

El análisis químico como método previo del control biológico de vitaminas *

Por los Doctores E. RAMIREZ y M. D. RIVERO.

El análisis para determinar el contenido en vitaminas, tanto de los productos medicinales como alimenticios, consiste en determinar la cantidad del producto que previene o cura la avitaminosis de animales sometidos a una dieta desprovista de la vitamina por investigar, comparando los resultados con los obtenidos añadiendo a la alimentación cantidades conocidas de vitaminas patrones.

La Ley mexicana, expedida por el C. Presidente de la República con fecha 29 de enero de 1937, a propuesta del Consejo de Salubridad General que aprobó el proyecto de Reglamentación de Control Biológico, formulado por uno de nosotros (Dra. Rivero), establece los siguientes requisitos:

Art. 29.—Los productos que se diga contienen vitaminas, aconsejados para su uso terapéutico, deberán señalar en los marbetes y hojas de propaganda la vitamina o las vitaminas que contengan de acuerdo con la denominación internacional aceptada por la Sociedad de Naciones.

Art. 30.—Cuando los productos medicinales a que se refiere el artículo anterior se diga contienen las vitaminas A, B¹, C, o D, deberá indicarse en los marbetes y hojas de propaganda, su titulación en Unidades Internacionales.

La Unidad Internacional de vitamina A, equivale a 0.0006 mgr. de Carotina B pura. La U. I. de vitamina B¹ equivale a 10.0 mgr. del producto de adsorción tipo suministrado por el Instituto de Hampstead. La U. I. de vitamina C corresponde a 0.05 mgr. de ácido ascórbico levógiro puro. La U. I. de vitamina D corresponde a 0.000025 mgr. de Calciferol.

Art. 31.—El control biológico de las vitaminas A, B¹, C y D se hará de acuerdo con las especificaciones señaladas por la Comisión permanente de Standarización biológica de la Sociedad de Naciones, utilizando para comparación los patrones suministrados por el Instituto de Hampstead. El control de la vitamina A se fundará

* Leído como trabajo reglamentario de turno, en la sesión extraordinaria del 3 de agosto de 1938.

en la acción curativa que ejerce sobre la xeroftalmía provocada en la rata por un régimen carente de vitamina A. El control de la vitamina B₁ se hará determinando la dosis del producto necesaria para mantener normal el crecimiento de ratas jóvenes sometidas a un régimen de avitaminosis B. En casos dudosos se comprobarán los resultados con los que se obtengan en el tratamiento del pichón atacado de polineuritis consecutiva a dieta de arroz pulido.

El control de la vitamina C, se hará determinando la dosis cotidiana necesaria para evitar el desarrollo de lesiones escorbúticas macroscópicas en cuyes jóvenes sometidos a un régimen escorbútigeno.

El control de la vitamina D, se hará estudiando el poder curativo sobre diez ratas de 40 a 60 gramos de peso sometidas a dieta raquitogénica teniendo en cuenta la curva de peso y la prueba de calcificación sobre la línea huesosa metafisiaria.

Art. 32.—El Departamento de Salubridad se reserva el derecho de exigir la indicación de presencia y potencia en los productos que se diga contienen las vitaminas B₁ y E, cuando la Comisión de Standarización de la Sociedad de Naciones establezca las normas de control o cuando sean establecidas por el Departamento de Salubridad Pública.

El control biológico que establece la Comisión de Higiene de la Sociedad de Naciones, es el único método que hasta ahora ofrece las suficientes seguridades para una correcta titulación de vitaminas; pero lo laborioso y tardado de su aplicación, obliga a buscar métodos químicos que violenten la obtención de resultados.

Los métodos físico-químicos descubiertos hasta la fecha, carecen de la especificidad necesaria y no son lo suficientemente precisos para poder hacer una titulación, sobre todo cuando se trata de la aplicación de reglamentos que entrañan sanciones. Sin embargo, el ensayo químico, el espectro-fotométrico y el de la luminiscencia pueden dar indicaciones muy valiosas.

Las investigaciones que hemos emprendido han tenido por objeto aclarar si los métodos colorimétricos pueden emplearse como un ensaye previo al control biológico, a fin de descartar aquellos productos que se alejen seguramente de la titulación dada por los fabricantes o de restringir la experimentación biológica a los márgenes de aproximación encontrados en el ensaye previo, lo

solución acuosa de bicromato de potasio al 0.5%. La comparación se puede hacer en cualquier colorímetro. Nosotros utilizamos el fotómetro graduado diferencial de Pulfrich. 1 cc. de la solución de Carotina se guarda durante una semana a la temperatura de 37°C, en la obscuridad, en un frasco con tapón esmerilado, de 5 cc. de capacidad, para que contenga suficiente cantidad de aire. Se repite la determinación colorimétrica. El aceite de coco es utilizable, si la decoloración es inferior al 10%; en caso contrario, esa muestra de aceite de coco no debe emplearse. Con aceite de coco comprobado, se hace una dilución al 1 x 10 de la solución patrón y se conserva en un frasco con atmósfera de N, a la temperatura de 0°C. Como siempre se debe trabajar comparativamente, es conveniente proveerse de una muestra de aceite de hígado de bacalao, que después de ser rigurosamente controlado, sirva de patrón para exámenes subsecuentes, comparándolo de tiempo en tiempo, con el patrón internacional.

Los síntomas de avitaminosis A en los animales de Laboratorio se pueden clasificar en cuatro grupos:

1o.—Alteraciones de la piel y las mucosas. Queratinización y cornificación de los tejidos epiteliales, con disminución de su resistencia a las infecciones y supresión de las secreciones. El síntoma más apreciable es la xeroftalmia y la cornificación vaginal, que da una imagen semejante al "test" de Allen y Doisy para la comprobación de la foliculina.

2o.—Degeneración de los nervios acompañada de degeneración de los cordones de la médula, que se traduce en el perro por espasmos, calambres y paresia del tren posterior.

3o.—Alteraciones de la coroides que se traducen en hemeralopia.

4o.—Alteraciones del aparato genital. En el macho se presenta degeneración del epitelio de las vesículas seminales y de los canalículos seminíferos; en la hembra por infecundidad.

Dos son las manifestaciones más importantes de la avitaminosis A en la rata: la detención del desarrollo y la xeroftalmia. Sometidas a régimen carente de vitamina A, las ratas jóvenes sólo crecen hasta agotar su reserva vitamínica; después dejan de crecer, pierden peso, desaparece el apetito y mueren en colapsus nutritivo. La xeroftalmia aparece a las 3 ó 4 semanas de

que se empieza la dieta carente de vitamina A. Los párpados se decoloran e hinchan. La fotofobia es marcadísima. Entre la 5a. y 6a. semanas la córnea pierde su transparencia y se seca, cubriéndose el ojo de una secreción sanguinolenta. Generalmente el animal muere antes de que se produzca la atrofia completa del ojo. Antes de que aparezca la xeroftalmia, los animales tienen el pelo hirsuto, dejan de aumentar de peso. La xeroftalmia típica no siempre se produce; pero sí el edema y decoloración de los párpados. En ratas de 4 semanas, la xeroftalmia aparece aproximadamente en el 75% de los animales; en ratas de más de dos meses, sólo en el 25%.

La disminución de la resistencia a las infecciones origina alta mortalidad durante la investigación, especialmente por padecimientos de los aparatos respiratorio y digestivo.

En el cuy, la avitaminosis A se traduce principalmente por detención en el desarrollo. Se emplean animales de 110 a 140 gramos de peso. En los pollos avitaminósicos se detiene el desarrollo, pierden el apetito, la cresta se pone flácida, el pico se decolora, no pueden sostenerse en pie. Se utilizan pollitos al día siguiente de nacidos; crecen normalmente las 3 primeras semanas, y entre la 3a. y la 4a., bruscamente dejan de crecer y se desarrollan los síntomas señalados.

Como los pollitos se conservan en incubadora, a temperatura constante, hay que tener la precaución de que el foco piloto del termóstato sea de luz roja. Con luz blanca, los pollitos más intensamente iluminados, son picoteados por los demás.

A grandes dosis, la vitamina A, es tóxica para la rata y el ratón; se les cae el pelo, los párpados se hinchan y se enrojecen; aparece exoftalmia, los órganos parenquimatosos sufren degeneración grasienta, especialmente el hígado. Los animales mueren con un cuadro parecido al raquitismo, por descalcificación de los huesos. Por esta última propiedad, las vitaminas A y D son en cierto modo antagónicas. La dosis letal para las ratas es de 4,000 U. R. diarias ministradas durante diez días. Hay que hacer notar que la Carotina carece de acción tóxica.

Como lo señala la legislación mexicana, el control de los productos que contengan vitamina A, se hace en la rata blanca,

escogiéndose animales de 21 a 28 días de edad, con un peso que varía entre 35 y 55 grs.

Se dividen los animales en cuatro lotes: al primero se le da una alimentación normal; la señalada por Coward, Cambden y Lee, parece la más completa:

Maíz molido.	65 Grs.
Trigo molido.	20 „
Leche en polvo.	29 „
Caseína.	9 „

Levadura de cerveza de 5 a 10 Grs. (según la edad del animal, mientras más joven más levadura).

Cl Na.	0.5 Grs.
CO ³ Ca.	0.5 „

Dos veces por semana se le añade a la dieta 2 gramos de hígado y 2 gramos de berros. A animales de 3 semanas de edad, no se les ministra hígado, para evitar que se devoren entre sí.

Los tres lotes restantes se someten a una dieta desprovista de vitamina A. Al segundo lote se le ministra la vitamina A Standard, o una solución vitamínica comercial previamente comprobada con la Standard.

Al tercer lote se le ministran cantidades variables del producto por controlar, dentro de la titulación que señalen los fabricantes, dando un margen de 10%. El cuarto lote sirve de comparación por la aparición de los síntomas de avitaminosis.

Como la xeroftalmia no aparece en el 100% de los animales, se comprende que el número de los constitutivos de cada lote debe ser muy grande, para suprimir todo defecto en la experimentación y todo error en la interpretación de los resultados.

Un problema interesante es el establecimiento de las dietas carentes de vitamina A. Para dar una idea del número de investigaciones efectuadas, transcribimos un cuadro que resume las del empleo más frecuente.

No.	Autor	Caseína	Almidón	Dextrina	Leva- dura	Mezcla sales	Cloru- ro Na.	Carne	Grasa	Agar
3.—	Sherman.	18	67		10	4	1			
4.—	Sure.	20		66	10	4				
5.—	Cady.	18		70-72	6-8	4				
6.—	Nelson.	18		67	8	4				
7.—	Steenbock.	18		69	6,9	4				2
8.—	Ahmad.	20	75		5	4				
9.—	Sherman.		82		4	4		10		
10.—	Pittenger.		78		6	4		18		
11.—	Coward.	15		73	8	4				
12.—	Drummond.	20	50		5	5			15	
13.—	V. Euler.	20	50		10	5			12	
14.—	Drummond.	15	70		5	5				
15.—	Osborne.	18	51		5	4			22	
16.—	Heb.	21	57			5			17	
17.—	Funk, Scheumert.	20	55		5	5			15	
18.—	Olcott.	18		46	8	4			24	
19.—	Random.	17		63,5	3,5	4			12	
20a—	Hauge.	18		63	3	4			10	2
20b—		15	20	52	3	3			5	2
20c		18	25	38	3	4			10	2
21.—	Morgan.	19		71		4			5	2
22.—	Culhauc.	20	60		5	5			9,9	
23.—	Bacharach.	20	50			5			10	
24.—	Moore.	20	60		7,5	5			15	

La caseína y el almidón deben ser extraídas con alcohol metílico caliente y después calentados durante 24 horas a 120° C. La grasa (se puede usar el aceite de cacahuate) debe calentarse durante 3 horas a 150° C.

Las mezclas de sales son también numerosas; muy empleada es la de Osborne y Mendel. Se obtienen, sin embargo, resultados muy uniformes con la No. 40 de Steenbock.

NCl	23.36
MgSO ₄ , 7H ₂ O	24.6
NaHPO ₄ , 12H ₂ O	35.8
K ₂ HPO ₄	69.6
Ca ₂ H ₂ (PO ₄) ₂ , 4H ₂ O	68.8
Lactato cálcico; 5H ₂ O	15.4
Citrato de fierro 6H ₂ O	5.98
KI	0.16

La solución de Vitamina A se suministra directamente con gotero.

Cuando se estudia el efecto de la ministración de la Vitamina A sobre el desarrollo de los animales, interpretado por la curva de peso, es conveniente trazar una gráfica. Cuando se utilizan coordenadas cartesianas, marcándose en las ordenadas el peso semanal, y en las abscisas los logaritmos de las dosis (en miligramos) ministradas, Coward, Key, Dyer y Morgan demostraron que se obtiene una curva lineal, correspondiente a la línea recta:

$$y = ax + b.$$

Los valores encontrados para a y para b son:

En la rata macho	$a = 29.6$	$b = 6.0$
En la rata hembra	$a = 17.9$	$b = 8.0$

Conociendo el valor de y (crecimiento), se calcula el valor de x; se encuentra el número correspondiente a ese logaritmo y se compara ese valor con el obtenido por la ministración de dos unidades del Standard. Como se emplean indistintamente machos y hembras, hay que tomar los valores medios para los cálculos y hacer la corrección según el número de animales empleados. Si **m** es el número de los machos y **h** el de las hembras, **R** el valor obtenido por los primeros y **r** el obtenido para los segundos, el valor corregido que debe compararse con el Standard se obtiene por la siguiente ecuación:

$$\frac{mR + hr}{R + r}$$

Nuestro objeto no es señalar la técnica del Control biológico de la Vitamina A, sino poner de manifiesto que dicho control requiere un gran número de animales, un cuidado extremo en su ejecución y un considerable gasto de tiempo. Aunque el volumen comercial en Estados Unidos es mucho más grande que el de México, el número de marcas comerciales y, por tanto, el de muestras por examinar es el mismo, y mientras que en aquel país existe un laboratorio para el control de cada Vitamina, un personal numeroso y un depósito enorme de animales, en México, uno de nosotros (Dra. Rivero) con sólo dos ayudantes, tiene que efectuar no sólo el control biológico de las vitaminas, sino el de las hormo-

nas y productos opoterápicos, el de los arsenicales y de drogas como la digital, el estrofantó y el cuernezueto de centeno, incluidos en la legislación mexicana sobre control biológico.

Por otra parte un buen número de productos que se dicen contener Vitaminas, o no las contienen, o es tan baja su titulación con relación a la expresada por los fabricantes, que dos meses de trabajo se traducen en rendir un dictamen de inconformidad, originando un fuerte gasto a la Nación y una gran pérdida de tiempo.

Por todo ello, hemos estudiado varios métodos rápidos de aproximación, con el objeto de establecer en el Laboratorio de Control Biológico, a cargo de uno de nosotros (Dra. Rivero), una técnica rutinaria que permita descartar aquellos productos inactivos o de muy baja titulación.

Tres son los métodos no biológicos señalados para la titulación de la Vitamina A, 1o. el colorímetro; 2o. el espectrofotométrico y 3o. el de luminiscencia. El método colorimétrico comprende tres reacciones principales: la reacción de Fearon, la de Bezssanoff y la de Carr-Price. La reacción de Fearon se funda en la coloración azul que toman los aceites que contienen vitamina A, bajo la acción del Pirogalol. La reacción de Bezssanoff se funda en la coloración azul que toman los aceites que contienen Vitamina A, bajo la acción del ácido fosfomolibdico. Ambas reacciones carecen de especificidad. La reacción que ofrece mayores seguridades es la de Carr-Price, que se funda en la coloración azul que toman los aceites que contienen Vitamina A, bajo la acción de una solución clorofórmica de tricloruro de antimonio.

La investigación espectroscópica se funda en que la Vitamina A, presenta una banda de absorción selectiva en el ultravioleta correspondiente a 3200-3300 Angstroms. Tratada con el tricloruro de antimonio, aparece una banda característica de absorción en el espectro visible correspondiente a 6080-6120 Angstroms, que desaparece rápidamente. La absorción ultravioleta requiere el empleo de un espectrógrafo de cuarzo con radiación monocromática. Chevallier aconseja el uso de la célula fotoeléctrica fluorescente de potasio efectuando la medición con lecturas en galvanómetro. El procedimiento exige un equipo costoso, del que carecemos; además el tricloruro de antimonio no se presta para investigaciones

que excedan de algunos segundos. La Conferencia Internacional de Londres, de 1934, acordó como método de la determinación de la actividad de la Vitamina A, la medida de la absorción en la zona ultravioleta 328 m. Nosotros hemos trabajado con el fotómetro graduado diferencial de Pulfrich y tenemos el espectrógrafo de Zeiss; pero para un control de aproximación es mucho más cómodo el ensaye directo por el método de Carr-Price.

La fluorescencia de la Vitamina A ha sido estudiada por diversos investigadores (Morgan y Mac Lennan, Le Roy Glantz, Woodrow y Schmidt). Peacock ha estudiado preferentemente la luminiscencia con la luz de Wood; sin embargo, no se ha establecido una técnica de cuantificación.

Por todo lo expuesto, nuestras investigaciones se dirigieron especialmente al empleo de la reacción de Carr-Price. Rosenheim y Shuster emplean el tintómetro de Lovilond; Kuhn-Brockmann, el microcolorímetro de Hellige; Bleyer el colorímetro de Authenrieth. No siendo diferenciales los dos últimos colorímetros, la comparación del color la han efectuado, respectivamente, con una mezcla de sulfato de cobre-nitrato de cobalto, y con una solución de azul victoria. Desde este punto de vista la ventaja del fotómetro graduado diferencial es evidente. Dado que la absorción con el tricloruro de antimonio es en la zona 5500 y 6000 Å, resulta extraordinariamente cómodo trabajar con el filtro S61, recomendado por Emmerie, Julius y Wolff, transparente para esta región del espectro.

Como los valores obtenidos por la lectura en los tambores graduados del fotómetro de Pulfrich, expresan los logaritmos de la absorción, y como la absorción es generalmente proporcional al logaritmo de la concentración, las curvas obtenidas con el aparato, corresponden a una función lineal recta, lo que permite la extrapolación entre determinados límites, y facilita considerablemente el trabajo.

Dentro de la reacción de Carr-Price, existen varios métodos:

Método de Norris-Church.—Para hacer la solución clorofórmica de tricloruro de antimonio emplea cloroformo enfriado en hielo, con lo que se obtiene una solución al 18% aproximadamente. Hacen la lectura en el Lovibond, con soluciones heladas, entre los 15 y 30 segundos. Según este método, una Unidad Sherman co-

rresponde a 2.18 Unidades Lovibond. La Unidad Sherman es la más pequeña cantidad de vitamina A, capaz de curar animales de 25 gramos en el test de 8 semanas.

Método de Morgan.—Consiste en hacer la lectura en el Lovibond no del valor azul, sino del azul virando al amarillo. Tiene varios motivos de error.

Método de Rosenthal.—Este autor aumenta la sensibilidad de la reacción colorida de Carr-Price, añadiendo Brenzcatequina. La coloración obtenida es roja en vez de azul. Como la Carotina continúa dando coloración azul, la reacción de Rosenthal es aplicable a mezclas de Carotina y Vitamina A. Se emplea como comparación una solución de permanganato de potasio. Existen, además, otras reacciones para cuantificar la Vitamina A en los organismos y en sus tejidos; las de Menken, Euler y Virgin, de Gottlieb-Roese y su modificación por Lundborg, para su investigación en la sangre; la de Laqueur y la de Wilson, aplicables al hígado.

Para nuestras investigaciones seguimos la técnica de Ritsert, especialmente adaptada para el empleo del fotómetro graduado de Pulfrich. Preparamos por destilación cloroformo purísimo a partir de cloroformo para análisis de Merck. D. A. B. 6, deshidratándolo rigurosamente. El tricloruro de antimonio químicamente puro fué recrystalizado en cloroformo escrupulosamente secado. La solución de tricloruro de antimonio de un peso específico de 22 Vol. por ciento y tratada con tartrato sódico-potásico y bicarbonato de sodio, fué titulada con una solución N-10 de yodo, utilizando almidón como indicador.

Se preparan varias soluciones clorofórmicas del patrón, que contengan de 100 a 200 Unidades Internacionales de Vitamina A (100, 125, 150, 175 y 200 U. I.) por c. c., y con cada una se hace una determinación fotométrica anotando los resultados de la lectura del valor de extinción E, en papel milimétrico; como dichos valores son logarítmicos, se debe obtener una curva de la forma $y = ax + b$.

Para efectuar la medición se coloca en la cubeta de 10 m. m. ± 0.01 m.m., ya puesta en el colorímetro, 0.25 c.c. de la solución vitamínica y se añade 2.5 c.c. de la solución titulada de tricloruro de antimonio. Se mezcla rápidamente con un agitador de vidrio y se hace la lectura a los cinco y a los diez segundos. Hay

que proceder rápidamente, debiendo estar todo el material de trabajo escrupulosamente limpio y seco, para lo cual debe conservarse en desecador con cloruro de calcio. Después de algunos minutos de contacto de los útiles (cubeta, agitador, pipetas, etc.), con la atmósfera del laboratorio se humedecen superficialmente y las soluciones de cloruro de antimonio se enturbian inutilizándose para la experimentación. En la cubeta de comparación se coloca 2.5 c. c. de agua destilada. La rapidez de las operaciones es tan importante, que a los pocos segundos de quedar una gota del reactivo de antimonio pendiente del extremo de la pipeta, se enturbia por el vapor de agua del aire. La más ligera turbidez inutiliza la reacción. Durante la lectura, la cubeta debe mantenerse cubierta.

Obtenida la gráfica con el patrón, sirve para todo el trabajo subsecuente; pero es indispensable en cada titulación del producto por investigar, hacer cuando menos una determinación con la solución patrón, o con un preparado de Vitamina A, previamente titulado, como lo señalamos más antes.

Creemos indispensable obtener experimentalmente la gráfica de titulación y no atenerse simplemente a la gráfica que la casa Zeiss da con el fotómetro, obtenida con una solución al 1 x 1000 de Vogan. En todo caso, la gráfica personal sirve para la comprobación de la corrección de la técnica.

En el ensaye del producto desconocido no es válido hacer extrapolaciones, por lo cual debe trabajarse con soluciones que contengan una concentración vitamínica, según el dato suministrado por los fabricantes, del mismo orden que la concentración de la solución patrón utilizada para la construcción de la curva. Cuando se desconoce el contenido vitamínico, se procede por tanteos, hasta obtener una solución cuyo valor azul quede entre los límites de los colores azules de las soluciones del patrón.

Para una solución aproximada, cuando se da la titulación en función del valor azul de Lovibond, es útil tener presente la correspondencia entre el valor azul y la absorción en el fotómetro de Pulfrich, con filtro S 61, dada en el siguiente cuadro:

Valor azul Lovibond.	% Absorción con filtro S 61.
11.	11%
10.	16%
9.	20.5%
8.	25%
7.	29.4%
6.5	31.5%

Para el examen del Aceite de Hígado de Bacalao y de otros aceites, debe tenerse presente que las soluciones clorofórmicas sólo se conservan algunos minutos. Media hora después de preparadas ya no deben usarse. Como la conservación de la Vitamina A, es diferente en la porción saponificable y en la insaponificable, es indispensable hacer dos titulaciones, una en el aceite original y otra en su fracción insaponificable aislada. Es necesario, por lo tanto, proceder a la saponificación del aceite y separar las dos fracciones. Nosotros hemos seguido la técnica aceptada por la Conferencia Internacional para la standardización de las Vitaminas, celebrada en Londres el año de 1934.

Aplicando sistemáticamente la técnica descrita en el presente trabajo, hemos podido comprobar, por comparación con los resultados del ensaye biológico, que el método colorimétrico es de gran utilidad como ensaye previo de la Vitamina A, permitiendo restringir la titulación biológica a los límites de aproximación obtenidos por colorimetría.

Resultados negativos con el método colorimétrico han sido corroborados en el ensaye biológico, el cual ha dado valores de titulación, en productos activos, comprendidos dentro de los límites de titulación obtenidos con el método de Carr-Price.

El establecimiento rutinario del método fotométrico permite un ahorro considerable de tiempo y de animales.

En trabajos subsecuentes daremos a conocer nuestras investigaciones para las otras vitaminas, el resumen de nuestros protocolos y las conclusiones a que hemos llegado.

