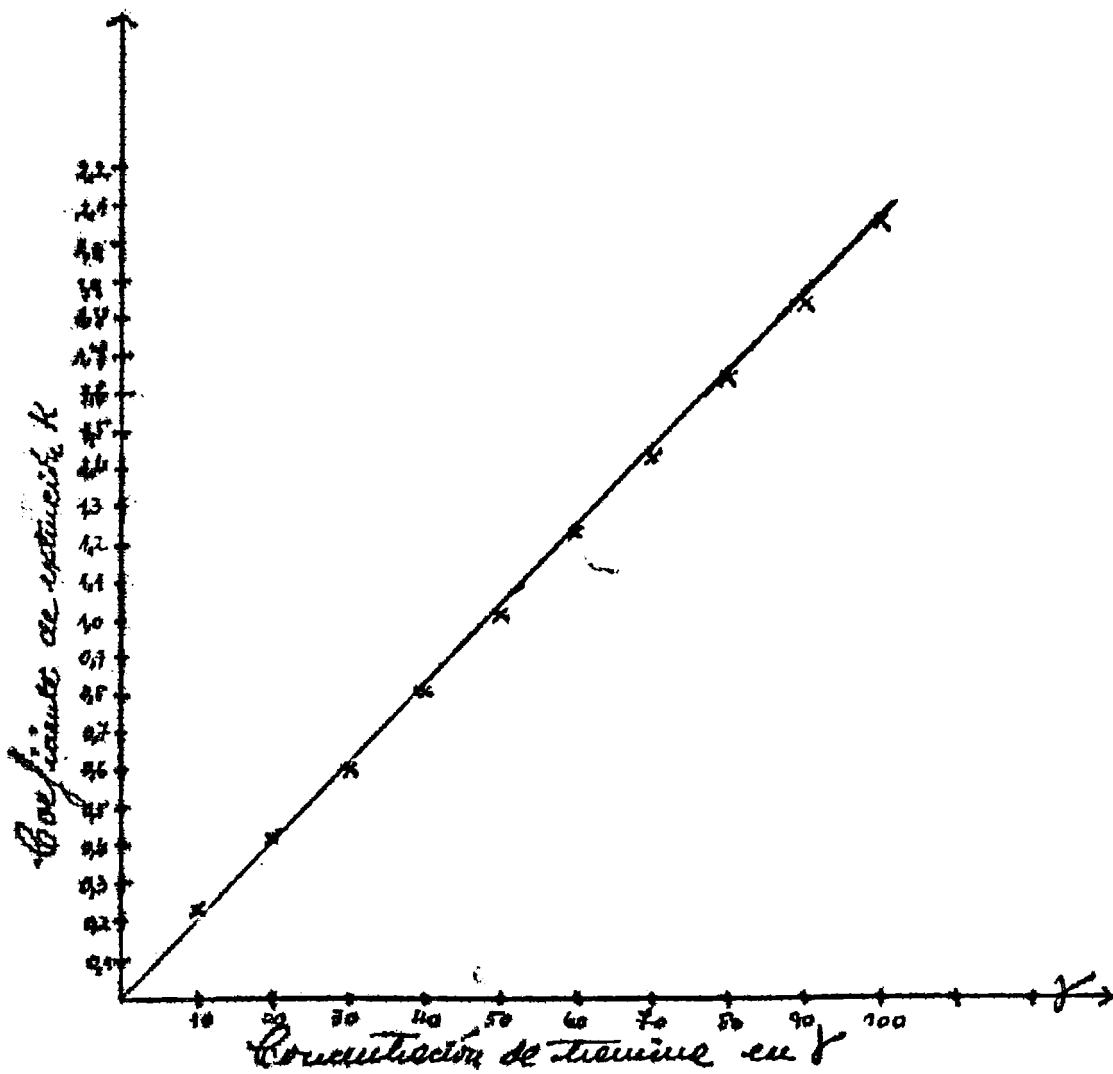
$$c = E \times \frac{1}{\alpha 0,5} = E \times \frac{1}{0,0206 \times 0,5} = \underline{E \times 97,08}$$

ó sea: $c = E \times 97,08$

Basta pues determinar la extinción y multiplicarla por el factor 97,08 para hallar la concentración de la solución ensayada.

Linea Llena = Curva teorica

20 puntos donde con los coef.
de extinción en la exp. realizada. —



Observado que el método de Kinnersley y Peters cumple la ley de Lambert y Beer procedimos a efectuar ensayos de recuperación, agregando a una harina de la cual se conoce la cantidad de tiamina, una cierta cantidad de ésta.

Para ello procedimos de la siguiente manera:

Tomamos una harina, determinamos por el método antes indicado la cantidad de tiamina y encontramos el valor de 46 gamas %.

Del extracto de 5 cm³ obtenido (46 gamas) tomamos 1 (ún) cm³ (9,20 gamas); a ese 1 cm³ le agregamos 0,1 cm³ de sol. tipo de tiamina (10 gamas) de modo que ahora tenemos 19,20 gamas.

Practicamos la reacción de acuerdo a técnica y llegamos a obtener el valor promedio de transparencia de 63 (lecturas: 63,62,64,65).

Para esa transparencia la corresponde una extinción de 0,201 de modo que multiplicando la extinción por el valor 97,08

$$0,201 \times 97,08 = 19,51$$

19,51 son las gamas determinadas, si a ese valor le restamos las gamas primitivas del líquido (9,20) obtenemos el valor de 10,31 que son las gamas recuperadas.

$$\% \text{ recuperado} = 103 \%$$

Luego a 1 cm³ le agregamos 0,2 cm³ de sol. tipo de tiamina (20 gamas), de modo que ahora tengo en total 29,20 gamas.

Practicando la reacción de acuerdo a técnica obtenemos las siguientes lecturas de transparencias: 503- 50 = 50 = 50 = 50; Promedio: 50

Extinción: 0,301

$$0,301 \times 97,08 = 29,22 \text{ gamas}$$

$$29,22 - 9,20 = 20,02 \text{ gamas recuperadas}$$

$$\% \text{ recuperado} = 100,1 \%$$

Luego a 1 cm³ le agregamos 0,5 cm³ de sol. tipo de vit. B1 (50 gamas) de modo que tengo ahora en total 59,20 gamas.

Promedio de transparencias: 24,2

Extinción: 0,616

$$0,616 \times 97,08 = 59,80 \text{ gamas}$$

$$59,80 - 9,20 = 50,60 \text{ gamas recuperadas}$$

$$\% \text{ recuperado: } 101,2 \%$$

Agrego luego a 1 cm^3 , $0,7 \text{ cm}^3$ de sol. tipo de tiamina (70 gamas),
teniendo entonces 79,20 gamas.

Promedio de transparencias: 15

Extinción: 0,824

$$0,824 \times 97,08 = 79,99$$

$$79,99 - 9,20 = 70,79 \text{ gamas recuperadas}$$

$$\% \text{ recuperado: } 101,12 \%$$

Resumen:

<u>Agregado</u>	<u>Determinado</u>	<u>Recuperado</u>	<u>% recuperado</u>
10 gamas	19,51	10,31	103 %
20 gamas	29,22	20,02	100,1 %
50 gamas	59,80	50,60	101,2 %
70 gamas	79,99	70,79	101,12 %

Capítulo sexto

Valores obtenidos

Muestra nº 1:

H a r i n a: Se trabajó con 100 gramos de harina. Del extracto final de 5 cm³ se tomaron 1 cm³. Se siguió la técnica indicada en el capítulo anterior y se leyeron las siguientes transparencias:

80,5 - 81,5 - 81 - 81

Promedio. Transparencia: 81

Extinción: 0,092

$0,092 \times 97,08 = 8,93$

O sea que se han obtenido 8,93 gamas en 1 cm³, luego en los 5 cm³ correspondientes a los 100 gramos de harina tenemos 44,65 gamas de tiamina.

P a n: Se trabajó al mismo tiempo con pan preparado con esa harina; se siguió igual técnica y se leyeron las siguientes transparencias: 82 - 82 - 81 - 81,5

Promedio: Transparencias: 81,6

Extinción: 0,088

$0,088 \times 97,08 = 8,54$ gamas

$8,54 \times 5 = 42,70$ gamas de tiamina.

M u e s t r a nº 2:

H a r i n a: Se trabajó con 100 gramos de harina y se procedió en idénticas condiciones que la muestra anterior. Se leyeron las siguientes transparencias: 78 - 77,8 - 77,8 - 78,4

Promedio. Transparencia: 78

Extinción: 0,108

$0,108 \times 97,08 = 10,48$

$10,48 \times 5 = 52,40$ gamas de tiamina.

P a n: Se trabajó al mismo tiempo con pan preparado de esa harina; se siguió igual técnica y se obtuvo los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 80,2

Extinción: 0,096

$$0,096 \times 97,08 = 9,31$$

$$9,31 \times 5 = 46,55 \text{ gamas de tiamina.}$$

M u e s t r a n° 3:

Harina: Promedio. Transparencia: 80,5

Extinción: 0,094

$$0,094 \times 97,08 = 9,12$$

$$9,12 \times 5 = 45,6 \text{ gamas de tiamina.}$$

H a n: Promedio. Transparencia: 82,4

Extinción: 0,084

$$0,084 \times 97,08 = 8,15$$

$$8,15 \times 5 = 40,75 \text{ gamas de tiamina}$$

M u e s t r a n° 4:

Harina: Promedio. Transparencia: 75,8

Extinción: 0,120

$$0,120 \times 97,08 = 11,64$$

$$11,64 \times 5 = 58,20 \text{ gamas de tiamina.}$$

P a n: Promedio. Transparencia: 77,8

Extinción: 0,107

$$0,107 \times 97,08 = 10,38756$$

$$10,38 \times 5 = 51,90 \text{ gamas de tiamina.}$$

Muestra nº 5

Harina: Promedio. Transparencia: 80,5

Extinción: 0,094

$$0,094 \times 97,08 = 9,12$$

$$9,12 \times 5 = 45,60 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 82,6

Extinción: 0,083

$$0,083 \times 97,08 = 8,05$$

$$8,05 \times 5 = 40,25 \text{ gamas } \%$$

Muestra nº 6

Harina: Promedio. Transparencia: 77

Extinción: 0,114

$$0,114 \times 97,08 = 11,06$$

$$11,06 \times 5 = 55,30 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 78,8

Extinción: 0,103

$$0,103 \times 97,08 = 9,999$$

$$9,999 \times 5 = 49,995 \text{ gamas por ciento}$$

Muestra nº 7

Harina: Promedio. Transparencia: 76

Extinción: 0,119

$$0,119 \times 97,08 = 11,55$$

$$11,55 \times 5 = 57,75 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 78,5

Extinción: 0,105

$$0,105 \times 97,08 = 10,19$$

$$10,19 \times 5 = 50,95 \text{ gamas } \%$$

Muestra nº 8

Harina: Promedio. Transparencia: 83,2

Extinción: 0,080

$$0,080 \times 97,08 = 7,56$$

$$7,56 \times 5 = 37,80 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 84,4

Extinción: 0,074

$$0,074 \times 97,08 = 7,18$$

$$7,18 \times 5 = 35,90 \text{ gamas } \%$$

Muestra nº 9

Harina: Promedio. Transparencia: 75,7

Extinción: 0,121

$$0,121 \times 97,08 = 11,74$$

$$11,74 \times 5 = 58,70 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 77,5

Extinción: 0,111

$$0,111 \times 97,08 = 10,77$$

$$10,77 \times 5 = 53,85 \text{ gamas } \%$$

Muestra nº 10

Harina: Promedio. Transparencia: 75,6

Extinción: 0,122

$$0,122 \times 97,08 = 11,84$$

$$11,84 \times 5 = 59,20 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 76,9

Extinción: 0,115

$$0,115 \times 97,08 = 11,16$$

$$11,16 \times 5 = 55,80 \text{ gamas } \%$$

Muestra nº 11

Harina: Promedio. Transparencia: 74

Extinción: 0,131

$$0,131 \times 97,08 = 12,71$$

$$12,71 \times 5 = 63,55 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 75,9

Extinción: 0,120

$$0,120 \times 97,08 = 11,64$$

$$11,64 \times 5 = 58,20 \text{ gamas } \%$$

Muestra nº 12

Harina: Promedio. Transparencia: 76,2

Extinción: 0,118

$$0,118 \times 97,08 = 11,45$$

$$11,45 \times 5 = 57,25 \text{ gamas } \%$$

Pan: Promedio. Transparencia: 78

Extinción: 0,108

$$0,108 \times 97,08 = 10,48$$

$$10,48 \times 5 = 52,40 \text{ gamas } \%$$

Se efectuaron también ensayos con pan de tipo integral, siguiendo exactamente la misma técnica que para pan blanco.

Muestra nº 1

Pan "Vitagran" Transparencia: 32,4

Extinción: 0,490

$$0,490 \times 97,08 = 47,56$$

$$47,56 \times 5 = 237,80 \text{ gamas de tiamina en 100 g. de pan.}$$

Muestra nº 2

Transparencia: 40,5

Extinción: 0,393

$$0,393 \times 97,08 = 38,15$$

$$38,15 \times 5 = 196,75 \text{ gamas de tiamina en 100 g. de pan}$$

Muestra nº 3

Transparencia: 31,2

Extinción: 0,506

$$0,506 \times 97,08 = 49,12$$

$$49,12 \times 5 = 245,60 \text{ gamas } \%$$

Muestra nº 4

Transparencia: 33,8

Extinción: 0,471

$$0,471 \times 97,08 = 45,72$$

$$45,72 \times 5 = 228,60 \text{ gamas de tiamina por ciento}$$

Ensayos con pan "Dietis"

También se efectuaron distintos ensayos con pan "Dietis", siguiendo la misma técnica de extracción y determinación, no pudiéndose encontrar en ninguno de esos ensayos vitamina B1.

Con respecto a la nicotánida (factor PP) solamente se encontraron vestigios.

De esto se deduce la necesidad imperiosa que tienen los diabéticos de que a su pan se le añadan esos factores tan imprescindibles para su vida.

Influencia del bromato de potasio utilizado en la panificación sobre la tiamina (vit. B1) contenida en el pan.

Jorgensen en un trabajo reciente (comentario en Chemical and Engineering News, 1278, X, 1946), ha probado que el efecto bromato es debido a la acción inhibidora que los bromatos ejercen sobre las proteinasas de la harina que han sido activadas por las levaduras.

Nosotros con el objeto de determinar la influencia del agregado de bromato de potasio en la elaboración del pan sobre el contenido de tiamina, agregamos a una harina de la cual previamente determinamos su riqueza en dicha vitamina, una cantidad de bromato de potasio de 4 gramos en 70 Kg. de harina.

Para ello tomamos una harina de panificación adquirida en la prov. de Buenos Aires; determinamos por el proceso antes indicado la cantidad de tiamina, repetimos varias veces la determinación y obtuvimos un valor promedio de 52,40 gamas %.

A 7 Kg. de esa harina le agregamos 0,40 gramos de bromato de potasio, se mezcló bien y solicitamos a una panadería preparase pan con esa harina. Con el pan obtenido procedimos a determinar el contenido de tiamina; se efectuó la extracción según técnica, y del extracto final de 5 cm³ se tomó 1 cm³ con el cual se trabajó.

Transparencias: 82,7 - 83 - 83,5 - 82,8-

Promedio. Transparencia: 83

Extinción: 0,081

$$0,081 \times 97,08 = 7,86$$

$$7,86 \times 5 = 39,25 \text{ gamas de tiamina en } 100 \text{ g. de pan}$$

La pérdida en tiamina de esa harina al efectuar la panificación es ya de por sí la siguiente: 52,40 - 46,55 = 5,85 gamas o sea una pérdida del 11,16 %. La pérdida total es de 13,15 gamas o sea un 25,09 %, de modo que la pérdida en tiamina por el agregado de bromato es en esta muestra de un 13,93 %.

Determinación nº 2:

Harina de contenido en tiamina: 45,6 gamas %

A 7 Kg. de esa harina le agregamos 0,40 g. de bromato de potasio, se mezcló bien y se hizo preparar pan.

En el pan se efectuó extracción de tiamina y en el extracto final se hizo la determinación según técnica obteniéndose los siguientes resultados:

Promedio. Transparencia: 85

Extinción: 0,071

$$0,071 \times 97,08 = 6,89$$

$$6,89 \times 5 = 34,46 \text{ gamas de tiamina \%}$$

La pérdida total es en esta determinación de 11,14 gamas o sea de un 24,34 %.

Determinación nº 3:

Harina de contenido en tiamina: 58,20 gamas %

Siguiendo la misma técnica anterior se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 81,5

Extinción: 0,089

$$0,089 \times 97,08 = 8,64$$

$$8,64 \times 5 = 43,20 \text{ gamas de B1 \%}$$

La pérdida total es en esta muestra de 15 gamas o sea de un 25,7 %

Determinación nº 4:

Harina de contenido en tiamina: 44,65 gamas %

Siguiendo igual técnica se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 85,5

Extinción: 0,069

$$0,069 \times 97,08 = 6,69$$

$$6,69 \times 5 = 33,45 \text{ gamas \%}$$

La pérdida total es de 11,20 gamas o sea de un 25,08 %

Determinación nº 5:

Harina de contenido en tiamina de 63,55 gamas %.

Se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 79,8

Extinción: 0,098

$$0,098 \times 97,08 = 9,51$$

$$9,51 \times 5 = 47,55 \text{ gamas \%}$$

La pérdida total es de 16 gamas o sea de un 25,1 %.

Determinación nº 6:

Harina de contenido en tiamina 47,5 gamas %

Se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 84,8

Extinción: 0,072

$$0,072 \times 97,08 = 6,98$$

$$6,98 \times 5 = 34,90 \text{ gamas \%}$$

La pérdida total es de 12,6 gamas o sea de un 26,5 %.

Determinación nº 7:

Harina de contenido en tiamina de 52,60 gamas %

Se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 83

Extinción: 0,081

$$0,081 \times 97,08 = 7,86$$

$$7,86 \times 5 = 39,30 \text{ gamas \%}$$

La pérdida total es 13,30 gamas o sea de un 25,2 %

Determinación nº 8:

Harina de contenido en tiamina de 51,6 gamas %.

Se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 82,2

Extinción: 0,085

$$0,085 \times 97,08 = 8,25$$

$$8,25 \times 5 = 41,25$$

La pérdida total es de 13,4 gamas o sea de 24,5 %

Determinación nº 9:

Harina de contenido en tiamina de 50,25 gamas %.

Se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 84

Extinción: 0,076

$$0,076 \times 97,08 = 7,37$$

$$7,37 \times 5 = 36,85 \text{ gamas \%}$$

La pérdida total es de 13,40 gamas o sea de un 26,66 %

Determinación nº 10:

Harina de contenido en tiamina de 53,25 gamas %

Se obtuvieron los siguientes valores:

Promedio. Transparencia: 83,2

Extinción: 0,080

$$0,080 \times 97,08 = 7,76$$

$$7,76 \times 5 = 38,80 \text{ gamas \%}$$

La pérdida total es de 14,35 gamas o sea de un 26,9 %

Capítulo séptimo

Conclusiones

1.- La cantidad de tiamina en la harina de panificación oscila entre 40 y 50 gamas%, habiéndose obtenido como valores extremos 37,80 gamas % en una muestra y 63,55 gamas % en otra.

2.- La cantidad de tiamina en el pan blanco oscila aproximadamente entre los mismos valores, notándose una disminución en cada muestra de un 6 a un 11,7 %, lo cual indica una leve pérdida de tiamina en el proceso de panificación.

3.- En el pan denominado integral obtuvimos valores que oscilan entre 245,60 gamas % a 196,75 gamas %, lo cual corrobora que dicha vitamina se encuentra preferentemente en el salvado del trigo.

4.- En el pan denominado Dietis no hemos encontrado absolutamente nada de tiamina, y solamente vestigios de ácido nicotínico.

5.- De las experiencias efectuadas con el objeto de determinar la influencia del agregado de bromato de potasio en la elaboración del pan sobre el contenido de tiamina hemos encontrado una pérdida total que oscila entre 24,34 % y 26,9 %, de modo que, si deducimos la pérdida que ya de por sí tenemos en la panificación (6 a 11 %) resulta para el agregado de bromato una pérdida del 13 al 20 %.-

Capítulo Octavo

Bibliografía

- 1.- The Chemistry of the carbond compounds-Richter, 569.
- 2.- The Story of vit. B1 - Merck Co. 1940.
- 3.- J. Physiol. 45 - 75 (1912) Ref. de Rosenberg.
- 4.- Sivadjan - La Chimie des Vitamins et des hormones.
- 5.- Rosenberg - The Vitamins. Ed. Año:
- 6.- Williams y col.- J. Am.Chem.Soc. 57 - 229 - 230 - 1935
- 7.- Edie, Evans, Moore, Simpson y Webster - Biochem.J.6-234 (1912)
- 8.-Cline, Williams y Finkelstein. J.Am.Chem Soc. 59, 1052(1937)
- 9.- Williamsy Cline. J. Am. Chem.Soc. 59,216 (1937)
- 10.- Kinnersley, O'Brien y Peters-Biochem.J. 29-701 (1935)
- 11.- Santos Ruiz. Edit. S.A.E.T.A.- pág.80-1941-Madrid.
- 12.- Bastedo, Tremmer y Webb - J.Am.Chem.Soc. 60-2303-1938.
- 13.- Williams y col. J.of the Am.Chem.Soc. 57-229536-1093.
- 14.- Clarke y Gurin- J.Am.Chem.Soc. 57-1876.
- 15.- Williams. J.of the. Am. Chem.Soc. 57- 229.
- 16.- Todd y Bergel- Nature 138, 1936, 76.
- 17.- Todd y Bergel- J. of the Am.Chem.Soc. 1936- 1559.
- 18.- Williams - J. of the Am.Chem. Soc. 58-1063
- 19.- Cline,Williams, Ruehle y Waterman - idem 59-530.
- 20.-Stepp,Kuhnau y Schroeder-Las Vitaminas y su empleo clínico.
Ed. Año:
- 21.- Wintersteiner,Williams y Ruehle. J.Am.Chem.Soc.57,517 (1935)
- 22.- Holiday, Biochem J. 29,718(1935).
- 23.- Williams, Ruehle y Finkelstein J.Am.Chem.Soc.59,526 (1937).
- 24.- Uberk y Verbrugge - J. Biol.Chem. 134,273 (1940).
- 25.- Kinnersley, O'Brien y Peters-Biochem.J.29,101,111 (1935).
- 26.-O'Brien,Peters Biochem J. 29,2369-84- (1935).
- 27.- Lipmann -1936- Natura 138-1097.
- 28.- Peters -1924- Biochem. J. 18,858
- 29.- Meggeridge y Ogston- Biochem J. 29-886-1935.

- 30.- Richter - The Chemistry of the carbond compounds - 477.
- 31.- Barger, Bergel y Todd- Nature - 136-259.
- 32.- Stern y Hofer- Science 1937-85-183.
- 33.- Tauber -1937-Science-86-180.
- 34.- Tauber -1938-J. Am. Chem. Soc. 60-730-
- 35.- Houston y Kon-Nature- 143-558-1939
- 36.- Elvehjem, Sherman y Arnold- J. Biol. Chem. 109-XXIX-1935.-
- 37.- Beehdel, Honeywel, Dutcher y Knutsen-J. Biol. Chem. 80-231-1938.
- 38.- Tauber -J. Biol. Chem. 123,499-1938.
- 39.- Barger, Bergel y Todd -Nature-136-259-1935.
- 40.- Buchman y Williams .J. Am. Chem. Soc. 57-1751-1935.
- 41.- Williams -J. Am. Chem. Soc. 57-229-1935.
- 42.- Williams, Waterman, Keresztezy y Buchman -57-536-1935.
- 43.- Bergel y Todd -J. Chem. Soc. 1937-140-1504.
- 44.- Price y Pickel- J. Am. Chem. Soc. 63,1067-1941
- 45.- Schmelkes -Science- 90-113-1939.
- 46.- Long y Peters -Biochem J. 33-759-1939
- 47.- casi extract. de Stepp, Kahnau y Schroeder.
- 48.- Meiklejohn-Biochem. J. 31,1441-1937-
- 49.- Sinclair -32-2185-1938.-
- 50.- Jukes y Heitman -J. Nutrition 19-21-1940.-
- 51.- Kinnersley, Peters y Reader -Biochem. J. 19,820,1928.
- 52.- Cook -J. Am. Pharm. Assoc. 28-267-1939.
- 53.- Sherman y Spohn- J. Am. Chem. Soc. 45,2719 (1923)
- 54.- Chase Sherman- J. Am. Chem. Soc. -53-3506-1931
- 55.- Chick-Rescoe- Biochem. J. 23,498-1929.
- 56.- Williams -D. Spies -1916-J. Biol. Chem. 26-
- 57.- Drury, Harris y Mandeley-Biochem. J. 24,1632-1930.
- 58.- Birch y Harris-Biochem J. 28,602 (1934)
- 59.- Arnold y Elvehjem -J. Nutrition -15-403-1938.
- 60.- Church -J. Amer. Physiol. Chem -110-660-1935.-
- 61.- Passmore, Peters y Sinclair- Biochem J. 27,842 (1933)

- 62.- Kinnersley, O'Brien y Peters -idem 29,701 (1935).
- 63.- Peters- idem 32,2031-1938.
- 64.- Schultz, Atkin y Frey, J. Am. Chem. Soc. 59-248-2457-1937.
idem 60-1514-1938
idem 60-490-1938.
- 65.- Knight-Biochem. J. 31,731-1937.
- 66.- West y Wilson -Science 88-334-1938.
- 67.- Ochoa y Peters -Biochem J. 32,1501-1938.
- 68.- Barger, Bergel y Todd-Nature 136-259 (1935)
- 69.- Westenbrink y Goudsmit -Nature -142-140-1938.
- 70.- Hills-Biochem. J. 33,1966 (1939).
- 71.- Conner y Straub -Ind. and. Eng. Chem. (An. Ed.) XIII.1941
- 72.- J. Am. Chem. Soc. 61-179 -83-1939.
- 73.- Boletín Soc. Química del Perú 91944-vol. X, n° 3-Barron y Garbajal.
- 74.- Ritsert- Anales Merck - 3,259,1938.
- 75.- Hennessy y Cerecedo J. Am. Chem. Soc. 161,179-1939.
- 76.- Hennessy. Ind. and. Eng. Chem. (An. Ed.) XIII-1941.
- 77.- Emsat, Peacock y Brown -J. Biol. Chem. 135-131-1940.-
- 78.- Kinnersley y Peters-Biochem J. 28-667-1934.
32-1516-1938.
- 79.- Bergel y Todd -J. Chem. Soc. 1937-1504.-
- 80.- ref. del C. Abs. Enzimología; 2;316,1938.
- 81.- Prebluda y Mc Collum -Science -84-488-1936.
- 82.- Prebluda y Mc Collum -J. Biol. Chem. 127-495-1939.
- 83.- Melnick y Field -J. Biol. Chem. 127-508-515-1939.
- 84.- J. Biol. Chem. 135-131-1940.-
- 85.- Marenzi y Villalonga -Anales de Farmacia y Bioquímica -24-13-1942.-
- 86.- Naiman -Science- 85-290-1937.
- 87.- Acton, Ghosh y Dutt-Ind. J. Med. Research -1933-103-ref. de Rosenberg.

- 88.- Raybin -Science -88-35-1938.
- 89.- Lipmann -Nature -140-849-1937.
- 90.- Tauber -Science 86-594-1937.
- 91.- F.A. -3ra. Edición-1943-688-9.
- 92.- J. Am. Chem. Soc. 61-179-83-1939.
- 93.- Hank y Koessler J. Biol. Chem. 39-497-1919.
- 94.- A. Novelli -Quím. y Bioq. de las vitaminas -Ed. Ateneo.
- 95.- Suzuki, Shimamura y Osaka-Biochem Z. 43, 89 (1912).

PARTE SEGUNDA: "El ácido nicotínico en pan y harina de panificación"

Capítulo primero

Reseña histórica y prop. físicas y químicas

El ácido nicotínico o vitamina antipelagra (factor PP) fué preparada por Huber oxidando a la nicotina en el año 1876.

En 1912, Suzuki, Shimamura y Osaka (2) lo aislaron del salvado del arroz. En 1913 (3) Funk lo aisló de levaduras activas contra el beriberi. Suzuki en Japón hizo igual aislamiento.

En 1914 (4) Funk estableció que la pelagra es una enfermedad por deficiencia en la que el maíz desempeñaba el mismo papel en la dieta de los enfermos que el arroz decorticado en la dieta de los polineuríticos.

En 1916 (4) Spenser señaló la semejanza entre la pelagra humana y la lengua negra de los perros.

En 1917 Chittenden y Underhill comparan la pelagra humana y el "Black tongue" (lengua negra).

En 1926 Goldberger y Lillie obtienen una condición semejante a la pelagra en ratas albinas sometidas a dietas deficientes en una sustancia denominada factor PP.-

En 1926 Aykroyd y Roscoe indican que el factor PP y el "antiblack tongue" siempre se encuentran juntos en las mismas regiones (6).

En 1930 Norris y Ringrose (5) producen una condición semejante a la pelagra en pollos.

Elvehjem y colaboradores en 1937-8 (7 y 8) efectuaron estudios con extractos de hígado, aislando la nicotinamida a la cual se podía atribuir la acción antipelágrica de los extractos. Una sola dosis de 30 mg. de ácido nicotínico Eastman Kodak produce respuesta significativa en perros padeciendo el "black tongue", el apetito,

renace, el crecimiento se restablece, la diarrea desaparece, etc. Knight (9) y Mueller (10) establecen que la nicotinamida es esencial al crecimiento de ciertos organismos unicelulares.

Schourie y Swaminathan en 1940 demostraron que la rata no requiere ácido nicotínico para su alimentación porque es capaz de sintetizarlo.

La pelagra humana y la lengua negra del perro son consideradas enfermedades análogas y tan es así que ambas son originadas por los mismos tipos de dietas y la sintomatología es también la misma: estomatitis, diarrea, anemia, dermatitis, etc. (4).

Elvehjem (11) indica que Street y Cowgill y otros autores verificaron que el ácido nicotínico es el factor preventivo de la lengua negra del perro y de la pelagra en el hombre.

La pelagra (11) fue reconocida en Europa en la primera mitad del siglo XVIII, siendo descrita en 1735 por el médico Gaspar Casal quien la denominó "mal de la rosa".

Durante el siglo XIX fue un azote para Europa, especialmente para Italia en la cual el 50 % de la población sufría esa enfermedad.

György (12) definió como vit. B6 al factor antidermatitis en ratas.

Se creyó en un principio que la pelagra humana y de las ratas eran enfermedades análogas, pero en 1936, Birch, György y Harris (13)

observaron que el factor PP necesario para el hombre tiene una distribución en la naturaleza diferente a la de la vit. B6, indispensable para la rata; en base a esto se concluyó por György y Dam que el factor PP y la vit. B6 eran sustancias distintas.

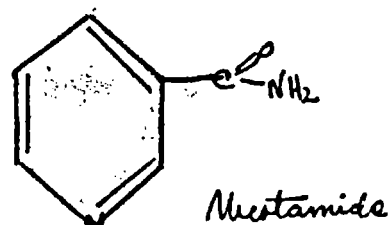
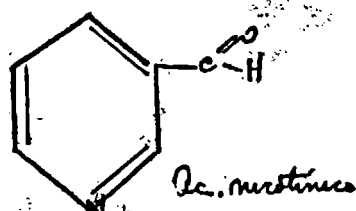
Desde hace dos siglos se observan con frecuencia brotes endémicos de pelagra en regiones en donde la alimentación de la población se hace a base de maíz, Italia, Francia, EE.UU., norte argentino, etc. Elvehjem y Koehn en 1935 usaron pollos para efectuar las experiencias y trabajando con granos calentados, se desarrolló en esos

animales una dermatitis fácilmente curable con extracto de hígado. Se sabe hoy que la dermatitis en pollos es debida a la falta de ácido pantoténico, factor antidermatósico de Elvehjem y Koehn, también integrante del complejo B.

Propiedades físicas y químicas

El ácido nicotínico es químicamente, el ácido beta piridín carbónico, ácido piridín beta carboxílico.

La nicotamida o amida del ácido nicotínico es la verdadera vitamina antipelagrosa o factor PP (pelagra preventiva).



La constitución del ácido nicotínico se obtuvo cuando este ácido fué preparado oxidando a la nicotina (Huber), de la cual deriva su nombre.

El carácter ácido se establece por la formación de una sal de plata y de cobre y por la formación de derivados como ésteres.

El carácter básico es reconocido por la formación de sales cristalizadas como clorhidrato, bromhidrato, etc.

El ácido nicotínico cristaliza en agujas del agua o alcohol y funde a 235-236°C. Sublima sin descomposición lo que puede aprovecharse para su valoración (14).

La amida del ácido nicotínico cristaliza en agujas del benceno y funde a 129°C. Destila a 150-160°C.

Tanto el ácido nicotínico como su amida se presentan bajo la forma de agujas blancas, pequeñas, sedosas, livianas, incoloras, o como un polvo blanco cristalino. Es fácilmente soluble en agua (0,7 partes se disuelven en 100 cm³ de agua a 25°C), mucho más en agua caliente. También se disuelve fácilmente en alcohol y

benceno. Es muy poco soluble en éter. Es soluble en solución de álcalis o carbonatos alcalinos.

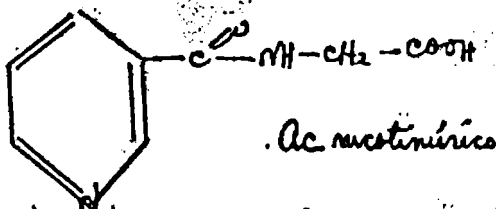
La nicotamida recristalizada de acetona funde a 133°C.

La reacción de la solución acuosa es débilmente ácida al rojo Congo. Ppta. con el ácido cloroaurico en solución acuosa el cloroaurato de nicotamida que funde a 205°C, el punto de fusión del picrato es de 221 - 222°C y del flavinato 250 -1°C. Ppta. cuantitativamente con el ácido fosfotúngstico y el ioduro de potasio y bismuto.

El ácido nicotínico y su amida son termo y alcaliestables y no se alteran por los métodos usuales de conservación de los alimentos.

Presenta un espectro típico de absorción presentando el máximo a 385 milimicrones.

Además del ácido nicotínico y de su amida, los ésteres y amidas substituidas de las mismas, especialmente la coramina (dietilamida del ácido nicotínico) y un nicotilpéptico existente en la orina, el ácido nicotinúrico (13) (nicotilglicocola) desarrollan plena actividad vitamínica.



De los otros derivados piridínicos solo el ácido piridina 3-5 dicarbónico, el 2, dimetil piridina 3-5 dicarbónico y la 3 metil piridina poseen una débil acción antipelagrosa (Vilter-Bean-Spies-Woolley y col.).

El factor antipelagroso está condicionado por la presencia de un grupo COOH (o de un grupo del cual se puede formar el COOH en el organismo) en la posición 3 del anillo piridínico.

Por calcinación la amida nicotínica no debe dejar más de 0,1 por mil de residuo.

Al hervir la solución acuosa de amida nicotínica con solución al 10 % de hidróxido de sodio se desprenden vapores amoniacales que azulean el papel de tornasol rojo.

En Science, junio 29/45 (pág. 675) figura un rápido test de identificación de ácido nicotínico.

Este está basado en la reacción de König y aunque no estrictamente cuantitativo, puede ser usado, para determinar casi instantáneamente si una muestra de harina no es enriquecida o si es muy o poco enriquecida (según el gobierno de Estados Unidos una harina enriquecida debe contener de 2,0 a 2,5 mg. de tiamina y de 15 a 20 mg. de niacina o su amida por libra de harina).

El test requiere el uso de solo 2 reactivos: una solución de anilina al 4 % en alcohol etílico y una sol. acuosa al 4 % de BrCN.

Para hacer este test se coloca en un papel secante blanco o en un indicador de porcelana alrededor de $\frac{1}{2}$ o 1 g. de harina.

Se aplasta la harina con una espátula de modo que tenga 3 mm. de espesor. Se coloca en el centro de la harina empastada 2 gotas de la sol. de anilina y 3 gotas de la sol. de BrCN.

Aparece casi inmediatamente un color amarillo canario. La intensidad del color depende de la cantidad de niacina presente en el pan.

Una simple comparación con harina conteniendo una cantidad conocida de ácido nicotínico tratada en igual forma da un grosero test cuantitativo. Esta comparación de color debe ser hecha 4 minutos después de la adición de los reactivos.

Harina no enriquecida debe desarrollar un suave color amarillo sólo después de 10 a 15 minutos.

Capítulo segundo

Distribución

Encontramos al ácido nicotínico en toda célula viviente en mínimas cantidades; en el hígado, glándulas suprarrenales, y en la levadura y gérmen de trigo se encuentra en apreciable cantidad.

En los tejidos se presenta al estado de nicotamida. Al lado de la presencia de nicotamida libre existe una cantidad de sistemas enzimáticos en los cuales ella es químicamente contenida.

Bandier (15) estudiando la concentración del factor PP en músculos y órganos de buey, observó para el hígado las cifras extremas de 12 a 25 mg. de ácido nicotínico por 100 g. de tejido fresco.

Los alimentos animales son más ricos que los vegetales. Encontramos la mayor proporción en bovino, cerdo, pollo, conejo, bacalao, y salmón, fundamentalmente en las glándulas suprarrenales, hígado pulmón, riñón, etc.

Sebrell (13) estableció el siguiente cuadro de acuerdo al contenido en PP alto contenido en PP: carne de bovino, cerdo, pollo, conejo, salmón, bacalao, hígado de cerdo, leche natural, col rizada, arvejas, hojas de colinabo, jugo de tomate, harina de maní, harina de semillas de algodón, gérmenes de trigo, levadura.

Contenido regular: yema de huevo, haba de soja, espinaca, chauchas, leche desnatada, leche condensada.

Poco contenido: mantequilla, trigo, porotos, ensaladas, cebollas verdes, colinabo, zanahorias.

Contenido nulo: harina de maíz, avena arrollada, harina de centeno, tozino, aceites, cebollas, patatas, manzanas, ciruelas secas.

Según Clarck, los dátiles maduros, así como semilla de trigonela, contiene mucha vitamina antipelagrosa.

Con respecto a la harina de trigo y pan reservamos los datos para el final de esta parte segunda.

Kodicek halló los valores más altos en hígado y glándulas supra-renales y asimismo determinó que la concentración del nicotínico en extractos alimenticios almacenados durante algunos años no disminuye.

Bacharach (1941) usando el método químico, indica los siguientes datos:

Harina blanca de trigo 1 mg. por 100 g.

Harina de maíz 0,5 mg. %

A r r o z 1,7

Concentrado de cáscara de arroz 140 mg. %

Hígado de buey más de 27,5 %

Hígado de ternera 22,5

Lengua de buey 12,8

Jamón 4,7 a 10,4

Leche menos de 0,5

Elvehjem obtiene valores más elevados.

Mc Intyre, Waisman, Henderson y Elvehjem (17), Mc Vicar y Berryman (18), Dann y Handler (19), etc, han estudiado intensamente la distribución del nicotínico en los alimentos y órganos animales. Dann y Handler (19) determinaron la concentración del nicotínico en huevos fertilizados de gallinas de New Hampshire; la yema contenía 20 gamas y la albúmina alrededor de 60 gamas. Las cifras se mantuvieron constantes hasta los 16 días en que la conc. del nicotínico aumentó enormemente (470 gamas), en el pollo recién nacido es de 715 a 900 gamas, lo que nos está indicando que el nicotínico es sintetizado por el embrión del pollo en el último período de la incubación.

La leche y derivados son pobres en el factor PP. En 1941 Noll y Jensen (20) encontraron 0,06 a 0,09 mg. % de leche y 1,4 a 2,8 mg. % en leche en polvo.

Su presencia es casi negativa en la manteca.

En levadura seca Bandier y Hald (21) encontraron valores entre 16 y 60 mg. de levadura seca.

Josen (13 bis) ha determinado el contenido de ácido nicotínico en 70 muestras de harina de trigo, obtenidas de extracción única y cuya molienda corresponde a un 50 % (variedad Klein 32), Hallando valores comprendidos entre 3,09 y 5,69 mg. %.

Es notable que la leche o harina de arvejas (13) no tienen acción antipelagrosa en el black tongue de los perros mientras que en el hombre tiene gran acción curativa (no se sabe aún el porqué).

Cabe por otra parte mencionar que el maíz y la sémola de trigo, contienen sustancias pelagrogénas que inactivan al factor PP en el organismo, es decir que un aporte de maíz y de sémola de trigo es capaz de anular completamente la acción antipelagrosa de ciertos alimentos que tienen cantidad suficiente de nicotínico.

Capítulo tercero

Propiedades farmacológicas y acción fisiológica

La pelagra es una enfermedad por carencia del factor PP, observada particularmente en aquellos países cuya alimentación es casi exclusiva de cereales, particularmente maíz. Se presenta en todas las edades.

Tanto el ácido nicotínico como la nicotamida tienen igual actividad antipelágrica. Woolley, Madden, Strog y Elvehjem (1938) (22) han determinado la acción antipelágrica de una serie de derivados piridínicos que se pueden transformar en el organismo en ácido nicotínico.

Elvehjem (23) demostró que el ácido nicotínico hace desaparecer los síndromes de la lengua negra en los perros (24).

Los ensayos efectuados por Mc Grea, Chen-Rose-Robbins-Ukna (25) en animales indican que el ácido nicotínico y su amida son sustancias muy poco tóxicas. Antiguamente se habían observado acciones tóxicas (Elvehjem-Chen) pero se ha demostrado que son debidas a la fuerte acidez del ácido libre.

La beta picolina es débilmente activa; la beta amino piridina es inactiva (Elvehjem y col.). El nicotinato de sodio, amonio y etilo son activos.

La Coramina (dietil nicotinsamida) tiene una actividad variable.

La trigonellina es inactiva.

Los isómeros del ácido nicotínico: ácido alfa piridín carbónico o ácido picolínico y ácido gama piridín carbónico son totalmente inactivos. Si en el anillo de la piridina sustituimos uno de los hidrógenos por un grupo metilo o carboxilo o si se reemplaza el grupo carboxilo del nicotínico por un ciano grupo o un grupo sulfónico los compuestos que resultan carecen de actividad antipelágrica.

El índice terapéutico (25) o sea la relación entre la dosis curativa y la dosis tóxica mínima es 1:1000 a 1:2000 en todas las especies estudiadas; en consecuencia su toxicidad es nula y se puede (igual que su amida) usar en dosis altas sin peligro.

Algunos autores han observado algunas reacciones desagradables en sujetos que han sido mantenidos 3 meses con dosis diarias de 50 mg., pero que no alcanzan a interferir con el uso terapéutico.

Los síntomas de la pelagra humana no son específicos: debilidad, insomnio, pérdida de apetito y peso, diarreas, trastornos nerviosos, irritabilidad, estomatitis, glositis, ulceraciones en los ángulos de la boca, úlceras en la lengua, la cual se presenta roja e hinchada.

En la piel se producen escaras y vesículas, sobre todo en el dorso de la mano, antebrazo y cuello.

La pelagra se halla muy comúnmente asociada a la avitaminosis B1 y A.-

En el perro los síntomas carenciales de ácido nicotínico son marcados, apareciendo el denominado "black tongue" (lengua negra), los síntomas son semejantes a la pelagra humana.

En lo que respecta a sus prop. fisiológicas, la nicotamida forma parte integrante de las coenzimas I y II.-

La coenzima I, codehidrasa o difosfopiridín nucleótido, al igual que la coenzima II, coenzima de Warburg, codehidrasa II (aislada por Warburg en 1935) o trifosfopiridín nucleótido, se encuentra en todos los tejidos animales en cantidades variables siendo indispensables en sistemas de óxido reducción (5).

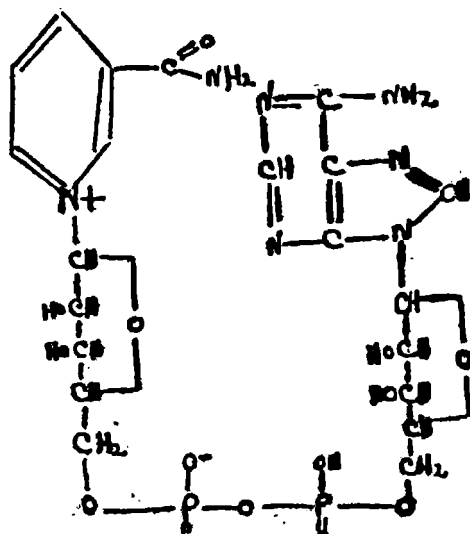
Levaduras y células rojas de la sangre son especialmente ricas fuentes y algunos músculos contienen relativamente grandes cantidades.

Ninguna de las dos coenzimas ejerce acción alguna en la pelagra; la administración de nicotínico aumenta marcadamente la coenzima I en eritrocitos y músculos.

Las ratas presentan (4) cuando se mantienen con dietas pobres en ácido nicotínico y se les añade polvo de tiroides, disminución de coenzima I en hígado y en la corteza del riñón (debido al aumento del metabolismo)

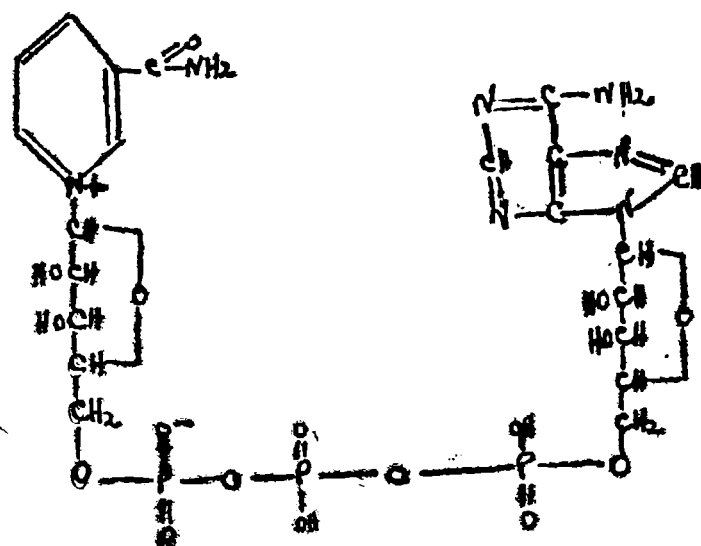
La codehidrogenasa I es soluble en agua y suficientemente resistente a la oxidación, así resiste al agua oxigenada pero es atacada por ella en presencia de catalizadores como el hierro. Es un dinucleótido que da por hidrólisis adenina, amida nicotínica y dos moles de d-ribosa-ác. fosfórico. El ácido fosfórico está unido a la ribosa en posición 5.-

Euler y Schenk sugieren la siguiente fórmula para la coenzima I:



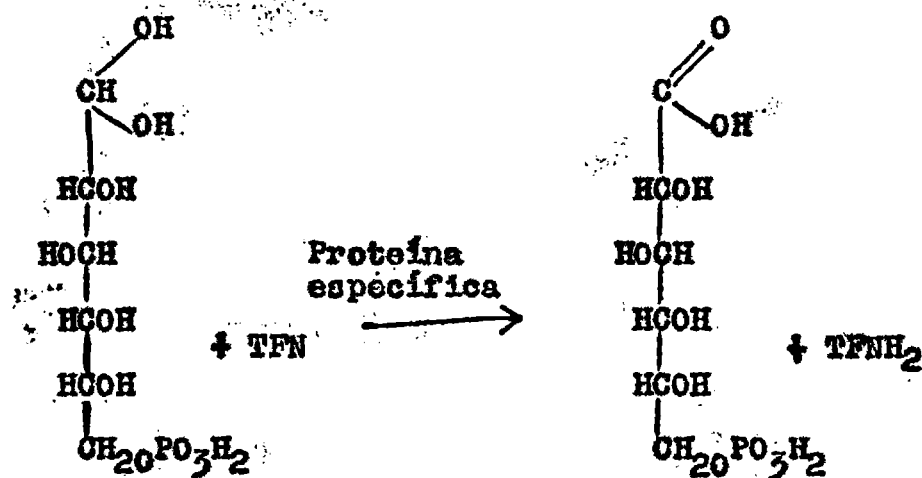
La codehidrogenasa II la encontramos como la I en toda célula viviente no ha sido aislada al estado puro y parece diferenciarse de la I sólo por un grupo ácido fosfórico.

Euler y Schenk han sugerido la siguiente fórmula:



En estas moléculas la parte funcionalmente activa es el resto de nicotamida. La acción de las ^{co}nicotamidas contenidas en sistemas enzimáticos consiste en la deshidrogenación de varios sustratos. Durante esta reacción (5) la cohidrogenasa absorbe dos H y se reduce a la forma dihidro. La dihidro cohidrogenasa es oxidada y reconvertida en la cohidrogenasa. La parte nicotinamida de la molécula es responsable del fenómeno de la reacción reversible reducción-oxidación de la cohidrogenasa.

Un ejemplo típico (26) del papel desempeñado por los piridín nucleótidos en las oxidaciones biológicas está dado por el sistema que condujo al descubrimiento del trifosfopiridín nucleótido. El sustrato a oxidar es el Hexosa 6 monofosfato y el agente oxidante el oxígeno. En primer lugar se oxida el grupo aldehído a ácido y se reduce el TFN (trifosfopiridín nucleótido).



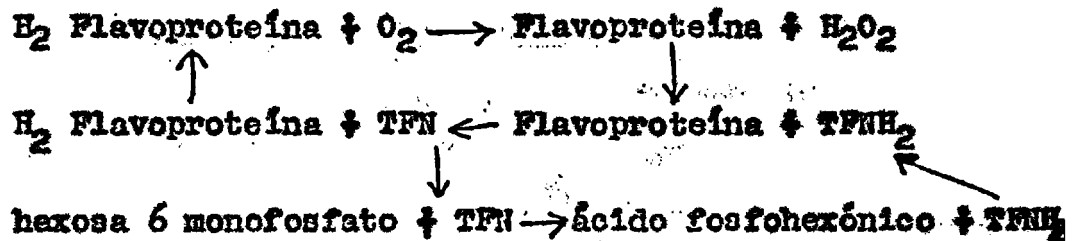
Esta reducción depende de una proteína de los glóbulos rojos o de la levadura que se une al sustrato y al TFN.

La oxidación del TFN reducido se realiza no por el O del aire sino por una nueva enzima: la flavoproteína o fermento amarillo de Warburg.

La flavoproteína oxida, reduciéndose; la flavoproteína reducida es oxidada por el O del aire e interviene otra vez en la oxidación

cíclica del TPN. Como resultado de todo esto el ácido hexosa 6 monofosfato se oxida a ácido fosfohexónico.

Esquematisando:



El ácido nicotínico abarca además dentro de la fisiología celular otros terrenos más del metabolismo: el del azufre, la asimilación de las albúminas alimenticias y el de los pigmentos (porfirina). La porfirinuria es un síntoma constante de la pelagra y es responsable de la sensibilidad de la piel a la luz de esta enfermedad. El ácido nicotínico es esencial para el desarrollo de ciertos bacterios Knight en 1937 (9) demostró que la nicotamida era un factor esencial para el crecimiento del estafilococo aureo. Mueller (10) en 1937 comprobó que junto con la beta alanina era indispensable para el bacilo de Loeffler.; otros autores indicaron que también era indispensable para otros microorganismos.

Capítulo cuarto
Métodos de valoración

El papel que desempeña el ácido nicotínico en la prevención o cura de la lengua negra en los perros y de la pelagra en los humanos ha estimulado estudios o métodos para la determinación cuantitativa de este compuesto. Debemos considerar métodos biológicos, microbiológicos y químicos.

a) Métodos biológicos:

Son métodos poco utilizados por no ser prácticos, ya que requieren un tiempo relativamente largo. Tienen además el inconveniente de que los animales de laboratorio pequeños, que son los más adecuados para estos ensayos no son utilizables porque no es posible en ellos (ratas, cobayos, conejos, palomas) producir una avitaminosis PP característica.

Se elige como animal de experimentación al perro.

Estos métodos consisten, en síntesis, en determinar, comparando con cantidades conocidas de ácido nicotínico, la dosis mínima necesaria para evitar el black tongue en perros sometidos a dietas especiales.

Elvehjem, Madde, Strong y Woolle (27) (28) y Koehn y Elvehjem (29) indican el siguiente test denominado test del perro:

Los perros son sometidos a una alimentación en la cual el ácido nicotínico falta total o casi totalmente hasta que aparezcan los síntomas de la lengua negra y se observe una disminución de peso. Se administra entonces a un grupo de perros una dosis única de 20 mg. de ácido nicotínico, que produce un aumento temporario de peso. A otro grupo se le da una cantidad de sustancia o alimento ensayado. Se compara la respuesta en la curva del peso con la obtenida con la cantidad conocida de nicotínico. Así por diversos

tanteos se logra conocer la cantidad de nicotínico del alimento o sustancia ensayada.

Otros tests que utilizan otros animales no son tan estimables, por ejemplo: test del pollo (29) y test de la Galleria Mellone-lla (30).

b) Métodos microbiológicos:

Son los más exactos y fáciles de ejecutar. Están basados en que el ácido nicotínico es indispensable para el desarrollo de ciertos microorganismos.

Entre los diversos métodos utilizados tenemos:

Test del lactobacillus:

Se mide en este test (31) la cantidad de ácido láctico producida por el lactobacillus arabinosus. Trabajando con todas las precauciones, la cantidad de ácido láctico producido es directamente proporcional a la cantidad de ácido nicotínico presente.

Este y los otros métodos microbiológicos tienen la ventaja sobre los métodos químicos en que la turbidez y color de la muestra no influyen en la determinación.

Por este método se puede determinar con toda seguridad, una gama y aún menos.

Método de Dorfman, Horwitt, Koser y Saunders (32). Estos autores determinan la cantidad mínima necesaria de cualquier líquido o sustancia X que al ser adicionado al medio artificial utilizado por ellos, determina un crecimiento del bacilo disentérico comparable al producido por una cantidad conocida de ácido nicotínico.

Método de Sonne, Isbell, Woolley, Butler y Sebrell (33). Estos autores usando al Shigella paradysenteriae idearon un método para valoración de nicotamida y compuestos relacionados, en líquidos biológicos. Se compara la turbidez producida por el crecimiento a

las 16 - 22 horas a 31° mediante un fotómetro fotoeléctrico. Este método es usado por los autores para determinar nicotamida en sangre, orina, y líquido céfalo raquídeo.

Guerido, Lwoff y Labaste (4): Usan el bacilo *Proteus* para valorar el nicotínico en sangre.

Estos métodos microbiológicos no son totalmente comparables con los químicos y se expresan sus resultados en equivalentes de nicotamida (4).

Mientras los proc. químicos valoran solo al nicotínico o su amida, en los microbiológicos se responde también a otros compuestos.

c) Métodos químicos:

Son los métodos que presentan actualmente mayor importancia por su sencillez y rapidez.

Método del bromuro de cianógeno: Este método se encuentra basado en que los derivados de la piridina producen un color específico con bromuro de cianógeno y una amina primaria o secundaria. El material biológico a valorar debe ser totalmente hidrolizado para contener solo el ácido libre.

Debe protegerse a las soluciones de la luz y efectuar el calentamiento con bromuro de cianógeno en la oscuridad. Puede efectuarse el tratamiento con diversas aminas:

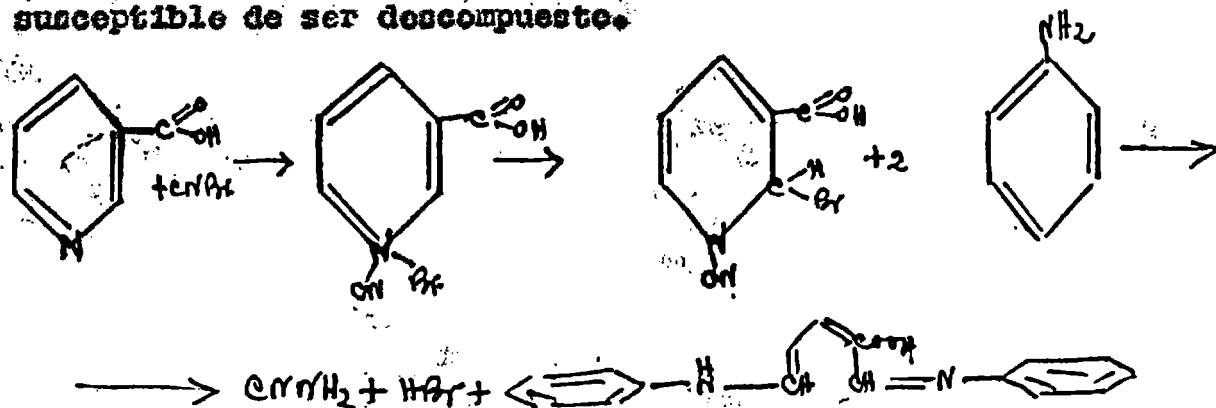
Para amino acetofenona (Harris y Raymond) (34) método utilizado por nosotros Beta naftil amina; anilina; N metil p-amino fenol; p-metil amino fenol sulfato, ú otras.

Se desarrolla un color amarillento parduzco que puede ser medido fotoeléctricamente.

Los métodos indicados se basan en la reacción de König.

El núcleo de la piridina se rompe fácilmente con bromuro de cianógeno, separándose el N de la piridina como cianamida. La cadena carbonada es un derivado de la aldehida glutacónica, la cual se

enoliza con toda facilidad y da un OH reactivo, que es capaz de combinarse con la amina aromática dando un compuesto coloreado. La reactividad del núcleo pirídico (35) es mayor que la del anillo bencénico y esta más grande reactividad es debida al N del primero. Kbnig usó el bromuro de cianógeno para adicionar al N del anillo es susceptible de ser descompuesto.



Bandier y Hald usaron sulfanilato de sodio, p-amino fenol y sulfanilamida y concluyeron que ninguno de éstos da resultados tan consistentes como p-metil amino fenol.

Shaw y Mc Donald, Melnick y Field, Pearson y Swaminathan usaron anilina con ventaja.

Von Euler y alumnos obtuvieron mejores resultados con beta naftilamina.

Harris y Raymond y Kodice usaron p-amino acetofenona.

El método del bromuro de cianógeno no es específico para nicotínico; una cantidad de otros derivados de la piridina y especialmente derivados del nicotínico como la trigonelina, ácido nicotínico y nicotámidan dan tests de similar color.

Método de Swaminathan: (38) Es utilizado para alimentos naturales. Se extrae el nicotínico agotando sucesivamente por agua caliente. Las proteínas son ppdas. con acetato de plomo y a su vez éste es eliminado por ácido sulfúrico. El extracto obtenido se trata con carbón, si es coloreado, y se lleva a pH 7,5.

Se trata con bromuro de cianógeno. Se deja 30 minutos y se adiciona sol. saturada de anilina. Se obtiene color amarillo que se

extras con alcohol isoamílico.

Se lee al fotómetro.

Melnick y Field (37)

Hidroliza el material en medio ácido.

Decolora con carbón, y efectúa la lectura en el fotómetro foto-eléctrico de Evelyn.

Harris y Raymond (38) Emplean p-amino acetofenona (ver desarrollo en parte experimental).

Kodicek (39). Usa como amina aromática la p-amino acetofenona de Harris y Raymond. Este método es usado para sangre y tejidos (el anterior preferentemente para orina).

Se hidroliza el material con NaOH al 40 % y se calienta a baño maría una hora. Sin enfriar se le agrega acetona y se centrifuga. Se decanta el líquido sobrenadante y se le añade sol. de bicarbonato de sodio al 5 %, ajustándose el pH a 6,5 con HCl concentrado, empleando azul de bromotimól como indicador externo.

Se lleva a volumen con alcohol de 96° y se continua igual que Harris y Raymond.

Método de Arnold, Schreffer y Lipsius (40): Este método es utilizado para determinar el ácido nicotínico en productos alimenticios animales y vegetales.

El extracto se prepara en la siguiente forma: La sustancia se divide finamente, se suspende en agua en un tubo de centrifugación Pyrex y se lleva al autoclave cerrado 15 minutos a una atmósfera de presión (120°C).

Se enfría. Se centrifugan los tubos, se decanta y el residuo se vuelve a agotar con agua. Se reúnen los líquidos de extracción y se completa a 80 cm³, se alcaliniza con 5 ml. de NaOH al 20 % y se calienta hora y media a baño maría para transformar la nicotina en ácido nicotínico. Se enfría. Se le adicionan 2 ml. de

bicarbonato de sodio al 4 % y 1,5 ml. de HCl conc., ajustando el pH a 6 = 6,2. Se lleva a 100 cm³.

Se toman 4 tubos graduados a 15 ml. Se coloca en cada uno 5 ml. de la solución a investigar; llamemos a los tubos X, A, B y C.

Se diluye con 5 ml. de una sol. reguladora (fosf. monopotásico, hidróxido de sodio) y se ajusta el pH a 6.-

A los tubos B y C se le añaden 20 y 40 gamas de nicotínico y se llevan los 4 tubos a baño maría calentado a 80° 10 minutos.

Se le agrega al A, B y C y no al X 2 ml. de BrCN y al X 2 ml. de agua destilada. Se agita y se mantiene en el baño 4 minutos. Se enfría y se le añade a todos los tubos 0,2 ml. de sol. de p-amino acetofenona al 10 %, se agita y mantiene en oscuridad 15 minutos.

Se le agrega a cada tubo 0,4 ml. de HCl al 10 % y se completa a 15 con agua destilada. Se deja en la oscuridad otros 15 minutos.

El contenido de cada tubo se pasa a un embudo de separación y se le agrega 15 ml. de acetato de etilo. Se agitan los embudos 5 minutos y después de medio minuto de centrifugación se decanta descartándose la porción acuosa.

Se lee en fluorímetro de Pfaltz y Bauer.

Teery y Stanley R. Shimer (41) utilizan metafenilendiamina como la amina cromogénica en la determinación colorimétrica del factor PP.

Se han obtenido resultados altamente satisfactorios. Se efectúa la acidificación con HCl al 20 %. El desarrollo del color es inmediato y la estabilidad e intensidad son más grandes (según los autores) que con otras aminas. El color o turbidez de los extractos es compensado por dos blancos.

Método del 2 = 4 dinitroclorobenceno: (42) Este método está basado en la reacción de Vongerichten.

La reacción envuelve la adición de 2 - 4 dinitroclorobenceno al N terciario del núcleo pirídico. Este producto de adición es descompuesto por aminas como anilina o por hidróxidos alcalinos, dando un producto coloreado. Este método es desarrollado para orina y otros flúidos.

El color es desarrollado por ácido nicotínico, nicotamida, nicotinato de sodio y dietil nicotamida (Coramina); en cambio el color no es desarrollado por trigonellina.

El color se mide en colorímetro.

Este método al igual que el del bromuro de cianógeno no es específico para ácido nicotínico porque el mismo color es dado por muchos derivados de la piridina.

Shaw y Mc Donald: (43) Aconsejan efectuar la decoloración parcial con alcohol que ppta. la mayor parte de las sustancias coloreadas de los extractos. Emplean el método para determinar la concentración de nicotínico en ext. de hígado comerciales.

La lectura del amarillo se hace en el tintómetro de Lovibond.

Askelöff y Holmberg (44) usan como decolorante tierra de infusorios o carbón.

Capítulo quinto

Parte experimental

Nuestro trabajo tuvo por objeto determinar la cantidad de ácido nicotínico contenido en el pan del comercio y al mismo tiempo en la harina de panificación para observar si se destruía parte del mismo en el proceso de elaboración del pan.

Entre los antecedentes del trabajo en la Argentina debemos citar a Syma Josem (Anales de la Asociación Química Argentina, 32,168,185) quien determinó el contenido en ácido nicotínico de algunas harinas argentinas. El método que empleó fué el colorimétrico de Melnick y Field (modificado por Melnick, Oser y Siegel). Fué adaptado a un fotelómetro Cenco, para el cual se estableció la curva de calibración con ácido nicotínico puro.

Determinando el contenido de ácido nicotínico de 70 muestras de la variedad Klein 32, que corresponde a la cosecha 1941-2 obtuvo valores que oscilan entre 3,51 y 5,50 mg. % con pocas excepciones. Por otra parte y estando ya listo para entregar nuestro trabajo tuvimos la oportunidad de leer en Anales de la As. Química Argentina (Sept. 1945) un trabajo de Lournagaray, quien determinó el contenido de ácido nicotínico en harinas y pan retirados del comercio de la Capital Federal y cuya tipificación se realizó en el Ministerio de Agricultura. Empleó un método de extracción muy semejante al nuestro, y como amina aromática la anilina en lugar de la para amino acetofenona.

Encontró las siguientes cifras:

<u>Harina tipo:</u>	<u>Ácido nicotínico en mg. por 100 gr.----</u>
0000	1,10 - 1,50
000	1,70 - 2,10
00	1,30 - 2,10
0	2,00 - 2,50
10	3,20 - 3,80
Harinilla I	4,00 - 6,50
 <u>P a n</u> 	
Blanco de primera	1,40 - 2,10
Negro	3,00 - 6,00

Respecto a nuestro trabajo empleamos el proceso de extracción de Arnold, Schreffer y Lipsius (40) y con el extracto obtenido aplicamos el método de Harris y Raymond (38).

Practicamos la determinación del punto de fusión, que fué 235°C. Tomando la reacción de la solución acuosa al rojo congo ésta resultó ser débilmente ácida.

Fundiendo al ácido nicotínico y esterificando por alcohol absoluto en presencia de ácido sulfúrico, se obtiene el éster etílico que a su vez reacciona con amoníaco dando la nicotamida que purificada por varias cristalizaciones presenta un punto de fusión de 120°C.

Para efectuar nuestras investigaciones compramos pan y harina de panificación en distintos lugares, comparando en cada caso los valores obtenidos, para determinar si había modificación en el proceso de elaboración.

Extracción del ácido nicotínico:

Se toman 2 a 5 gramos de pan o harina. Se desecan a la estufa y se tritura en un mortero.

La sustancia finamente dividida se suspende en 75 ml. de agua en un tubo de centrifuga y se lleva al autoclave 15 minutos a la presión de una atmósfera. Luego se enfría, se centrifuga el tubo, se decanta el líquido sobrenadante y el residuo se vuelve a agotar, nuevamente con agua.

El líquido obtenido es concentrado (45) a un volumen de 5 cm³ o menos. Se agregan 5 cm³ de HCl conc. y el material es disuelto por inmersión del frasco en baño de agua hirviente. La solución es diluida a 15 cm³ con agua usada en el lavado del frasco o becker. Se sumerge en un baño de agua hirviente y se deja 30 a 40 minutos con agitación ocasional. Se enfría a la temperatura ambiente y el volumen es restituido a 15 cm³.

Con el extracto obtenido aplicamos la técnica de Harris y Raymond. El método utiliza los siguientes reactivos:

a) Sol. de bromuro de cianógeno: Se prepara añadiendo a una solución acuosa saturada de bromo, solución de cianuro de potasio al 10 %, gota a gota hasta decoloración exacta.

b) Sol. de p-amino acetofenona: Se obtiene disolviendo 5 gramos de p-amino acetofenona en 14 ml. de HCl al 10 % y llevándolo a 50 ml.

c) Solución titulada de ácido nicotínico: Tiene 100 gamas por ml. Se prepara semanalmente diluyendo una solución diez veces más concentrada. Este solución madre tiene pues 1000 gamas por ml. Para prepararla, el ácido nicotínico fué sedado en estufa a 105°C hasta pesada constante.

d) NaOH al 20 %

e) NaHCO₃ al 4 %

f) HCl conc.

g) Sol. de azul de bromo timol al 0,04 %

h) HCl al 10 %

Técnica:

Al líquido obtenido se le adicionan 2 ml. de NaHCO_3 al 4 % y se neutraliza con HCl conc., hasta pH 6 - 6,2, usando azul de bromo timol como indicador externo.

Se toma la décima parte del líquido primitivo (para que se encuentre dentro del óptimo de la determinación fotométrica), se pasa a un balón aforado de 50 ml. y se completa a volumen con los lavados.

Se preparan 4 tubos graduados de 15 ml. de capacidad, marcados, X, A, B y C.

El tubo X se usa como blanco, el A para la coloración directa, al B se le añaden 0,2 ml. de sol. de ácido nicotínico (20 microgramos), al C se le añaden 0,4 ml. (40 microgramos) y a cada uno de ellos se adiciona 10 ml. de la solución X.

Se colocan los tubos en un baño maría calentado a 80°C, durante 10 minutos.

Debe evitarse la acción de la luz. Al cabo de ese tiempo se le agrega a los tubos A, B y C, pero no al X, 2 ml. de reactivo de bromuro de cianógeno. Se mezcla por rotación y 4 minutos después se sacan los tubos del baño maría y se pasan a un baño de agua fría (no expuesto a la luz).

Se dejan enfriar 4 minutos y se agrega a todos los tubos 2 ml. de p-amino acetofenona. Se deja en la oscuridad 15 minutos.

Transcurrido ese tiempo se agrega a cada tubo 0,4 ml. de sol. de HCl al 10 %, se completa a 15 ml. con agua destilada y se deja otros 15 minutos, en la oscuridad.

Se llevan los tubos al fotómetro y se efectúa la lectura con filtro S 47 y cuba de 30 mm. El contenido del tubo X se coloca en la cuba de compensación.

El cálculo se efectúa en la siguiente forma:

Siendo las lecturas de las extinciones E_a , E_b y E_c , se puede construir un gráfico colocando en las ordenadas los diferentes valores de E y en la abscisa las concentraciones conocidas de ácido nicotínico añadidas (20 y 40 gamas); por extrapolación gráfica se obtiene la concentración de ácido nicotínico de la muestra.

También se puede calcular, aplicando la fórmula siguiente:

$$\frac{E_a}{(E_b + E_c) - 2 E_a} \times \frac{60}{V} = \text{gamas de ácido nicotínico en 1 ml. del líquido.}$$
 V representa el líquido tomado en el análisis y 60 es el total de gamas de nicotínico que se han agregado. Se multiplica por 100 y se obtiene el porcentaje.

Debe tenerse fundamentalmente en cuenta el pH antes del agregado de bromuro de cianógeno, el cual para obtener una colocación estable y máxima, debe oscilar entre 6 y 6,5 (azul de bromo timol como indicador externo).

Las sales prácticamente no ejercen influencia.

La lectura conviene efectuarla dentro de los 15 primeros minutos de practicada la reacción; aunque la colocación se mantiene estable hasta 30 minutos más o menos si se tiene la precaución de mantener los tubos en la oscuridad.

El color desarrollado no es específico para el ácido nicotínico; la piridina, alfa amino piridina, coramina, etc., dan similar coloración.

La trigonelina, el ácido quinolínico no dan coloración.

Este método tiene la ventaja del compensador, el cual hace descartar la coloración propia del extracto obtenido.

Cumplimiento de la ley de Lambert y Beer: Desde nuestras primeras experiencias con la técnica de Harris y Raymond, los datos obtenidos demostraban la tendencia al cumplimiento de la ley de Lambert y Beer.

Realizamos lecturas con escala de ácido nicotínico desde 5 hasta 50 gamas; se efectuaron de cada tubo 10 lecturas (5 a la derecha y 5 a la izquierda) y se obtuvo al final una representación gráfica satisfactoria que demostraba el buen comportamiento general de la reacción (ver pág. siguiente).

Tubo nº 1: A 0,05 ml. de sol. de ácido nicotínico (5 gamas), se agregan 9,95 de agua destilada. Se lleva a 8° 10 minutos. Se agregan 2 ml. de bromuro de cianógeno. Se mezcla. A los 4 minutos se saca del baño y se pasa a un baño de agua fría. Se deja enfriar 4 minutos. Se agrega 2 ml. de p-amino acetofenona. Se deja en oscuridad 15 minutos.

Se agrega 0,4 ml. de sol. de HCl al 10 %, se completa a 15 con agua destilada. Se deja otros 15 minutos en oscuridad. Se lee. En la cuba de compensación se coloca agua destilada. Se lee con filtro S 47 y cuba de 3 cm.

Tubo nº 2: 0,10 ml. de sol. de ácido nicotínico y 9,90 agua destilada. Se procede igual que el tubo anterior.

Tubo nº 3: 0,15 de sol. de ácido nicotínico y 9,85 de agua destil.

Tubo nº 4: 0,20 de sol. de ácido nicotínico y 9,80 de agua destil.

Tubo nº 5: 0,25 de sol. de ácido nicotínico y 9,75 de agua destil.

Tubo nº 6: 0,30 y 9,70.

Tubo nº 7: 0,35 y 9,65.

Tubo nº 8: 0,40 y 9,60.

Tubo nº 9: 0,45 y 9,55.

Tubo nº 10: 0,50 y 9,50.

Los datos obtenidos son los siguientes:

Tubo nº 1: (5 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas 60,5

Extinción: 0,218

Tubo nº 2: (10 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas 41,3

Extinción: 0,385

Tubo nº 3: (15 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas: 28

Extinción: 0,552

Tubo nº 4: (20 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas: 19,9

Extinción: 0,701

Tubo nº 5: (25 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas: 13,2

Extinción: 0,879

Tubo nº 6: (30 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas: 9,1

Extinción: 1,041

Tubo nº 7: (35 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas: 6,5

Extinción: 1,186

Tubo nº 8: (40 gamas de ácido nicotínico)

Promedio de lecturas:

Extinción: 1,4000

Tubo nº 9: (45 gamas de ácido nicotínico)

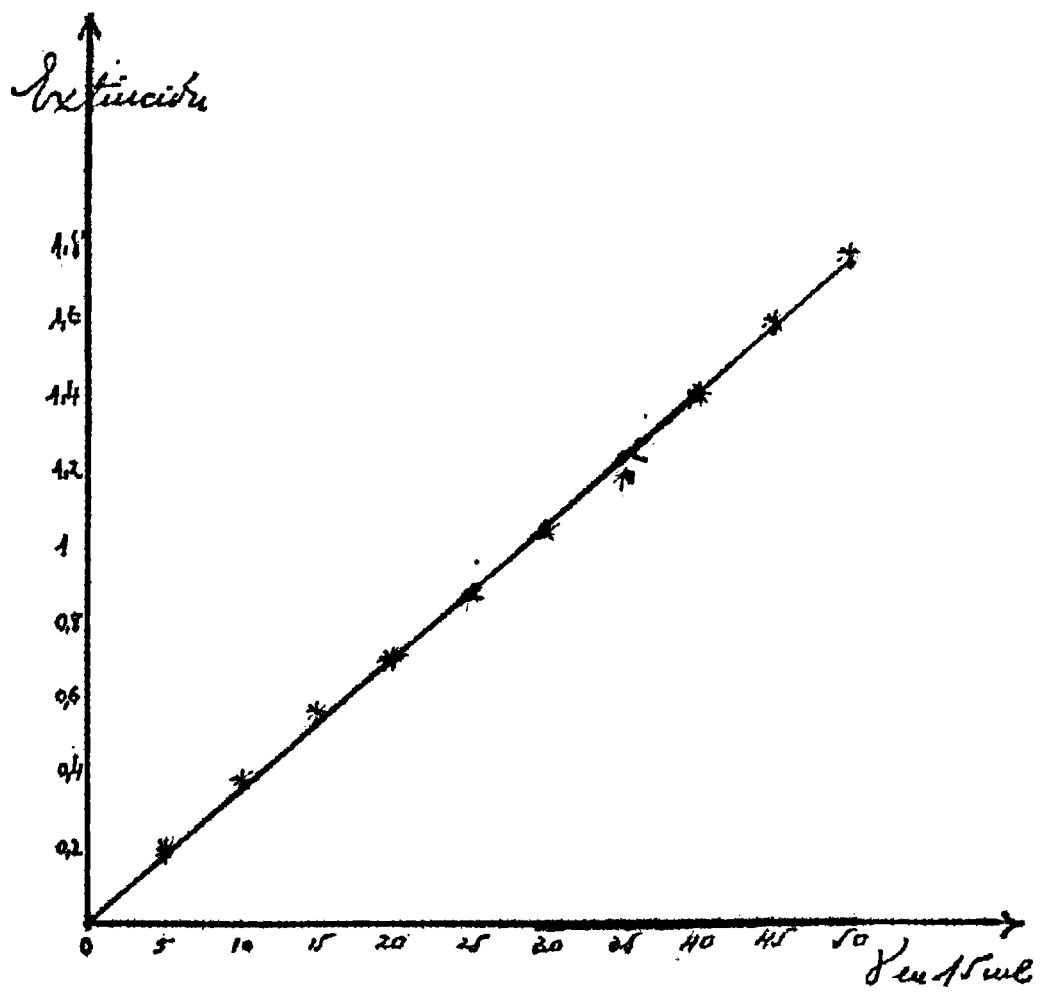
Extinción: 1,595

Tubo nº 10: (50 gamas de ácido nicotínico)

Extinción: 1,780

Curva teorica: _____

Puntos determinados: * * *



Observado que el método de Harris y Raymond cumple la ley de Lambert y Beer, efectuamos ensayos de recuperación, agregando a una harina de la cual se conoce la cantidad de nicotínico que contiene, una cierta cantidad de éste.

Para ello procedimos en la siguiente forma:

Tomamos una harina, determinamos por el método antes indicado la cantidad de ácido nicotínico; encontramos el valor de 2,02 mg. %.

Repetimos varias veces la determinación y obtuvimos los siguientes valores: 2,06 - 1,99 - 2,04.

Hacemos el promedio y llegamos al valor de 2,03 mg. %.

Preparamos con 4 gramos de esa harina un extracto de acuerdo a Arnold, Schreffler y Lipsius (40) y se lleva finalmente a 10 cm³. Ello equivale a decir que en esos 10 cm³ tenemos 0,0812 mg. de ácido nicotínico o sea 81,20 gamas en 10 ml.

A 1 ml. de ese líquido (8,12 gamas) se añade 0,05 ml. de sol. de ácido nicotínico (5 gamas); se completa a 10 ml. con agua destilada y se practica la reacción de acuerdo al método.

Finalmente se efectúa la lectura y cálculos y se obtiene 13,30 gamas. De modo que recuperamos acá el 103,6 %.

Se practican otras determinaciones:

<u>Agregado</u>	<u>Determinado</u>	<u>Recuperado</u>	<u>% recuperado</u>
5 gamas por ml.	13,30	5,18	103,6 %
10 gamas por ml.	18,50	10,38	103,8 %
20 gamas por ml.	28,37	20,25	101,25 %
30 gamas por ml.	39	30,88	102,93 %
50 gamas por ml.	59,10	50,98	101,96 %

Los valores obtenidos demuestran que este método tiene errores aceptables para esta clase de determinaciones.

Capítulo sexto
Valores obtenidos

	<u>P a n</u>	<u>Harina</u>
<u>Muestra nº 1</u>		
(Pan y harina de La Plata)	2,336 mg. %	2,55 mg. %
<u>Muestra nº 2</u>		
(Pan y harina de Avellaneda)	2,20 mg. %	2,01 mg. %
<u>Muestra nº 3:</u>		
Pan y harina de Quilmes	2,28 mg. %	2,22 mg. %
<u>Muestra nº 4</u>		
Pan y harina de Bernal	1,98 mg. %	2,06 mg. %
<u>Muestra nº 5</u>		
Pan y harina de Wilde	2,15 mg. %	2,02 mg. %
<u>Muestra nº 6</u>		
Pan y harina de Wilde	2,21 mg. %	2,19 mg. %
<u>Muestra nº 7</u>		
Pan y harina de Wilde	2,36 mg. %	2,15 mg. %
<u>Muestra nº 8</u>		
Pan y harina de Wilde	2,07 mg. %	1,99 mg. %
<u>Muestra nº 9</u>		
Pan y harina de Tolosa	2,25 mg. %	2,18 mg. %

	<u>P a n</u>	<u>Harina</u>
<u>Muestra n° 10</u>		
Pan y harina de Tolosa	2,13 mg. %	2,12 mg. %
<u>Muestra n° 11</u>		
Pan y harina de Cap.Federal	1,98 mg. %	2,02 mg. %
<u>Muestra n° 12</u>		
Pan y harina de Cap.Federal	2,03 mg. %	2,05 mg. %

Todos estos datos evidencian claramente que el ácido nicotínico no se destruye durante el proceso de panificación.

Se efectuaron al mismo tiempo ensayos con pan de tipo integral, obteniéndose datos mucho más elevados de ácido nicotínico; lo cual confirma que la parte más rica en nicotínico del trigo está constituida por el salvado del mismo.

Datos obtenidos con pan de tipo integral:

<u>Muestra n° 1:</u>	5,58 mg. %
<u>Muestra n° 2:</u>	4,76 mg. %
<u>Muestra n° 3:</u>	6,09 mg. %
<u>Muestra n° 4:</u>	6,45 mg. %
<u>Muestra n° 5:</u>	6,02 mg. %
<u>Muestra n° 6:</u>	6,25 mg. %
<u>Muestra n° 7:</u>	5,04 mg. %
<u>Muestra n° 8:</u>	5,76 mg. %

Influencia del bromato de potasio utilizado en la panificación sobre la nicotamida contenida en el pan.

Con el objeto de determinar la influencia del agregado de bromato de potasio en la elaboración del pan sobre el contenido de ácido nicotínico, agregamos a una harina de la cual previamente determinamos su contenido, una cantidad de bromato de potasio de 4 gramos en 70 Kg. de harina.

Para ello tomamos una harina de panificación adquirida en la Provincia de Buenos; determinamos por el proceso antes indicado la cantidad de ácido nicotínico, repetimos 4 veces la determinación y obtuvimos el valor promedio de 2,08 mg. por cien gramos de harina.

A 7 Kg. de esa harina le agregamos 0,40 gramos de bromato de potasio, se mezcló bien y solicitamos a una panadería preparase pan con esa harina.

Con el pan obtenido procedimos a determinar el contenido de ácido nicotínico y obtuvimos el valor de 1,98 mg. %.

Como la pequeña diferencia observada está dentro de los errores experimentales (Harris y Raymond indican un posible error del 10 %), con este dato podríamos anticipar que el contenido de ácido nicotínico no sufre en las condiciones indicadas modificación, pero, para mayor seguridad, hicimos otras determinaciones.

<u>Harina</u>	<u>Pan con mejorador</u>
2,22 mg. %	2,19 mg. %
2,02 mg. %	2,08 mg. %
2,05 mg. %	1,99 mg. %
2,15 mg. %	2,12 mg. %
1,98 mg. %	2,09 mg. %
2,22 mg. %	2,20 mg. %

Todas estas determinaciones nos indican que el ácido nicotínico no sufre modificación alguna por el agregado de bromato de potasio en el proceso de panificación (por lo menos en la cantidad agregada como mejorador).

Capítulo séptimo

Conclusiones

1.- La cantidad de ácido nicotínico no disminuye durante el proceso de panificación.

2.- El contenido de ácido nicotínico es mayor en el pan de tipo integral que en el pan denominado blanco, lo cual corrobora que dicho factor se encuentra preferentemente en el salvado del trigo.

3.- En la harina de panificación blanca obtuvimos los promedios de 1,99 a 2,55 mg. % (técnica de Harris y Raymond) y en el pan blanco del comercio 1,98 a 2,36 mg. %.

4.- En el pan denominado integral obtuvimos los promedios de 4,76 a 6,45 mg. %.

5.- El bromato de potasio añadido a la harina en el proceso de panificación, no influye sobre el contenido de ácido nicotínico.

De todo esto se deduce que el contenido de nicotínico del pan blanco es insuficiente para las necesidades humanas, por lo cual sería conveniente que se contemplara la necesidad del enriquecimiento de la harina o del pan, tal como se procede en otros países.

Capítulo noveno

Bibliografía

- 1.- The Story of vit. B1 - Merck y Co. 1940.
- 2.- Suzuki, Shimamura y Osaka-Biochem. Z.; 45,89 (1912).
- 3.- Vickeri H.B. -J. Biol. Chem.; 68,585 (1936).
- 4.- A. Novelli -Quím. y Bioq. de las vitaminas (Ed. Ateneo)
- 5.- Rosenberg. The Vitamins -Ed. año:
- 6.- Aykroff y Roscoe -Biochem. J. 23,483 (1923).
- 7.- Elvehjem, Madden, Strong y Woolley .J. Am. Chem. Soc., 59,1767,1937
- 8.- Elvehjem y col. J. Biol. Chem. 123, 137 (1938).
- 9.- Knight. Biochem. J., 31,731 (1937).
- 10.- Mueller J. Biol. Chem. 120,219 (1937).
- 11.- Elvehjem. Phys. Rev. 20,249 (1940).
- 12.- György - Nature, 133,498 (1934)
- 13.- Stepp, Kühnau y Schoröedcr -Las vitaminas y su empleo clínico.
Ed. años:
14. (bis). -Josen. Anal. A. W. A. 168-185 (1944).
- 14.- Meth of Anal. Assoc. Off. Agr. Ch. 1940 (610)
- 15.- Bandier -Biochem. J. 33,1130 (1939).
- 16.- Kodisek -Chemistry and. Industry, 58,1088,19.
- 17.- Mc Intyre, Waisaman, Henderson y Elvehjem. J. Nutrition 22,535.
(41).
- 18.- Mc. Vicar y Berryman- J. Nutrition- 24,235 (1942).
- 19.- Dann y Handker J. Biol. Chem. 140,935 (1941).
- 20.- Noel y Jansen J. Biol. Chem. 140,655 (1941).
- 21.- Bandier y Hald - Biochem. J. 33,264 (1939).
- 22.- Woolley, Madden, Strong y Elvehjem -J. Biol. Chem. 124,715(938)
- 23.- Elvehjem. J. Biol. Chem. 123,137 (1938).
- 24.- Elvehjem -J. Am. Chem. Soc. 59,1767 (1937).

- 25.- Stepp, Kühnau y Schroeder.
- 26.- A. Novelli -Q. y Bioq. de vitaminas. Ed. Ateneo.
- 27.- Elvehjem, Madden, Strong y Woolley -59,1767 (1937)
- 28.- Elvehjem, Madden, Strong y Woolley. J. Biol. Chem. 123, 137 (1938)
- 29.- Koehn y Elvehjem. J. Biol. Chem. 118, 693 (1937)
- 30.- Rubinstein y Shekun-Nature 143, 1064 (1939) Citado por Rosenberg
- 31.- Snell y Wright. J. Biol. Chem. 139, 675 (1941)
- 32.- Dorfman, Horwitt, Koser y Saunders. J. Biol. Chem. 128 (1939)
- 33.- Sonne, Inbell, Woolley, Butler y Sebrell. J. Biol. Chem. 139, 499 (41)
- 34.- Harris y Raymond. J. Soc. Chem. Ind., 58, 652 (1939).
- 35.- Waisman y Elvehjem. -Ind. and. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 221-3. -XIII-
año 1941.-
- 36.- Swaminathan -Nature, 141, 830 (1938).
- 37.- Melnick y Field. J. Biol. Chem. 134, 1 (1940).
- 38.- Harris y Raymond - Biochem. J. 33, 2037 (1939)
- 39.- Kodicek. Biochem. J. 34, 712 (1940).
- 40.- Arnold, Schreffer y Lipsius -Ind. and. Eng. Chem. (Anal. Ed.)
62 - 3- XIII- 1941.
- 41.- Teeri y Stanley R. Shimer. J. Biol. Chem. 153-307-11 (1944).
- 42.- Vilter, Spies y Mathews. J. Biol. Chem. 125, 85 (1938).
- 43.- Shaw y Mc. Donald -Quart. J. Pharmacol. 119, 380 (1938).
- 44.- Askelöff y Holmberg. C. A. 33-8229 (1939).
- 45.- Melnick Oser y Siegel -Ind. And. Eng. Chem. (Anal. Ed.) nº 12-
XIII-año 1941.-

Jorge Muñoz