

24
110



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Determinación de Vitaminas A y E en Diversos
Tejidos de Ratas Alimentadas con una dieta de
Semillas de Algodón

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

MA. TERESA ROMERO AVILA

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

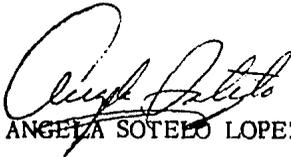
JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: PROF. ANGELA SOTELO LOPEZ
VOCAL: PROF. ARTURO PEREZ ALONSO
SECRETARIO PROF. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
1er. SUPLENTE PROF. BENJAMIN GUTIERREZ DIAZ
2do. SUPLENTE PROF. JOSE ADOLFO DE LA VEGA RODRIGUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

SECCION DE BROMATOLOGIA DE LA DIVISION DE NUTRICION DE LA
UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DEL CENTRO MEDICO NACIO
NAL DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR:


M. EN C. ANGELA SOTELO LOPEZ

SUSTENTANTE:


MA. TERESA ROMERO AVILA

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. SEMILLA DE ALGODON	3
II.2. PROPIEDADES QUIMICAS DEL GOSIPOL	5
II.3. OBTENCION DEL ACEITE DE SEMILLA DE ALGODON	6
II.4. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL GOSIPOL	9
II.5. NIVELES DE TOLERANCIA DEL GOSI- POL	12
II.6. EFECTO ANTIFERTILIZANTE	13
II.7. VITAMINAS	15
II.7.1. VITAMINA "E"	16
II.7.1. ESTRUCTURA DE LA VITAMI- NA "E"	16
II.7.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	18
II.7.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	20
II.7.4. SINTOMAS RELACIONADOS CON LA DEFICIENCIA DE VITAMI- NA "E"	21
II.7.5. VITAMINA "A"	25

II.7.6.	ESTRUCTURA QUIMICA	26
II.7.7.	PROPIEDADES FISICOQUICAS DE LA VITAMINA "A"	27
II.7.8.	FUNCION BIOLOGICA DE LA VITAMINA "A"	30
III.	OBJETIVO	33
IV.	HIPOTESIS	34
V.	MATERIALES Y METODOS	35
V.1.	MATERIAL BIOLOGICO	35
V.2.	PLAN DE TRABAJO	37
V.3.	OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS	40
V.4.	METODO DE EXTRACCION DE VITA- MINAS EN LOS TEJIDOS	41
V.5.	DETERMINACION DE VITAMINA "E" EN LAS MUESTRAS DE TEJIDO Y SUERO	42
V.6.	DETERMINACION DE β -CAROTENOS Y VITAMINA "A" EN LAS MUESTRAS ANA- LIZADAS	46
VI.	RESULTADOS	50
VII.	DISCUSION	58
VIII.	CONCLUSIONES	61
IX.	BIBLIOGRAFIA	63

I. INTRODUCCION

En los últimos años se ha utilizado con mayor frecuencia la harina de semilla de algodón en la producción de alimentos balanceados para animales, ya que se ha encontrado que es una fuente rica de proteínas (45%) de bajo costo y de alto nivel nutricional. Sin embargo la utilización de la harina de semilla de algodón se ve restringida, debido a que ésta contiene un compuesto tóxico llamado gossipol. Recientemente se observó que dosis subtóxicas producen infertilidad en machos, aparición de compuestos lipofuscínicos e inhibición de la enzima deshidrogenasa láctica, involucrada en el metabolismo energético de los espermatozoides.

Por otra parte la vitamina "E" es un factor esencial en las dietas y se sabe que su deficiencia produce en ratas macho y hembras entre otros síntomas esterilidad, aparición de pigmentos lipofuscínicos y disminución de la actividad de la deshidrogenasa láctica.

Tomando en cuenta las características y alteraciones fisiológicas que causa la deficiencia de vitamina "E" y la presencia de gosipol y conociendo la condición de que ambos son fuertes antioxidantes, se planteó la posibilidad de que el gosipol se encontrará en competencia en el organismo con la vitamina "E", produciendo una sintomatología similar a una deficiencia de vitamina "E".

Además se sabe que existe una relación significativa entre la vitamina "E" y la vitamina "A" como es el hecho de que con la falta de vitamina "E" disminuye la absorción de vitamina "A", y dado que la presencia de gosipol en la dieta pudiera provocar una deficiencia de vitamina "E" se decidió determinar el contenido de vitamina "A" y "E" en diversos tejidos de ratas alimentadas con dietas a base de harina de semilla de algodón.

II. ANTECEDENTES

II.1. SEMILLA DE ALGODON

Una de las plantas de mayor importancia económica es la del algodón, la cual pertenece al género *Gossipium*, perteneciente a la familia de las malvaceas, y cuyo cultivo se emplea básicamente para la obtención de fibras con las cuales se elaboran productos textiles de gran utilidad, sin embargo ésta no es su única utilidad ya que la semilla de algodón es una oleagínosa, de la cual se extrae aceite comestible. Después de dicho proceso se obtiene un subproducto importante al que se le

denomina "torta de semilla de algodón", que se utiliza actualmente como un suplemento proteínico de dietas balanceadas para animales (1).

Esta es rica en grasa y proteínas lo que le confiere un gran valor nutritivo.

En análisis hechos a la semilla de algodón se ha encontrado que ésta es rica en proteínas, alrededor del 26% de proteína cruda y dado que el algodón crece bien en zonas tropicales y subtropicales dando una buena producción, diversos autores han propuesto a ésta torta residual como una de las fuentes de proteína adicional más prometedoras en la prevención de la desnutrición humana. (2, 7)

Se han realizado diversos estudios en diferentes instituciones sobre la posible utilización de la harina de semilla de algodón en la alimentación humana por ejemplo: en el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), se ha elaborado la "incaparina", que es un alimento que contiene un 38% de harina de semilla de algodón (3). Los resultados obtenidos demostraron que el uso de esta harina en la alimentación de niños pequeños bajo control médico durante dos años, produjo una disminución de la desnutrición proteínica. En el mismo Instituto se desarrollaron alimentos suplementados con las proteínas de la harina de semilla de algodón y semilla de leguminosas, dentro del programa llamado mezclas vegetales para consumo humano. (4)

Una de las características que presenta la almendra de esta semilla es la presencia de ciertas glándulas en las cuales se encuentran

un pigmento amarillo llamado gosipol.

Desafortunadamente la presencia de este compuesto natural ha sido una limitante para la utilización de la semilla, ya que produce daños en los animales monogástricos. (1, 5, 6, 7, 8, 9)

II.2. PROPIEDADES QUIMICAS DEL GOSIPOL

El gosipol es un compuesto polifenólico amarillo cuya fórmula molecular determinada por Clark en 1928 es $C_{30}H_{30}O_8$, su nombre químico es 1,1',6,6',7,7'-hexahidroxí-5,5'-diisopropil-3,3'-dimetil-(2,2'-binaftaleno)-8,8'-decarboxialdehído, de peso molecular 518.5 obtenido por Carruth, compuesto polimórfico ya que al cristalizar en éter su punto de fusión es de 184°C, en cloroformo a 199°C y en la glicerina funde a 214°C.

El gosipol es soluble en los disolventes orgánicos comunes y su cristalización es rápida. También es soluble en soluciones alcalinas y se oxida rápidamente en presencia de aire, con cloruro férrico da un color verde oscuro y con ácido sulfúrico un color rojo brillante.

El gosipol reacciona con dos moléculas de anilina y paralelamente con otras aminas primarias aromáticas dando una coloración amarilla, ésta característica se aprovecha para su medición.

Se han postulado tres formas tautoméricas para tratar de explicar el comportamiento químico del gosipol, llamadas hemicetal, hidro

xialdehído y quinoide, la forma que se presenta en mayor proporción es la de aldehído fig. 1.

La molécula de gosipol contiene grupos hidróxidos y dos grupos aldehídos lo que le confiere una fuerte acidez y reactividad alta para la formación de ésteres y éteres (5, 9, 11). Los grupos aldehídos del gosipol reaccionan con diversas aminas formando derivados estables, forma bases de Schiff con aminas aromáticas así como también reaccionan con algunos metales como fierro y arsénico, lo cual demuestra la reactividad de la molécula. Es insoluble en agua pero forma sales en presencia de soluciones alcalinas.

Los cristales de gosipol deben de protegerse del oxígeno y la luz.

II.3. OBTENCION DEL ACEITE DE SEMILLA DE ALGODON

Debido a la gran cantidad de aceite que contiene la semilla de algodón, no resulta práctico su transporte a grandes distancias por lo que su procesado se efectúa en fábricas situadas en las regiones productoras. (7, 82)

En la figura II se muestra el proceso de extracción del aceite de semilla de algodón.

Existen pocos métodos de extracción de grasas y aceites.

Dentro de éstos se encuentran: extracción por presión y extracción por disolventes, con lo cual se obtiene el aceite crudo; el cual requiere de refinación posterior.

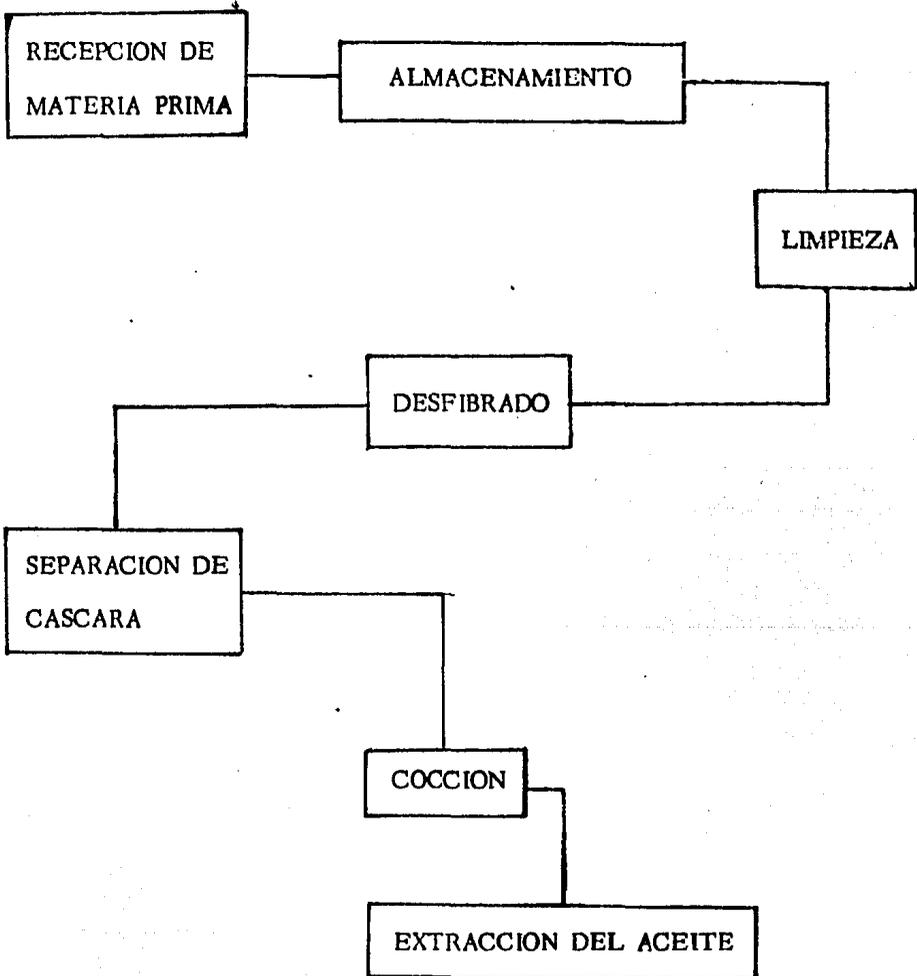


Fig. II Diagrama del proceso de extracción del aceite de semilla de algodón.

EXTRACCION POR MEDIO DE DISOLVENTE

En operaciones de gran escala, es muy común extraer el aceite de semilla de algodón quebrada a temperaturas bajas mediante un disolvente de grasa removible como es el hexano.

El disolvente pasa a través de las semillas y después de que se ha extraído el aceite, se recupera el disolvente mediante destilación y se vuelve a utilizar. La extracción por medio de disolvente tiene un mayor rendimiento.

En algunos procesos se utiliza la combinación del prensado seguido de la extracción por un disolvente para obtener la mayor eficiencia.

EXTRACCION CON PRENSA HIDRAULICA

Es un método bastante empleado en la extracción de aceite de semilla de algodón: la masa cocida se descarga directamente desde la marmita de cocción en un aparato formado de la torta. Las tortas formadas se van colocando en la prensa, la cual admite 15 tortas, o sea, aproximadamente 160 Kg de masa. La presión se aplica gradualmente y se eleva hasta 120-140 Kg/cm². Cuando el aceite empieza a fluir, se deja escurrir durante 20 a 45 minutos, después se secan las tortas se carga la prensa con nueva masa y se repite la operación.

Los bordes de las tortas, tienen un contenido elevado de aceite, se recortan y se vuelven a tratar.

Para cargar y descargar la prensa y hacer que empiece a fluir el aceite, se necesitan unos cinco minutos.

El aceite se extrae de las prensas y se deja reposar para separar una pequeña cantidad de materia sólida y se embarca en vagones, tanques con aceite crudo de semilla de algodón. El tratamiento posterior del aceite para obtener productos grasos comestibles se realiza en establecimientos distintos e independientes de las fábricas de aceites. (82)

II.4. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL GOSIPOL

La toxicidad de los alimentos formados con harina de semilla de algodón fue atribuida por los primeros investigadores a la presencia en la harina de colina, de betaína y a los pirofosfatos. Después del aislamiento del gopipol por Witheres y Carruth (5) de la harina de semilla de algodón se estableció que el gopipol es un compuesto definitivamente tóxico debido a su alta reactividad que lo hace participar dentro de los procesos bioquímicos, ocasionando daños en los seres vivos.

La presencia de gopipol en los concentrados proteícos de harina de algodón, da lugar a dos problemas básicos: el primero es que los niveles elevados de gopipol producen efectos fisiológicos desfavora-

bles y, el segundo es que la combinación química entre el gossypol y las proteínas causan una disminución de la disponibilidad de los aminoácidos (principalmente lisina) y por lo tanto, se disminuye la calidad nutricional de la proteína (9, 11). La unión con el gossypol baja la digestibilidad de la proteína. (5, 13)

En animales de experimentación los síntomas de toxicidad - del gossypol son muy variados y se manifiestan en orden decreciente en: cerdos, pollos, conejos, ratones y ratas. (7)

La administración de gossypol a ratas, causa pérdida de peso, del apetito, menor crecimiento, y se ha encontrado que la tolerancia al gossypol depende de la cantidad y calidad de las proteínas en la dieta.

Gallup encontró que las ratas alimentadas con una dieta baja en vitamina "A" son más susceptibles a los efectos del gossypol, al igual que si las dietas son deficientes en otras vitaminas pertenecientes al - grupo de las liposolubles como la vitamina "E". (5, 16)

Los tejidos que muestran daños cuando se encuentran dosis altas de gossypol en el organismo son el hígado, pulmones, corazón, tejido adiposo, riñones y bazo. (7, 10)

Los niveles altos de gossypol combinados en la sangre son debidos a la alta reactividad de la molécula la cual reacciona con la albúmina del plasma sanguíneo. Esto interfiere fuertemente en el transporte de oxígeno en la sangre, lo cual puede provocar fallas en el sistema circulatorio y en el último de los casos una hipertrofia del corazón cau-

sando la muerte

En los cerdos las anomalías que se presentan por la ingestión continua de gopiol en las dietas son: anorexia, pérdida de peso, diarrea, decoloración del pelo, llegando a producir la muerte dentro de los 38 a 79 días. (7,9)

El efecto principal del gopiol en los cerdos se debe a la formación de quelatos con el hierro del hígado, interfiriendo con la utilización normal del hierro en la síntesis de hemoglobina y las enzimas respiratorias. Este efecto puede ser contrarrestado con la adición de sulfato ferroso en las dietas. (9,13)

Se ha sugerido que el gopiol puede ejercer efectos tóxicos en aves de corral y en animales monogástricos por el desacoplamiento de la cadena respiratoria, ligada a la fosforilación oxidativa. (7,9,13,14)

Perros tratados con gopiol presentaron diarreas, anorexia, pérdida de peso, hemorragias internas, edema pulmonar y congestión en las vísceras.

En los animales monogástricos se ha clasificado la toxicidad en tres:

- a) aguda, en la que se presenta paro cardíaco
- b) subaguda, se presenta edema pulmonar
- c) crónica, el animal presenta desnutrición provocada por la administración prolongada de gopiol en pequeñas dosis contenidas en la dieta, llegando a producir la muerte.

Los síntomas más comunes por la ingestión de gosispol son: pérdida de peso, hipoprotinemia, diarrea, baja de hemoglobina, disminución de eritrocitos, edema pulmonar, cambios degenerativos en el hígado y bazo, irregularidad en el ritmo cardíaco, así como hemorragias en el hígado, estómago e intestino delgado (3). Se produce también desacoplamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, inhibiendo la producción de energía (5), observándose que el tratamiento con gosispol inhibe la actividad de la ATPasa del hígado y el testículo.

II.5. NIVELES DE TOLERANCIA DEL GOSIPOL

Estos niveles se encuentran asociados con la especie animal de que se trate, la vía de administración, la cantidad de mineral y proteínas en la dieta, la dosis que se acumule en forma de gosispol libre y la manera como se suministra. Su toxicidad se ve aumentada cuando se administra por vía intravenosa o intraperitoneal. (1, 5, 9)

Con base a una dosis suministrada oralmente a ratas se encontró que administrada en agua la dosis letal media (L_{D50}) era de 2,400 a 3,340 mg/Kg; para ratones de 500 a 950 mg/Kg; en conejos de 350 a 600 mg/Kg y, para cerdos de 250 a 600 mg/Kg. Cuando la dosis de gosispol era administrada en aceite su toxicidad se veía aumentada en un 10%. (5)

En los Estados Unidos la máxima concentración de gosispol permitida en harina de semilla de algodón para consumo humano es de

0.045% de gopipol libre, con esta cantidad no se ha observado efectos nocivos. (7)

Las recomendaciones internacionales fijan menos de 0.06% de gopipol libre y 1.2% de gopipol total. (5,7,9)

II.6. EFECTO ANTIFERTILIZANTE

El efecto antifertilizante del gopipol en animales machos se puso de manifiesto en la República Popular China en 1978, gracias a estudios epidemiológicos en el cual se vio que en ciertas áreas se presentaba un mayor número de casos de infertilidad en humanos. Inicialmente se pensó que se debía a factores ambientales, también se propuso que el agente causal estuviera en los alimentos. Luego de realizar algunas investigaciones se llegó a la conclusión de que el aceite de semilla de algodón era el causante, ya que un punto importante era que se había cambiado el proceso de obtención del aceite. Primero se hacía la extracción calentando previamente las semillas y se cambió a un proceso en el cual se suprimía dicho calentamiento. Después de la ingestión de este aceite de semilla de algodón crudo por períodos mayores a un año, se presentó infertilidad en los hombre, lo cual resultó reversible al dejar de ingerir aceite crudo de semilla de algodón. (8,9)

Estas observaciones dieron lugar a investigaciones más profundas sobre el gopipol como posible agente antifertilizante y se iniciaron

diversos estudios. Estos se hicieron utilizando gosalol puro, ácido acético-gosalol y ácido fórmico-gosalol preparados para análisis clínicos. Después de una administración oral de gosalol o de ácido acético-gosalol en dosis de 15 a 40 mg/Kg día durante 2 a 4 semanas a ratas macho, éstas se hicieron infértiles (17). El lograr la infertilidad en un tiempo determinado va a depender de la dosis aplicada y de la cantidad de gosalol absorbido.

En estos experimentos también se observó que después de la administración de gosalol tenían lugar una serie de cambios citológicos en el epitelio seminífero de los testículos de las ratas. Dentro de los cambios observados están, la aparición de vacuolas en el núcleo de los espermatozoides, hinchamiento de las espermátidas, daños en los espermatoцитos, formación de las células gigantes multinucleadas derivadas de las espermátidas y los espermatoцитos, así como descamación de las células del epitelio. (18)

En el epidídimo se encontraron espermátidas y espermatozoides exfoliados y numerosos espermatozoides muertos, muchos de los cuales tenían cabeza y colas separadas. La cuenta de espermatozoides, fue disminuyendo hasta llegar a la azoospermia. (19,20)

En 1972 el gosalol se empleó clínicamente por primera vez como un agente antifertilizante para hombres, se administró a 4,000 chinos con buena salud, por períodos mayores de 6 meses, en algunos de los casos se logró seguir el tratamiento durante 4 años. La dosis utili-

zada fue de 20 mg/día, durante 6 meses. En los exámenes de semen se encontró una eficacia de 99.89% de azoospermia; mostrando también una baja movilidad, menos de 4 millones de espermatozoides por ml, la cuenta de espermatozoides disminuye hasta alcanzar la azoospermia. Además de estos efectos se encontró también espermatozoides, espermátocitos multinucleados exfoliados, espermatozoides con alteraciones ultraestructurales como acrosomas dañados, nucleoplasma menos condensado, desarreglo e hinchamiento de la membrana interna de la mitocondria como una disminución de la deshidrogenasa láctica en la parte media del espermatozoide. Existe una influencia también sobre la enzima adenosin trifosfatasa, lo que afecta directamente la movilidad del espermatozoide. (15, 21)

En investigaciones realizadas con ratas se ha observado que la ingestión de gossipol produce una disminución de los niveles de las hormonas testosterona y luteinizante en el suero, las que se encuentran involucradas en la maduración final de los espermatozoides. (22)

II. 7. VITAMINAS

A principios de este siglo, se descubrieron y se aislaron algunos factores químicos que eran indispensables para el buen funcionamiento del cuerpo humano. En 1912 Casimir Funk aisló una fracción del arroz que curaba el beriberi, y debido a que este factor tenía propiedades de

amina lo llamo vitamina (vital amine) que significa -amina indispensable para la vida- Este término es actualmente erróneo ya que no todas las vitaminas tienen estructura de amina, aunque el uso de esta palabra se ha generalizado para este grupo de compuestos.

Las vitaminas no pertenecen a un grupo específico de compuestos, son generalmente complejas en su estructura química y muy diferentes entre sí. Debido a esto no se han podido clasificar con base a su estructura o composición química, sin embargo se han clasificado de acuerdo con su solubilidad y así tenemos el grupo de las vitaminas liposolubles y de las hidrosolubles.

Dentro de las vitaminas liposolubles, se encuentran la A, D, E, y K. Serán objeto de estudio en el presente trabajo las vitaminas "E" y "A".

VITAMINA "E"

II.7.1. ESTRUCTURA DE LA VITAMINA "E"

La vitamina "E" se ha determinado como un nutriente esencial para los animales y el hombre, ya que ésta no puede ser sintetizada por el organismo (26, 27, 31, 32), por lo que es necesario ingerirla por medio de los alimentos. Este factor indispensable se describió como una sustancia liposoluble, necesaria para la reproducción de las ratas

por Evans y Bishop (26, 27, 31, 32), al que le llamaron inicialmente factor "X", al cual posteriormente se le designó la letra "E" en 1924. (26)

Evans le dió el nombre de "Tocoferol" que significa Toco - "alumbramiento", Fero "traer hasta fuera" y la terminación "ol" para determinar un alcohol.

La elucidación de su estructura, ha resultado ser un problema complejo, debido a que muchos compuestos presentan estructuras similares, por lo que los investigadores han dividido a estos compuestos en dos grupos: tocoles y tocotrienoles. Cuyas estructuras se muestran en las figuras III y IV.

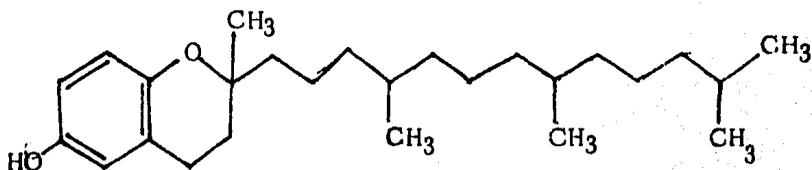


Fig. III Toco (2-metil-2-(4', 8', 12'-trimetildecil)-croman-6-ol).

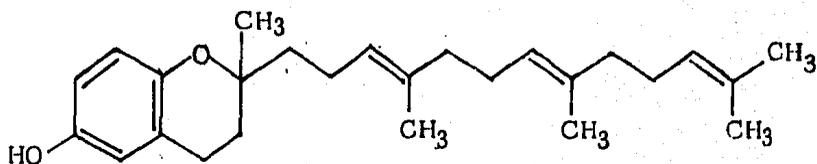


Fig. IV Tocotrienol (2-metil-2-(4', 8', 12'-trimetiltrideca-3-7-11-trienil)-croman-6-ol).

Los tocotrienoles difieren de los tocoles en que poseen tres dobles enlaces en su cadena isoprenoide lateral.

Los tocoferoles son el resultado de la substitución de uno o más grupos metilo en las posiciones 5,7 y 8 del tocol o del tocotrienol. (31-33)

Por medio de la cromatografía de capa fina fue posible separar e identificar por Evans dos formas: el α y β (27,31,32). Después de él otros investigadores han aislado μ y δ tocoferol. (27)

Las estructuras químicas de los tocoferoles y algunas de sus características físicas son descritas en la tabla 1.

II.7.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

1. Aceites viscosos de color amarillo pálido.
2. Liposolubles: se disuelven con facilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos.
3. Se oxidan rápidamente en presencia de alcali; estables en ácidos.
4. Estables al calor y alcali en ausencia de oxidantes.
5. Estables a la luz visible, pero no se destruyen por luz ultravioleta.
6. Antioxidantes efectivos, debido al grupo hidrofénolico libre.
7. Fácilmente oxidables por varios agentes químicos, incluidos los iones férricos, cúprico, cérico y nitrato.

Tocoferol	Estructura	Formúla Empírica	Peso Molecular	Absorción en alcohol	
				Máx., nm	$\frac{1\%}{E_1 \text{ cm}}$
α	5,7,8-Trimetiltocol	$C_{29}H_{50}O_2$	430	292	70-73.7
β	5,8-Dimetiltocol	$C_{29}H_{48}O_2$	416	297	86-87
γ	7,8-Dimetiltocol	$C_{29}H_{48}O_2$	416	298	90-93
δ	8-Metiltocol	$C_{27}H_{46}O_2$	402	298	91.2
ϵ	5,8-Dimetiltocotrienol	$C_{28}H_{42}O_2$	410	-	-
ζ_1	5,7,8-Trimetiltocotrienol	$C_{29}H_{44}O_2$	424	-	-
ζ_2	5,7-Dimetiltocol	$C_{28}H_{48}O_2$	416	-	-
η	7-Metiltocol	$C_{27}H_{46}O_2$	402	-	-
-	5-Metiltocol	$C_{27}H_{46}O_2$	402	-	-

Tabla 1. Propiedades físicas de los tocoferoles.

Todos los tocoferoles naturales encontrados en las plantas resultan ser de la forma "D" ópticamente activa, el más abundante es el α -tocoferol forma que se considera básica por su mayor actividad biológica (27,33). Sin embargo, las investigaciones realizadas demuestran que la naturaleza presenta diversas formas de tocoferol con actividad biológica diferente, como por ejemplo: En el germen de trigo se encuentra α , β y γ tocoferol, (26,27). Otras fuentes son la lechuga, las hojas de alfalfa, germen de arroz y maíz, así como semillas oleaginosas que también muestran tener tocoferoles con actividad de α -tocoferol.

II.7.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Debido a que no existe un solo tipo de vitamina "E" ha sido difícil determinar su actividad biológica. Los investigadores no están de acuerdo sobre las funciones fisiológicas precisas de la vitamina "E". Su función principal según algunos de ellos, es la de ser un antioxidante biológico o fisiológico que puede ser substituida por ciertos antioxidantes sintéticos (difenil-p-fenilendiamino y etoxiquino) (26). Su actividad a nivel celular es la de proteger y prevenir los daños causados por la peroxidación de las células y los elementos subcelulares, ya que disminuye la formación de peróxidos que atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de las membranas celulares, reduciendo grandemente la

cantidad de vitamina "E" requerida para mantener la integridad de estas membranas.

Hasta hace poco, los estudios revelaban que muchos síntomas de la carencia de vitamina "E" se producían en presencia de ácidos grasos poliinsaturados. (32)

Experimentación animal revela que los requerimientos de vitamina "E" aumentan al elevar el consumo de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el ácido linoléico (81). Por lo que se requiere mayor cantidad de vitamina "E" para proteger las membranas celulares del daño oxidativo (26, 27, 32, 81) además, también se ha encontrado una íntima relación entre la vitamina "E" y el selenio en la prevención de los daños causados por la peroxidación de las membranas celulares al parecer la vitamina "E" se encuentra en la primera línea de defensa contra la peroxidación de los fosfolípidos de las membranas, pero aún con una vitamina "E" adecuada algunos peróxidos son formados. El selenio en la glutatión peroxidasa constituye una segunda línea de defensa que destruye estos peróxidos antes que tengan la oportunidad de causar daños en las membranas. (26, 27, 32, 42, 47)

II.7.4. SINTÓMAS RELACIONADOS CON LA DEFICIENCIA DE VITAMINA "E"

Las enfermedades provocadas por la deficiencia de vitamina -

"E" y sus homólogos pueden ser asociados con ciertos desordenes en el sistema reproductivo de los vertebrados, el músculo esquelético, el sistema nervioso, tejido hematopoyético y el hígado. (32)

Algunos de estos aspectos patológicos se describen a continuación:

Degeneración testicular

Se ha observado por experimentación en animales que la deficiencia de vitamina "E", provoca una atrofia en el epitelio germinal en ratas macho, alimentadas con una dieta carente de vitamina "E" durante períodos prolongados (18 meses) (32). Similares efectos se presentan en hamster, cobayo, conejo, perro, chachos y cerdos. (26, 27, 30, 40-45)

El período en que se presentan cambios histopatológicos en testículo se encuentra entre los 50 y 100 días después de haber alimentado ratas con una dieta deficiente en vitamina "E". Los daños histológicos en el epitelio germinal son: descamación de las células germinales, aglutinación y desintegración del núcleo del espermatozoide maduro, espermátidas y espermatocitos. (32)

Otros de los estudios realizados en testículos de ratas alimentadas con una dieta deficiente de vitamina "E" presentan una disminución en la síntesis de citrato a nivel testicular, sin que haya cambios degenerativos histológicos. (41)

Degeneración embrionaria

Evans encontró que la deficiencia de vitamina "E" en ratas -

hembras provoca una reabsorción y muerte del feto (26, 27, 29, 32, 40), efecto que también ha sido observado en ratones, cerdos y cuyos.

Además en pollos y pavos se ha visto que existen daños degenerativos en el embrión, por ejemplo ojos salientes y cataratas. (32)

Encefalomalacia

La deficiencia de tocoferoles en la dieta provoca en pollos - encefalomalacia que es una enfermedad aguda en el sistema nervioso - central, produciendo una maduración incompleta del cerebro. (26, 40, 41)

Estudios realizados en niños se informa la presencia de dicha enfermedad por hidroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en el tejido cerebral. (32)

Degeneración muscular

La degeneración muscular también llamada destrofia muscular causada por una falta en la dieta de vitamina "E", se caracteriza por - degeneración hialina (aspecto de vidrio) de los músculos esqueléticos, - cardíaco y estómago, acompañada de una disminución del fosfato de creatinina, necesaria para la respiración de la célula muscular. (27, 30, 41, 44)

Los síntomas son: rigidez, marcha vacilante y a veces paro cardíaco (30). Se presenta en ratón (44), ratas, cobayo (40-44), conejo (27, 30, 40-45): en el cual se encuentra una elevada actividad de aldolasa en suero, dicha elevación se encuentra asociada con el desarrollo de la destrofia muscular en un período de 1 a 2.5 semanas en pollos (27, 43-45), cerdos (30, 44, 45), perro, cabra, cordero (enfermedad del músculo

blanco) y, en el mono (30).

El primer sitio de acción según los investigadores, es el tejido conectivo (45). Y se ha demostrado que los factores que contribuyen a esta degeneración muscular son la insuficiencia de selenio (27, 43, 46, 47) y/o aminoácidos sulfurados y/o exceso de ácidos grasos poliinsaturados. (27, 32)

Diatesis Exudativa

La diatesis exudativa fue descubierta por Dan y Glavin en pollos que recibían una dieta deficiente en vitamina "E" que no mostraban signos de encefalomalacia, pero desarrollaban una severa condición edematosa, caracterizada por una acumulación de fluido plasmático en el tejido subcutáneo (26). Este aumento en la permeabilidad capilar no sólo se ha encontrado en pollos (26, 43) sino también en cerdos (32), como producto de una falta de vitamina "E" en la dieta.

Degeneración Necrótica del Hígado

La degeneración necrótica del hígado asociado a la falta de vitamina "E" causa lesiones hepáticas a nivel histopatológico, puesto que propicia un mayor ataque de los radicales libres a las membranas lipoprotéicas desprotegidas, la mayor parte de estas lesiones aparecen como una acumulación de pigmentos lipofuscínicos, que es una de las respuestas celulares más comunes a la falta o deficiencia de vitamina "E". (48)

La cantidad de lipopigmento encontrados en las células de ani

males es variable dependiendo de cada especie. Se han estudiado en -
pollo, ratas, ratón y cerdo. (32, 48)

II.7.5. VITAMINA "A"

La existencia de la vitamina "A" fue puesta de manifiesto en 1913 por McCollum y Davis quienes observaron la presencia de un factor esencial en ciertas grasas capaz de ayudar al crecimiento de ratas. Se le llamó factor "A" soluble en grasas para diferenciarlo del factor "B" soluble en agua. Durante las dos décadas siguientes la información encontrada acerca de este nutriente fue obtenida gracias al trabajo de varios investigadores como Osborne, Mendel, Stepp, Stcenback.

Se ha demostrado que los vertebrados requieren de vitamina "A". Una deficiencia en la dieta puede provocar xerofalmia, ceguera nocturna (31, 32, 50-53), atrofia de los tejidos epiteliales (32, 51). Además participa en el ciclo visual. (51, 54)

La vitamina "A" se ha encontrado en forma natural, sólo en animales y se aísla de la fracción insaponificable de las grasas (31). En hígado en donde se encuentra la mayor cantidad (55-57), aunque se encuentran cantidades significativas en otros tejidos, como testículo, corazón, riñon, pulmón, músculo, páncreas, próstata y tiroides. (54)

La vitamina "A" disponible al organismo humano proviene de tres fuentes. La primera de éstas son los carotenos que el individuo

ingiere en los vegetales y frutas (59,61) y que en el hígado se convierten en vitamina "A". La segunda fuente son algunos productos animales y representan la vitamina "A" producida por estos animales de los carotenos ingeridos en su dieta. Dentro de esta forma de obtención se encuentra la leche y sus derivados, huevos, hígado y grasas animales de varios tipos y la tercera de las fuentes de vitamina "A" son los aceites de hígado de pescado que representan las reservas de la vitamina "A". (31,51)

II.7.6. ESTRUCTURA QUIMICA

La constitución química de la vitamina "A" fue establecida por los trabajos de Kerrer y sus colaboradores, quienes propusieron la siguiente fórmula en 1931, (50) figura V.

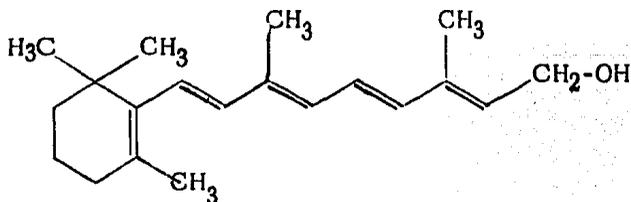


Fig. V

La vitamina "A" se presenta en dos formas esteroisoméricas, la vitamina "A₁", o retinol, que es la forma más común en los tejidos de los mamíferos y los peces marinos, y la vitamina "A₂" o retinol común en los peces de agua dulce y en concentrados sintéticos, llamadas

transvitamina "A" y neovitamina "A" respectivamente. Sus propiedades químicas son muy parecidas y sus actividades biológicas son similares: pero difieren ligeramente en su absorción espectrofotométrica. Ambos son compuestos isoprenoides que contienen un anillo carboxílico de seis miembros y una cadena lateral de once átomos de carbono se mostró en la figura V. (31)

Su forma predominante en la naturaleza es la de un éster - más que la de un alcohol libre. (31,61)

II.7.7. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA VITAMINA "A"

1. Son agujas de color amarillo.
2. Solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, insoluble en agua.
3. Se destruye por la luz ultravioleta.
4. Es sensible a la oxidación del aire.
5. Estable al calor en una atmósfera inerte y soluciones alcalinas.
6. Las preparaciones cristalinas son inestables al calor.
7. Una característica importante es su capacidad para formar con el tricloruro de antimonio un producto de reacción de color azul con un máximo de absorción de 620 nm.

La vitamina "A" sólo tiene actividad biológica cuando su estructura química se encuentra totalmente en configuración trans, y las formas químicas que pueden adquirir son de alcohol (retinol), de aldehído (retinal), de ácido (ácido retinóico) y esterificada principalmente con el ácido palmítico.

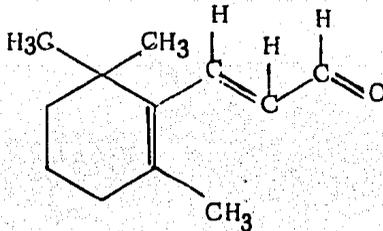
Desde el punto de vista de nutrición humana y animal, los pigmentos carotenoides son de gran importancia debido a la conversión de algunos de ellos en vitamina "A". Para ello se requiere primero que suceda una reacción de oxidación que transforma el β -caroteno en dos moléculas de retinil-aldehído por la enzima β -caroteno-15,15'-dioxygenasa, la cual actúa en la ligadura central produciendo retinaldehído que es reducido a retinol por la retinaldehído reductasa. El retinol es finalmente almacenado en el hígado en forma de palmitato (50). Estos pigmentos que se encuentran en las plantas amarillas y verdes junto con la clorofila son polienos que pertenecen a cuatro grupos principales:

1. Los carotenos, hidrocarburos carotenoides, $C_{40}H_{56}$ que incluyen α , β y γ -carotenos y el licopeno
2. Las xantófilas son oxí e hidroxiderivados de los carotenos, e incluyen entre otros a la criptoxantina, $C_{40}H_{54}(OH)_2$.
3. Los ésteres xantofílicos, que son ésteres de xantofilas con ácidos grasos.
4. Los ácidos carotenoides, que son derivados carboxílicos de los carotenos.

La estructura de los pigmentos carotenoides se caracteriza por la cadena alifática con grupos metilo insertados y un sistema de dobles enlaces conjugados que son los responsables de color rojo y amarillo intenso de dichos compuestos. Los grupos terminales de la cadena alifática varían en los distintos carotenoides y determinan la actividad de la vitamina "A", así como las diferentes solubilidades que se toman como base para su separación.

La isomerización cis-trans provocada por el sistema de dobles enlaces conjugados produce gran número de esteroisómeros los cuales difieren entre sí en potencia biológica y en ciertas propiedades físicas, tales como la capacidad de adsorción y espectros de absorción.

Los carotenoides provitamínicos contienen un anillo de β -ionona a uno o en ambos lados de la cadena poliénica, como se muestra a continuación.



β -ionona

Figura VI

En general el término vitamina "A" es reservado para designar cualquier sustancia o mezcla de sustancias que muestran actividad biológica, se expresa generalmente en Unidades Internacionales (UI) (valor arbitrario designado por la farmacopea de los Estados Unidos (USP), donde 1 UI ha sido designado como el equivalente a 0.6 g de β -caroteno. (31, 50, 61)

En general, las provitaminas "A" tienen las siguientes características físicas y químicas:

1. Son solubles en grasas.
2. Se disuelven fácilmente en cloroformo, benceno, disulfuro de carbono, éter de petróleo; pero difícilmente en alcohol.
3. Sensibles a la oxidación, autooxidación a la luz.
4. Se mantienen estables al calor en atmósfera libre de oxígeno, excepto por algunos cambios estereoisómeros.
5. Tienen espectros de absorción característicos, íntimamente relacionados unos con otros, observándose una variación de los máximos de absorción con el solvente empleado.

II.7.8. FUNCION BIOLÓGICA DE LA VITAMINA "A"

La vitamina "A" como se dijo anteriormente sólo tiene actividad biológica cuando su estructura química se encuentra en configuración trans. Aunque su función biológica no es del todo conocida, se sabe que

una de ellas es su participación en la formación del pigmento visual - llamado rodopsina (11-cis-retinol-opsina) que es esencial para que el proceso de la visión pueda efectuarse. La forma 11-cis-retinol de la vitamina "A" se combina con la proteína opsina; ésta a su vez se transforma de configuración cis en trans debido a la acción de la luz, rompiéndose la molécula y produciendo opsina y el retinol trans correspondiente. Este se isomeriza al 11-cis-retinol a través de una enzima isomerasa haciendo cíclico el proceso de transformación de la vitamina "A". Figura VII

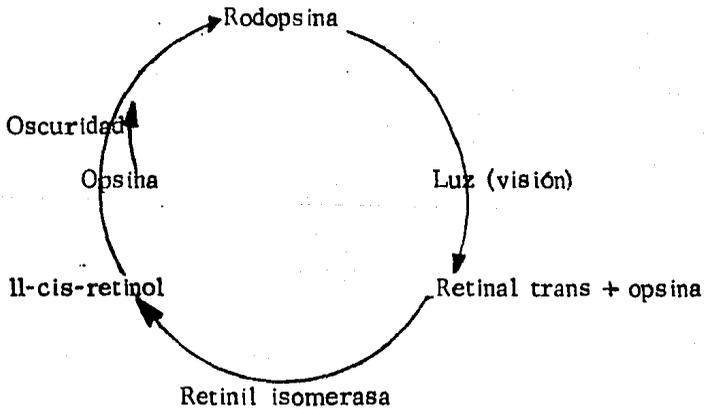


Figura VII

Otra función de la vitamina "A" es su participación durante la etapa de crecimiento la cual ha sido debidamente demostrada, puesto que su falta en la dieta provoca un retardo en el desarrollo del organismo. (62)

Se encuentra bien establecida su participación en la regulación de la diferenciación epitelial. Observaciones realizadas por Fell demuestran el papel esencial que juegan en la diferenciación celular. (63-65)

Participa en el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis (54, 58). Esto ha sido demostrado por las investigaciones de Palludan en las que aplicó directamente retinol a testículo de cerdos con deficiencias de vitamina "A", en los cuales observó una reparación total del epitelio testicular. (63, 66)

Sin embargo también se han llevado a cabo diversos estudios en los cuales han demostrado su relación con el colesterol. En ellos se ha visto que la vitamina "A". a) previene la acumulación de colesterol en suero e hígado de ratas que consumen una dieta alta en colesterol (67, 68); b) retarda la hipercolesteremia en pollos y conejos; y c) reduce significativamente los niveles de colesterol en sueros en pacientes con arterosclerosis. (68)

III. OBJETIVO

Determinar el contenido de vitamina "A" y "E" en diversos tejidos (hígado, testículo, músculo y corazón) de ratas alimentadas con una dieta balanceada a base de semilla de algodón como aportador principal de proteína.

IV. HIPOTESIS

El gosipol es un antioxidante fuerte que produce infertilidad en machos, acumulación de pigmentos lipofuscínicos, e inhibe enzimas involucradas en el metabolismo energético como la deshidrogenasa láctica. Por otra parte se ha demostrado que la deficiencia de vitamina "E", al menos en animales de experimentación produce infertilidad tanto en machos como en hembras, disminución de la deshidrogenasa láctica y que también es un fuerte antioxidante.

Es posible que el gosipol esté actuando en forma competitiva con la vitamina "E", de ahí que la ingestión de gosipol dé un cuadro similar, a cuando existe una deficiencia de esta vitamina: por lo tanto un exceso de vitamina "E" deberá contrarrestar los efectos del gosipol,

V. MATERIALES Y METODOS

V. I. MATERIAL BIOLÓGICO

Animales:

Se utilizaron 36 ratas machos Sprague-Dawley recién destetadas (21 días de edad), proporcionadas por el bioterio del Centro Médico Nacional del IMSS. Estos animales se mantuvieron en las condiciones que existen en este bioterio los cuales son: un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas c/u, temperatura 21°C, humedad relativa de 45 a 50% y diez a quince cambios de aire por hora.

Vitaminas:

-Estandar de Palmitato de vitamina "A". 1,771,186.00 UI -
con una pureza de 63.38% (Productos Roche, S.A., de C.V.).

-Estandar de vitamina "E" libre (α -tocoferol) con un pureza
del 54.22% (Productos Roche, S.A., de C.V.).

-Trans- β -caroteno 1,600,000.00 UI. de vitamina "A" (Sigma
Chemical Company San Louis Mo. USA).

-Todos los demás reactivos fueron de la casa Merck A.G. -
Darmstadt, Germany.

De los componentes de la dietas se indica su procedencia en
las tablas de comparación.

Dietas basales:

Se elaboraron las siguientes 3 dietas cuya composición se -
muestra en la tabla 2. Estas dietas fueron isocalóricas y al 23% de -
proteína.

1. Caseína
2. Caseína sin vitamina "E"
3. Caseína más exceso de vitamina "E"

Tabla 2. Composición de las dietas

Nutrimento	g/100 g de dieta		
	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Caseinato de Calcio ¹	13.1	13.1	13.1
Leche en polvo	32.8	32.8	32.8
Sacarosa ²	1.4	1.4	1.4
Dextrina ³	25.0	25.0	25.0
Acelte	3.8	-	3.8
Sales minerales ⁴	7.2	7.2	7.2
Mezcla de Vitaminas ⁴	2.0	2.0*	2.0
Celulosa ⁴	14.7	14.7	14.7
Lardo	-	3.8	-
Vitamina "E"	-	-	0.1

*Sin vitamina "E"

1) Novog-Infancia, S.A., México, D.F., 2) Merck de México, 3) Aranal, S.A., 4) Las sales minerales de Rogers and Harper (92), la mezcla de vitaminas de Teklad Test Diets, y celulosa Fiber Cellulose Type de Teklad Test Diets, Madison Wis.

V.2. PLAN DE TRABAJO

Este consta de 3 periodos: Mantenimiento, Tratamiento y Recu-

peración.

Para el período de mantenimiento los 36 animales se distribuyeron en 3 grupos: el grupo 1, integrado por 20 animales, alimentados con la dieta 1, grupo 2 y 3 con 8 ratas c/u, alimentados con sus dietas respectivas.

Se colocó cada rata debidamente marcada e identificada en una jaula individual con agua y se alimentaron ad libitum, con su dieta correspondiente durante 8 semanas.

Una vez terminado este período, se inició el de "tratamiento" en el cual los animales fueron distribuidos de la forma siguiente: - el grupo 1 se dividió en 3 subgrupos: uno siguió siendo el grupo control con 8 animales, alimentados con su dieta 1. Con los animales restantes, se formaron los grupos 4 y 5 con 6 animales c/u, a los cuales se les administraron las dietas 4 y 5 respectivamente, a los grupos 2 y 3 se siguió administrando las dietas respectivas. La composición de las dietas de tratamiento se muestran en la tabla 3. Durante este período de 6 semanas los animales se mantuvieron en las condiciones iniciales del bioterio, así como el suministro de alimento y agua fue ad libitum.

Dietas de Tratamiento

1. Dieta 1 (Control)

2. Caseína sin vitamina "E"
3. Caseína más exceso de vitamina "E"
4. Harina de semilla de algodón*-Caseína
5. Harina de semilla de algodón*-Caseína más exceso de vitamina "E".

*La cantidad de proteína (10%) se encuentra en relación de 50% aportado por la harina de algodón y 50% restante por la caseína. La composición de estas dietas se dan en la tabla 3., y los proveedores de las materias primas son las mismas de la tabla 2.

Tabla 3. Composición de las dietas para el período de "Tratamiento"

	g/100 g de dieta				
Nutriente	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5
Caseinato de Calcio	5.7	5.7	5.7	2.8	2.8
Harina de Algodón	-	-	-	25.5	25.5
Leche en Polvo	14.2	14.2	14.2	7.1	7.1
Sacarosa	20.1	20.1	20.1	16.9	16.9
Glucosa	15.7	15.7	15.7	14.0	14.0
Dextrina	21.0	21.0	21.0	20.0	20.0
Manteca	7.7	-	7.7	3.1	3.1
Aceite	6.0	-	6.0	6.0	6.0
Lardo	-	13.7	-	-	-
Sales Minerales	3.2	3.2	3.2	2.6	2.6
Mezcla de vitaminas	2.0	2.0*	2.0	2.0	2.0
Celulosa	4.3	4.3	4.3	-	-
Vitamina "E"	-	-	0.1	-	0.1

Al término del tratamiento de seis semanas, se hizo el primer sacrificio de animales, tomando la mitad de cada grupo para la

determinación de la vitaminas "A" y "E". El resto de los animales - entraron a un período llamado de "recuperación", en el cual todos ellos fueron alimentados con Purina-Chaw durante 8 semanas, al cabo de este tiempo se sacrificaron los animales restantes para la determinación de vitamina "A" y "E"

V.3. OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

En cada sacrificio se anestesió a los animales con dos tipos de anestésicos combinados.

a) Droperidol: A este compuesto se le considera como un - neuroléptico lo cual significa que produce un estado de quiescencia con actividad motora reducida, e indiferencia al medio externo. Se utilizó una dosis de 0.100 g/100 g de peso.

b) Detalar o Clorhidrato de Ketamina. Este compuesto se - usa para inducir anestesia disociativa respecto al ambiente y además - produce analgesia prolongada. Este se utilizó en una dosis de - 8 mg/100 g de peso.

Se combinaron ambos compuestos para adormecer el animal y a la vez quitarle la sensibilidad al dolor. Se pesó el animal y de acuerdo a ello se calculó la dosis para inyectarlo. (83)

Una vez que el animal se encontraba bajo el efecto de la -

anestesia, se procedió a abrirlo a la altura del torax y con una jeringa esteril sin anticoagulante se extrajo la sangre, la mayor cantidad posible, directamente del corazón que aún latía. Inmediatamente después de extraerla se vació en tubos de ensayo y se centrifugaron a 1500 rpm en una centrífuga Internacional Model 10 PR-6 de International Equipment Co., a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Al sacar los tubos de la centrífuga se separó el suero con una pipeta pasteur y se congeló para la determinación posterior de vitamina "A" y "E".

Simultaneamente se hizo la disección del animal y se obtuvieron muestras de hígado, testículo, músculo y corazón, las cuales se pesaron y cortaron en pequeños trocitos, se les agregó agua destilada, (10 ml por cada gramo de tejido) para homogeneizarlos perfectamente con un homogenizador Evehhem, manteniendo los tubos de las muestras en hielo, para después congelarlas a -20°C hasta su análisis para la determinación de las vitaminas "A" y "E".

V.4. METODOS DE EXTRACCION DE VITAMINAS EN LOS TEJIDOS

Se realizó de acuerdo a la técnica sugerida por Alam Syed (39) con algunas variaciones para lo cual se tomó una alícuota de 7 ml de la muestra descongelada con una pipeta volumétrica: se colocó en un embudo de separación (previamente cubierto para proteger la mues-

tra de la luz) y se le agregaron 50 ml de agua bidestilada, agitándose fuertemente durante 30 segundos, luego se le adicionaron 30 ml de la mezcla de extracción (cloroformo-metanol 2:1), se agitó fuertemente durante 60 segundos dejándose reposar hasta observar separación de las dos fases. Esta operación se repite dos veces más. La fase acuosa se desechó, y la fase orgánica obtenida de las 3 extracciones se filtró sobre un embudo de filtración rápida en el cual se tenía una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro. realizada la operación anterior se evaporó el disolvente por corriente de nitrógeno para tener un volumen de 25.0 ml en el cual se realizaron las determinaciones de vitamina "A" y "E".

V. 5. DETERMINACION DE VITAMINA "E" EN LAS MUESTRAS DE TEJIDO Y SUERO

La determinación para vitamina "E" se realizó de acuerdo a la técnica de Hansen y Warwick (35), que es un método espectrofluorométrico. Este es un método extremadamente sensible para ensayos químicos de tocoferol libre y esterificado. Este método se basa en los tocoferoles libres, presentan fluorescencia. Basándose en esto Hansen y Warwick desarrollaron un micrométodo para cuantificar vitamina "E" en suero humano y en tejido adiposo (32,35). Muchas modificaciones y adaptaciones se le han hecho a este método para su aplicación en de-

terminaciones en tejido de rata.

Todos los ensayos espectrofluorométricos involucran cuantificar la fluorescencia de los extractos que contienen los tocoferoles que se determinan a 292 y 340 nm., de longitud de onda que presentan al máximo de excitación y de emisión respectivamente. Es de gran importancia seleccionar el disolvente apropiado para la preparación de la forma que presenta la mayor fluorescencia. Se requiere que se prepare una curva estándar en sistema igual al de la muestra para cuantificar el contenido de vitamina "E". El procedimiento fluorométrico presenta ventajas puesto que es un método simple, rápido, exacto, y extremadamente sensible y no presenta la interferencia de carotenos, vitamina "A" y otros compuestos comunmente asociados con los tocoferoles en extractos de lípidos crudos.

El material de vidrio que se empleo para esta técnica se sometió a un prelavado, con un agente limpiador inorgánico (ácido nítrico 3 N) y se enjuagó varias veces con agua de la llave y 5 veces con agua bidestilada (27,35). El material se secó en el horno a 100°C.

Los tubos de centrífuga de 15 ml de capacidad fueron protegidos de la luz.

El hexano utilizado fue recién destilado sobre lentejas de hidróxido de sodio. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

CURVA ESTANDAR DE VITAMINA "E"

Para realizar la curva estandar de vitamina "E", primero se comprobó la pureza del estandar, para ello se determinó espectrofotométricamente, según Lambertsen y Brekken (84). Según estos autores el α -tocoferol presenta un máximo de absorción.

$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 72$ a 292 nm; en base a éste se hizo una solución al 1% de vitamina "E" libre con la supuesta pureza y se leyó a 292 nm.

De la determinación realizada se obtuvo:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 72$ a 292 nm. teórico	$^{\circ}D_{292} = 0.142$
$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 72$ a 292 nm. experimental	$^{\circ}D_{292} = 0.077$
0.142	- 100%
0.077	- X
	X = 54.22 % de pureza

Una vez realizado lo anterior se preparó una solución conteniendo una concentración de $5.40 \mu\text{g/ml}$ en etanol absoluto grado analítico.

La fase orgánica de cada tubo se transfirió con una pipeta pasteur a las celdillas de cuarzo de 1 cm y 4 ml de capacidad para ser leídas en el espectrofluorómetro Carl-Zeiss modelo PMQ con lámpara de Xenón y filtro especial de interferencia de 313 nm y se leyó a las siguientes longitudes de onda a 313 nm de excitación y 340 nm de emisión.

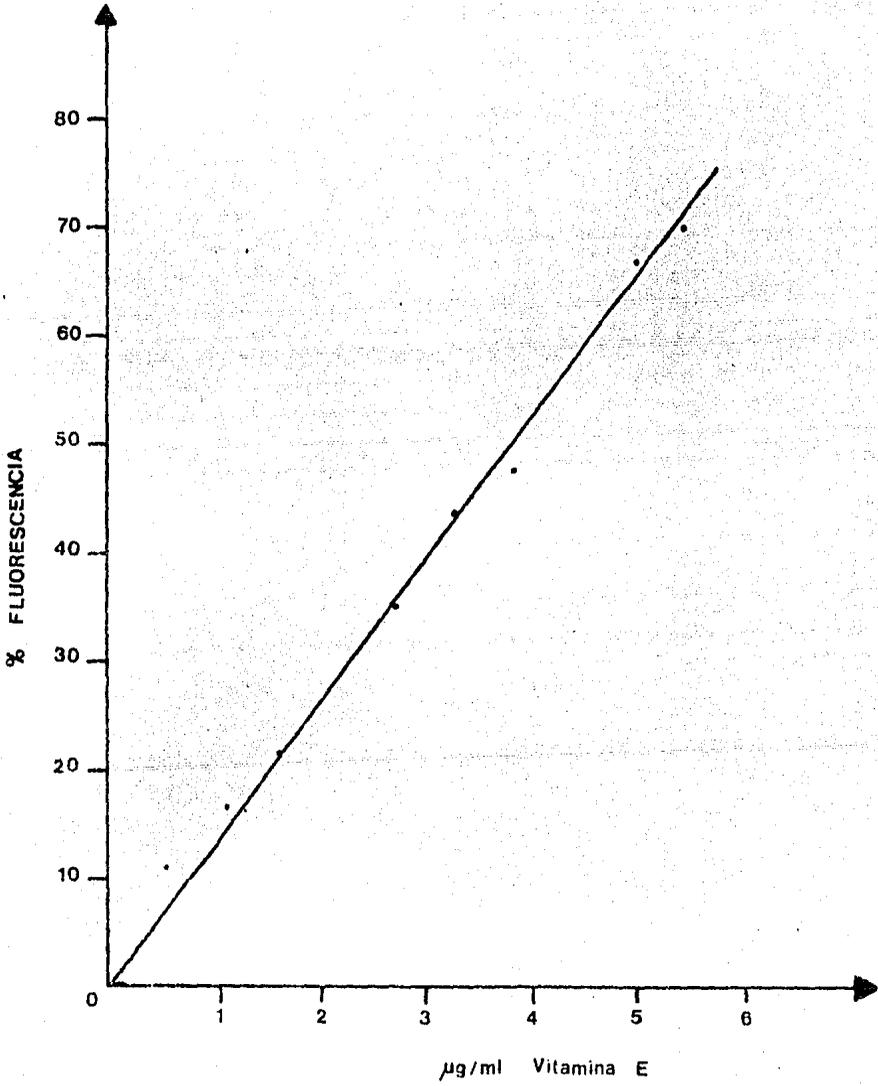
Ajustando primeramente el aparato con el blanco de reactivos a cero de fluorescencia. Con los datos obtenidos se hizo una gráfica en papel milimétrico de fluorescencia vs. concentración. Para posteriormente interpolar los datos de las determinaciones en las muestras de tejido.

La curva estandar se hizo de acuerdo a la tabla 4.

Tabla 4. Curva estándar de vitamina "E"

No. tubo	ml. de solución patrón de vitamina "E"	H ₂ O bides-tilada	etanol absoluto	Hexa- no.
Blanco	0	1	2.0	AGI- 5
1	0.1	1	1.9	TAR 5
2	0.2	1	1.8	5
3	0.3	1	1.7	30 5
4	0.4	1	1.6	5
5	0.5	1	1.5	SE- 5
6	0.6	1	1.4	GUN- 5
7	0.7	1	1.3	DOS 5
8	0.8	1	1.2	5
9	0.9	1	1.1	VOR- 5
10	1.0	1	1.0	TEX 5

GRAFICA 1



Curva Estándar de Vitamina E

DETERMINACION DE VITAMINA "E" EN LOS EXTRACTOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

Se tomó una alícuota de 1.0 ml del extracto de tejido y 0.2 ml en el caso de suero, se hizo por duplicado y se siguió el mismo proceso de la curva estandar de vitamina "E", una vez obtenidas las lecturas de las muestras analizadas, se calculó la concentración de la vitamina interpolando en la curva estandar.

V.6. DETERMINACION DE β -CAROTENOS Y VITAMINA "A" EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

Para esta determinación se siguió la técnica de Neel y Pearson (82). Este método se basa en la medición de la densidad óptica de los carotenos a 450 nm y en la posterior medición a 620 nm del color azul producido por la reacción con el reactivo de Carr-Price.

PREPARACION DEL REACTIVO CARR-PRICE

Reactivo de Carr-Price. Se preparó una solución de tricloruro de antimonio al 20% en cloroformo. Luego se filtró sobre sulfato de sodio anhidro (este compuesto es sumamente corrosivo por lo que hay que tener un cuidado especial en su manejo, se recomienda también calen

tar suavemente en baño maría la solución ya que el tricloruro de antimonio se disuelve lentamente en el cloroformo). Una vez preparada la solución se puso en un frasco ámbar con una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro.

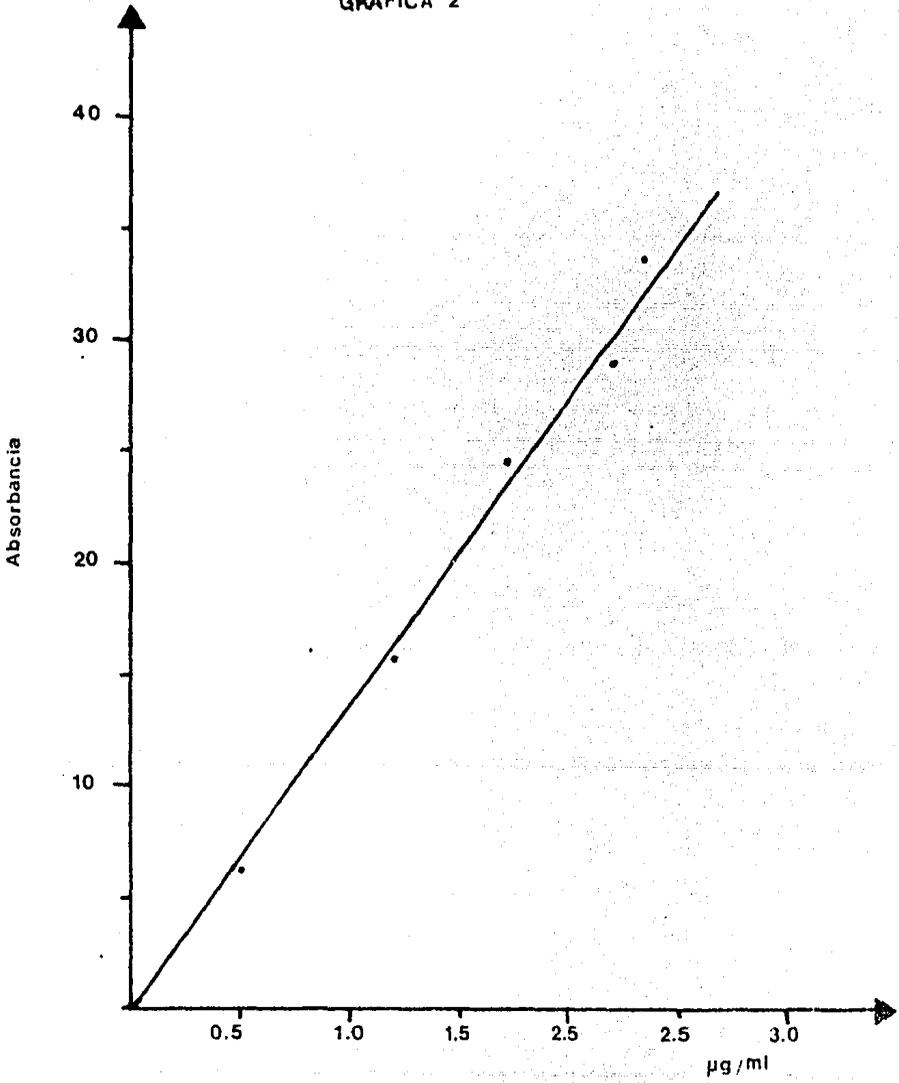
Nota:

Todo el material que estuvo en contacto con este reactivo, se enjuagó con ácido clorhídrico al 50% antes de lavarlo, ya que el tricloruro de antimonio en presencia de agua o humedad forma un precipitado blanco insoluble de oxicloruro de antimonio.

CURVA ESTANDAR DE β -CAROTENO

Se pesaron 50 mg de trans- β -caroteno y se disolvieron en unos cuantos mililitros de cloroformo y se llevan a un volumen de 10 ml con éter de petróleo también grado analítico. De esta solución se hizo una disolución de 1:100, con éter de petróleo. Esta solución es la solución patrón que es estable por unas cuantas horas, por lo que se hizo antes de usarse. Se tomaron diferentes alícuotas desde 1.0 ml hasta 9.0 ml y se llevaron a un volumen final de éter de petróleo, agitándose un minuto en agitador vortex y leyendo a 450 nm., y en un espectrofotómetro Coleman Junior II modelo 6/35 en celdillas de vidrio empleando como blanco éter de petróleo. Se graficó absorbancia contra la concentración en papel milimétrico. Gráfica 2.

GRAFICA 2



Curva Estandar β -caroteno

CURVA ESTANDAR DE VITAMINA "A"

Se pesaron 70.5 mg de palmitato de vitamina "A" que equivale a 37.4 g de retinol y se disolvieron en cloroformo y se llevó a un volumen final de 50 ml. (la solución es estable por dos días protegida de la luz y en refrigeración).

La curva estándar se hizo de acuerdo con la tabla 5.

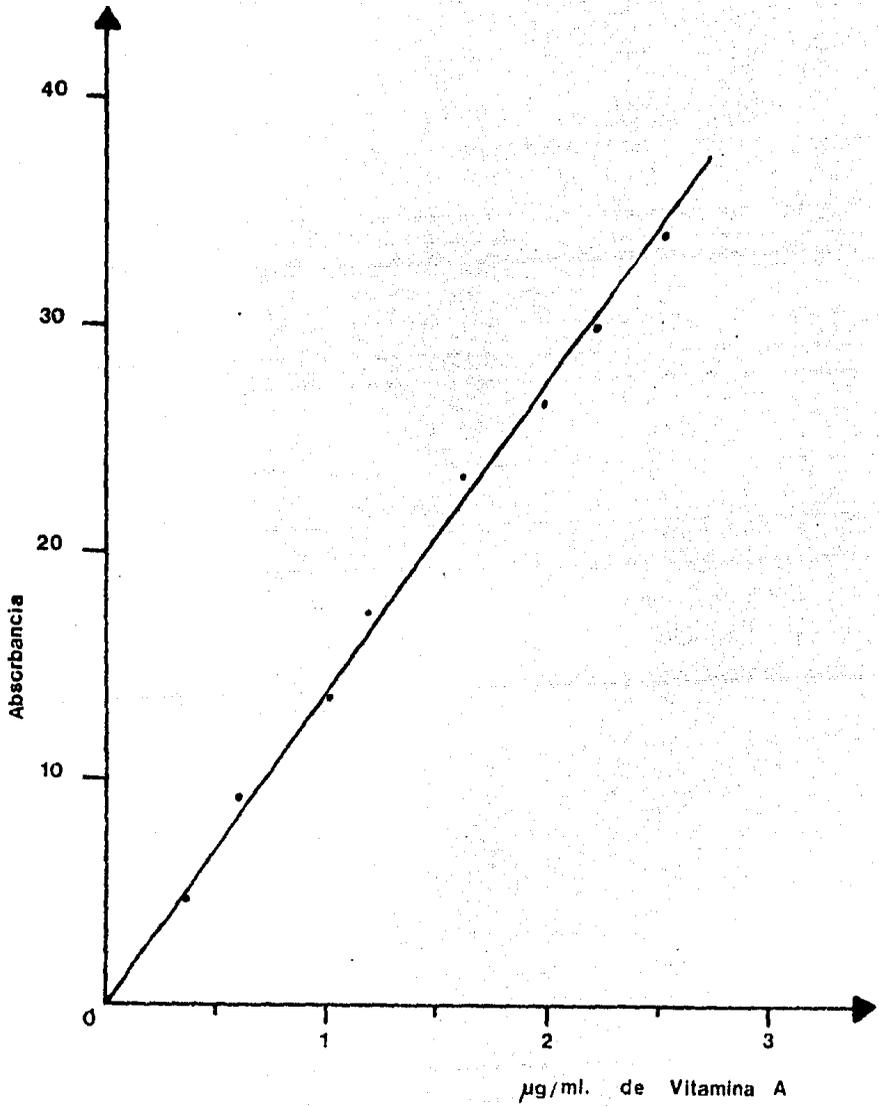
Tabla 5. Curva estándar de Vitamina "A"

	ml. de estándar de vitamina "A"	ml. de cloro- formo	ml. de tricloruro de antimonio.	
BLANCO	0	0.1	1.0	*
1	1.0	8.0	1.0	*
2	2.0	7.0	1.0	*
3	3.0	6.0	1.0	*
4	4.0	5.0	1.0	*
5	5.0	4.0	1.0	*
6	6.0	3.0	1.0	*
7	7.0	2.0	1.0	*
8	8.0	1.0	1.0	*
9	9.0	0.0	1.0	*

* Agitar 60 segundos en Vortex.

Los tubos se leyeron a 620 nm, ajustando el espectrofotómetro Coleman Junior II Modelo 6/35 a cero de absorbancia con el blanco de reactivo. Se gráfico absorbancia contra concentración en papel milimétrico. Grafica 3.

GRAFICA 3



Curva Estandar de Vitamina A

DETERMINACION DE β -CAROTENO Y VITAMINA "A" EN
LOS EXTRACTOS DE TEJIDOS Y SUEROS DE LAS MUESTRAS

Se tomó una alícuota de 1.0 ml de la muestra problema se le agregó 1.0 ml de etanol al 95%, se agitó durante 60 segundos en un agitador Vortex, después se le adicionan 3.0 ml de éter de petróleo, se procedió a centrifugar 5 minutos a 1000 rpm en una centrífuga International Modelo PR-6 de International Equipment, Co. a 10°C. Una vez hecha esta operación se separó cuidadosamente la capa orgánica con una pipeta pasteur y ésta se leyó a 450 nm, en el espectrofotómetro Coleman Junior Modelo 6/35 contra un blanco de éter de petróleo para obtener la concentración de carotenos en las muestras. Después se evaporó el éter de petróleo de la capa orgánica en un baño de agua (35-40°C) hasta sequedad, el residuo se redisolvió en 0.1 ml de cloroformo y se agregó 1.0 ml de tricloruro de antimonio y se leyó rápidamente a 620 nm en el espectrofotómetro Coleman Junior Modelo 6/35. Ajustando primeramente con un blanco de reactivos que contienen 0.1 ml de cloroformo y 1.0 ml de tricloruro de antimonio.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de la determinación de vitamina "A" y "E" se realizó aplicando la prueba de t de Student (86,87), que es una prueba de hipótesis usada para verificar las diferencias observadas en tratamientos distintos (91).

VI. RESULTADOS

En las gráficas 1 y 3 se presentan las curvas estándares de las vitaminas "E" y "A" respectivamente. Se puede observar que la vitamina "E" es lineal entre las concentraciones de 0.54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 5.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, por lo que se trató de ajustar las concentraciones de vitamina "E" presente en los tejidos dentro de estos límites. Con respecto a la vitamina "A", se llevó acabo el mismo procedimiento resultando las concentraciones de 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las concentraciones más adecuadas.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de vitamina "E" en los diferentes tejidos y suero, estudiados en aquellos

animales que se sacrificaron después de seis semanas de tratamiento.

Tabla 1. Determinación de vitamina "E" después de seis semanas de tratamiento ($\mu\text{g/g}$ de tejido).

Dieta	Hígado	Testículo	Músculo	Corazón	($\mu\text{g/ml}$) Suero
1	23.2 \pm 11.6	185.15 \pm 40.2	33.5 \pm 10.8	94.0 \pm 28.8	270.0 \pm 126.2
2	13.4 \pm 6.4	76.8 \pm 7.7	21.8 \pm 4.2	19.1 \pm 2.2	118.7 \pm 24.6
p	NS	0.002	NS	0.01	NS
3	16.5 \pm 13.5	100.1 \pm 8.1	32.1 \pm 4.1	67.8 \pm 4.3	490.0 \pm 58.5
p	NS	0.01	NS	NS	NS
4	114.9 \pm 32.4	86.9 \pm 11.0	19.9 \pm 4.0	28.3 \pm 4.4	573.3 \pm 172.6
p	0.005	0.01	NS	0.01	NS
5	28.8 \pm 6.6	172.3 \pm 42.9	40.5 \pm 0.5	18.8 \pm 1.0	640
p	NS	NS	NS	0.01	NS

1. Dieta Control; 2. Dieta sin vitamina "E"; 3. Dieta con exceso de vitamina "E"; 4. Dieta con harina de algodón; 5. Dieta con harina de algodón y exceso de vitamina "E".

NS: Diferencias no significativas.

Hígado: Con respecto a la concentración de vitamina "E", los animales sometidos a la dieta de harina de algodón (dieta 4), fueron los únicos que mostraron diferencia significativa con respecto al control. Se puede observar que la concentración de esta vitamina fue casi cuatro veces mayor que el grupo control. En los demás grupos los niveles de vi-

tamina "E" fueron muy similares aún en aquellos animales que recibieron una dieta deficiente, en esta vitamina (dieta 2), en donde se notó una ligera disminución de ésta en este órgano.

Testículo: Este fue el tejido en el cual se observó una mayor disminución en la mayoría de los grupos, excepto con los animales de la dieta 5 que ingirieron harina de algodón más exceso de vitamina "E", pudiendo ser ésta la que protegió a este tejido para que lograra mantener los niveles normales, comparado con el grupo control.

Músculo: Ninguno de los cinco grupos estudiados presentó diferencias significativas; lo que hace suponer que este tejido podría ser menos sensible a los cambios de ingesta vitamínica, de ahí, que no presente alteración en sus niveles de vitamina "E".

Corazón: Llama la atención que tanto los animales que ingirieron la dieta sin vitamina "E" (dieta 2), como aquellos que se alimentaron con las dietas a base de harina de algodón (dietas 4 y 5), presentaron una disminución en la concentración de vitamina "E". Con base a estos datos no es posible establecer una probable explicación a esta disminución en los grupos 4 y 5.

La concentración de vitamina "E" encontrada en el suero de los

animales estudiados de todos los grupos, no mostró diferencias con respecto al grupo control.

Tabla 2. Determinación de vitamina "A" después de seis semanas de tratamiento ($\mu\text{g/g}$ de tejido)

Dieta	Hígado	Testículo	Músculo	Corazón	($\mu\text{g/ml}$) Suero
1	89.3 \pm 36.0	11.9 \pm 2.2	4.9 \pm 1.3	9.7 \pm 2.6	12.5 \pm 8.8
2	49.6 \pm 22.1	6.0 \pm 1.5	4.7 \pm 1.2	6.8 \pm 1.3	5.4 \pm 3.6
p	NS	0.005	NS	NS	NS
3	47.9 \pm 16.2	9.1 \pm 1.5	5.2 \pm 2.0	10.8 \pm 1.3	19.8 \pm 10.8
p	NS	NS	NS	NS	NS
4	29.5 \pm 6.8	4.1 \pm 0.8	6.5 \pm 0.7	14.5 \pm 3.7	9.8 \pm 4.5
p	0.05	0.005	NS	NS	NS
5	22.6 \pm 8.2	8.9 \pm 1.1	4.6 \pm 1.1	12.8 \pm 0.8	58.7
p	0.05	NS	NS	NS	NS

Concentración de vitamina "A".

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. En ellos se puede observar que esta vitamina disminuye significativamente ($p < 0.05$), en el hígado de los animales cuyas dietas fueron a base de harina de algodón.

En el testículo, sólo aquellos animales que tuvieron una dieta sin vitamina "E" (dieta 2), y el grupo 4 que ingirió harina de algodón se observó una disminución significativa ($p < 0.005$), mientras que en el mús

culo al igual que en la vitamina "E", los niveles de vitamina "A" tampoco se alteraron en ninguno de los grupos estudiados. De la misma manera, en corazón y suero las concentraciones de vitamina "A" fueron similares a sus respectivos controles, siendo aparentemente los tejidos más sensibles el hígado y el testículo.

Con respecto al estudio de las ratas sometidas al período de recuperación (8 semanas con dieta normal después del tratamiento), los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Determinación de vitamina "E", después de ocho semanas de recuperación* ($\mu\text{g/g}$ de tejido)

Dieta	Hígado	Testículo	Músculo	Corazón	($\mu\text{g/ml}$)
					Suero
1	8.9 \pm 4.7	59.5 \pm 14.3	32.8 \pm 17.4	31.4 \pm 14.5	135.0 \pm 49.2
2	17.6 \pm 10.1	34.8 \pm 7.4	25.4 \pm 9.8	46.3 \pm 9.3	128.5 \pm 44.9
p	NS	0.001	NS	NS	NS
3	19.4 \pm 10.7	115.7 \pm 3.6	16.9 \pm 5.4	26.8 \pm 7.9	155.5 \pm 28.4
p	NS	0.001	NS	NS	NS
4	13.0 \pm 6.6	102.6 \pm 30.0	25.1 \pm 13.3	35.9 \pm 6.8	157.3 \pm 65.4
p	NS	NS	NS	NS	NS
5	29.3 \pm 5.1	62.2 \pm 19.5	35.0 \pm 5.3	27.0 \pm 27.3	187.3 \pm 42.2
p	0.005	NS	NS	NS	NS

* Todos los grupos recibieron durante ese tiempo dieta normal (Purina-Chaw).

En ella se puede observar que el hígado mostró un aumento en la concentración de vitamina "E" en aquellos animales que ingirieron la dieta de harina de algodón más vitamina "E" (grupo 5) siendo esta diferencia significativa. No se observó en los demás grupos ninguna alteración aparente de los niveles de vitamina con respecto al grupo control.

En testículo, el contenido de vitamina "E" se mantuvo bajo el grupo 2 en donde los animales ingirieron una dieta sin vitamina "E" durante el período de tratamiento, sin embargo, en los grupos 3 y 4 formado por los animales que ingirieron una dieta con exceso de vitamina "E", y harina de algodón respectivamente, aumentaron sus niveles de esta vitamina con respecto al grupo control, encontrándose diferencia significativa sólo en el grupo 3.

En el músculo, tejido en el cual se mantuvieron los niveles de vitamina "E", durante el tratamiento no se encontraron diferencias tampoco en este período de recuperación.

En corazón y suero se pudo apreciar un comportamiento similar que en el tejido anterior, en que tampoco se obtienen diferencias significativas.

Los resultados obtenidos de la determinación de vitamina "A",

en los diferentes tejidos y suero para el período de recuperación se muestran en la tabla 4.

Para el hígado, tejido en el cual se observa una disminución en los niveles de vitamina "A", en los grupos 2 y 3 se encontró que ésta es significativa; en cambio en el grupo 5 (animales que ingirieron harina de algodón más vitamina "E" durante el período de tratamiento), existió un aumento en los niveles de vitamina "A".

Tabla 4. Determinación de vitamina "A" después de ocho semanas de recuperación* ($\mu\text{g/g}$ de tejido)

Dieta	Hígado	Testículo	Músculo	Corazón	($\mu\text{g/ml}$) Suero
1	27.3 \pm 1.2	15.3 \pm 9.0	2.7 \pm 0.8	2.0 \pm 0.6	35.8 \pm 0.7
2	15.7 \pm 7.3	6.8 \pm 1.7	5.5 \pm 0.7	6.4 \pm 0.9	36.0 \pm 0.2
p	0.02	NS	0.005	0.001	NS
3	15.2 \pm 2.3	5.9 \pm 3.6	6.8 \pm 1.0	4.3 \pm 1.6	35.9 \pm 6.0
p	0.001	NS	0.001	0.05	NS
4	33.1 \pm 6.4	4.3 \pm 0.0	3.5 \pm 1.0	6.5 \pm 1.7	37.5 \pm 0.0
p	NS	NS	NS	0.005	NS
5	38.4 \pm 8.2	10.3 \pm 3.8	5.1 \pm 1.0	9.9 \pm 0.5	33.9 \pm 0.0
p	0.05	NS	0.02	0.005	NS

* Durante ese tiempo todos los grupos recibieron dieta normal (Purina-Chaw).

En testículo, no se encontraron diferencias con respecto al control en ninguno de los grupos.

En músculo se encontró un aumento significativo en los grupos 2, 3 y 5 en los niveles de vitamina "A".

En corazón, tejido en el cual los niveles de vitamina "A" se ven aumentados en todos los grupos con respecto al grupo control, siendo este aumento significativo.

Los datos obtenidos para suero, muestran que no existen diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados en comparación con el grupo control en los niveles de vitamina "A".

En el caso de vitamina "E", se observó de una manera general, por una parte, el testículo es el tejido más afectado. En los casos de la dieta 2 (deficiente en vitamina "E") y la dieta 3 (con exceso de vitamina "E") durante el tratamiento, continuaron mostrando el efecto de carencia o exceso aún después de las ocho semanas de recuperación.

Con respecto a la vitamina "A", después del período de recuperación los niveles de ésta en corazón y músculo aumentaron mientras que los demás tejidos y suero se mantienen los niveles normales con respecto al grupo control.

VII. DISCUSION

De acuerdo al análisis de resultados realizado para el contenido de vitamina "E" durante el período de tratamiento se puede ver que el testículo fue el que respondió de manera más clara al tratamiento sin vitamina "E", lo cual era de esperarse puesto que uno de los principales sitios de acción de la vitamina "E" es este tejido (41,88,89). De igual manera, el grupo tratado con harina de algodón mostró disminución. Este efecto se vió disminuido en el grupo 5 en donde se encontraba vitamina "E" que posiblemente protegió a este órgano del efecto del gossipol presente en la harina de algodón.

Es importante hacer notar que el músculo fue el tejido menos

afectado e igualmente el suero fue en donde no se observan cambios tanto por el efecto de carencia de vitamina "E" como de gosispol de la harina de algodón.

Al cabo de las ocho semanas de recuperación (con alimento propio para estos animales), el único órgano que todavía se encontraba afectado era el testículo. Es interesante observar que el grupo que fue originalmente tratado con exceso de vitamina "E" mostraba valores muy altos. Parece ser que el efecto acumulativo se observará al cabo de esta segunda parte.

En cuanto a la concentración de vitamina "A" durante el período de tratamiento nuevamente fue el testículo el órgano más sensible. Aquí se puede ver que el grupo que recibió la dieta de harina de algodón mostró el más bajo contenido de vitamina "A" lo que indica que esta vitamina también se ve afectada por el gosispol. El hígado se vio afectado sólo en los animales tratados con las dietas a base de harina de algodón.

En el período de recuperación se observa que aquellos tejidos que presentan niveles normales de esta vitamina durante las seis semanas de tratamiento, mostraron alteraciones en su comportamiento durante el período de recuperación dando la impresión de que el efecto se hace patente a largo plazo, ya que sí bien en testículo y suero se mantuvieron valores normales, en músculo y corazón se observó un incremento en el contenido de vitamina "A". En los animales alimentados con

las dietas 2 y 3 la concentración de vitamina "A" en hígado mostró disminución significativa con lo cual se puede pensar que las reservas hepáticas disminuyeron para suplir las necesidades de los demás tejidos. Esta recuperación ya ha sido estudiada por otros investigadores (63, 66) quienes también sugieren que la vitamina "E" contribuye a aumentar el almacenamiento hepático de vitamina "A".

La disminución de los niveles de la vitamina "A" en hígado va de acuerdo al mecanismo de acción ejercido por las dos vitaminas en el cual la presencia de una influye sobre la utilización de la otra, en este caso, la acumulación de vitamina "E", disminuye las reservas hepáticas de vitamina "A", ya que existe una mayor demanda de esta vitamina.

VIII. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. El testículo es el órgano más sensible a la deficiencia de vitamina "E" y la acción del gossipol que afecta también de manera importante la concentración de esta vitamina. Este efecto se vio disminuido cuando la harina de algodón se dió en una dieta con exceso de vitamina "E"

2. El músculo fue el tejido menos afectado y la concentración de vitamina "E" en el suero no se vió modificada en ninguno de los tratamientos empleados.
3. Al cabo de ocho semanas de recuperación con dieta normal el único órgano que todavía continuaba afectado en cuanto a la concentración baja de vitamina "E" era el testículo. Los animales que recibieron la dieta con exceso de vitamina "E" mostraron aumento de esta vitamina en testículo.
4. La vitamina "A" se vió afectada de la misma manera que la vitamina "E" siendo igualmente el testículo el órgano en donde se produjeron disminuciones significativas de esta vitamina por la deficiencia de vitamina "E" y por la acción del gosipol presente en la harina de algodón.
5. Más difícil de explicar son los aumentos de vitamina "A" encontrados en músculo y corazón al cabo del período de recuperación y las disminuciones encontradas en hígado en los grupos de animales alimentados con dietas sin y con exceso de vitamina "E".

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Smith, K.L., "Practical Significance of Gossypol Information".,
 J. Amer. Oil. Chem. Soc. 49 (11), 448-450 (1970).
2. Clawson, A.J., Maner, J.H., Gómez, G., Mejía, O., Flores, Z.
 and Beutrago, J., "Unextracte Cottonseed in Diets Formono-
 gastric Animal"., I. The Calciu Hydroxide in Redeing Gossy-
 pol Toxicity., J. Anim. Sci 40 (4), 640-647 (1975).
3. Bressani, L.C., "Human Nutrition and Gossypol" PARFR Wordshop
 on Gossypol Chicago, Illinois., (1980).

4. Elias, L.G., "Mezclas Vegetales para Consumo Humano. XVIII. Desarrollo de la Mezcla Vegetal INCAP 17, a Base de Semillas - Leguminosas"., Arch. Latinoamer. Nutrición. 19 (2), 109-127 (1969).
5. Adams, Roger., Geissman, T.A., "Gossypol a Pigment of Cottonseed., Chem. Rev. 61, 555-574 (1960).
6. Philip, L., Schaible, Poultry., "Feeds an Nutrition", The Avi. Publishing Company. Inc. 156-158, 353, 356 (1970).
7. Singleton, V.L., and Kratzer, F.H., "Plant Phenolics in Toxicants Occurring Naturally in Foods"., National Academy of Sciences. 318-323 (1973).
8. Gerald, I., Zatuchni, M.D., S.C., "Gossypol: A Possible Male Antifertility Agent Report of a Workshop"., Rosseach Froteries in Fertility Regulation 4, 4 (1981).
9. Abou., Donia, M.B., "Physiological Effects and Metabolism of Gossypol Residue"., Rev. 61, 126-160 (1976).
10. National Coordinating Group of Male Antifertility Agent., "Gossypol-

- A-New Antifertility Agent for Males"., Ch. Med. J. 4 (6), -
417-428 (1978).
11. Jones, Lynn. A., and Smith, Frank. H., "Effect of Bound Gossypol and Amino Acid Supplementation of Glandless Cottonseed Meal on the Growth of Weanling Rats"., Journal of Animal Science. 44 (3), 401-409 (1977).
 12. Wichmann, K., Käpyaho, K., Sinervirta, R., and Jänne, J., "Effect of Gossypol on the Motility and Metabolism of Human Spermatozoa"., J. Reprod. Fert. 69, 259-264 (1983).
 13. Abou-Donia, Mohamed, G., Lyman, Carl. M., and Dieckert, Julius, W., "Metabolic Fate of Gossypol: The Metabolism of ¹⁴C- Gossypol in Rats"., Lipids. 5 (11), 938-946 (1970).
 14. Abou-Donia, Mohamed, G., and Dieckert, Julius, W., "Gossypol: Un coupling of Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation"., Life Sci. 14, 1955-1963 (1974)
 15. Nadakavukaren, M.J., Sorensen, R.H., and J.N., "Effect of Gossypol on the Ultrastructure of Rat Spermatozoa"., Cell. Tiss. Res. 204, 293-296 (1979).

16. Gallup, W.D., Journal Biol. Chem. 91, 387-390 (1931).
17. Edwards, J. Dr., "Synthesis of Gossypol Derivates"., J. American Oil Chemical Society. 47 (11), 427-442 (1970).
18. Murono, Lin. T., Osterman, E.P., Nankin, J., Couloom, H.J., -
"Gossypol Inhibits Testicular Steroidogenesis". Fert. Steril -
35, 563-566 (1981).
19. Bozek, S.A., Jansen, D.R., and Tone, J.N., "Scanning Electron Microscopic Study of Spermatozoa from Gossypol Treated Rats". Cell. Tiss. Res. 219, 659-663 (1981).
20. Sotelo, Angela., Montalvo, Irene., Grail, Ma. de la Luz and González Garza, Ma. Teresa., "Infertility in Male Rats Induced by Diets Containing whole Cottonseed Flour"., Journal Nutrition. 112 (11), 6-11 (1982).
21. Nomeir, A.A., Abou-Donia, M.B., "Gossypol: High-Performance - Liquid Chromatographic Analysis and Stability in Various Solvents"., J.A.O.C.S. 59 (12), 546-549 (1982).
22. Kalla, N.R., Vasuder, M., and Arora, G., "Studies on the Male -

- Antifertility Agent Gossypol Acetic Acid. III. Effect of Gossypol Acetic Acid on Rat Testis". *Andrologia* 13, 242 (1981).
23. Ma Xiao-Nian., and Back, D.J., "Inhibition of Hepatic Microsomal - Enzymes by Gossypol in the Rat". *Contraception* 30 (1), 91-97 (1984).
24. M.R.M. Prasad., and Diczfalucy., "Gossypol, Second International Congress of Andrology Supplementum 5, 1982.
25. Reyes, Juan., Allen, Janet., Tanphaichitr, Nongnuj., Bellvé, Anthony R., and Benos, Dale., "Molecular Mechanisms of Gossypol Action on Lipid Membranes". *Journal of Biological Chemistry*. 259 (15), 9607-9615 (1984).
26. Milton, H.C., "Advances in Our Understanding of Vitamin 'E'". - *Federation Proc.* 39, 2936-2939 (1980).
27. Horwitt, M.K., "Vitamin 'E' : A Reexamination"., *The American Journal of Clinical Nutrition*. 29, 569-578 (1976).
28. Vatassery, G.T., Barry, J.F., "Effect of Vitamin 'E' Deficiency on the Lipid Class and Fatty Acid Composition of Rat Brain Gray

and White Matter". *Lipids*. 11 (4), 317-321 (1976).

29. Chen, L.H., Liao, S., and Pachett, L.V., "The Effect of Dietary Protein Level and Lipid Source on α -Tocopherol Requirement" *Nutrition Reports International*. 4 (1), 155-161 (1982).
30. Statement: "Supplementation of Human Diets with Vitamin 'E'". *Ecology of Food and Nutrition*. 3, 77-79 (1974).
31. Asociación de Químicos de Vitaminas., "Métodos de Análisis de Vitaminas". Inc. E. Academia Española. 335-369 (1969).
32. Machlin, Laurence, L., "Vitamin 'E': A Comprehensive Treatise". *Basic and Clinical Nutrition*. Vol 1.
33. Cavins, J.F., and Ingle, G.E., "High-Resolution Liquid Chromatography of Vitamin 'E' Isomers". *Cereal Chemistry*. 51 (5), 605-609 (1974).
34. De Lumen, Benito., and Fiad, Seham., "Tocopherols of Winged Bean (*Psophocarpus Tetragonolobus*) Oil". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30 (1), 50-53 (1982).

35. Hansen, Leland. G., M.P.H., and Warwick, Warren, J., "A Fluorometric Micromethod for Serum Vitamins 'A' and 'E' ". The American Journal of Clinical Pathology. 51 (4), 538-541 (1969).
36. Bieri, John., Tolliver, Teresa J., and Catignani, George., "Simultaneous Determination of α -Tocopherol and Retinol in Plasma or Red Cells by High Pressure Liquid Chromatography"., Am. J. Clin. Nutr. 32, 2143-2149 (1979).
37. Manz and Philipp, K., "A Method for the Routine Determination of α -Tocopherol in Animal Feed and Human Foodstuffs with the Aid of High Performance Liquid Chromatography". International Journal for Vitamin and Nutrition Research. 51 (4), 342-348 (1981).
38. Rudy, D.C., Mahn, F.D., Senkowski, D.S., Sheppard, A.J., and Hubbard, W.D., "Collaborative Study of the Gas-Liquid Chromatographic Assay for Vitamin 'E' ". Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 55 (6), 1212-1217 (1972).
39. Syed, Alan., and Bassima, Alan S., "Lipid Peroxide, α -Tocopherol and Retinoid Levels in β -Carotene and 13-cis Retinoic Acid". Journal Nutrition. 113, 2608-2614 (1983).

40. Machlin, L.J., Gabriel, E., Horn, R., Woo, R., Filipaki, R., Brin, M., and Nelson, J., "Effects of Aspirin and Related Drugs in Vitamin 'E' Deficient Rats". *J. Nutri.* 110, 1958-1964 (1980).

41. Rafi, Younoszai., Padmakar, Dixit., and Vatassery, Govindankutty, - T., "Decreased Citrate Synthesis: Possible Indication of Early Degenerative Changes in Testes of Vitamin 'E' Deficient Rats". *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 150, 441-445 (1975).

42. Yoshida, Munehiro., Fukunaga, Toshiaki., Iwami, Kimikazu., and - Yasumoto, Kyoden., "Variation of Glutathione Level and Synthesis Activity in Chick Liver Due to Selenium and Vitamin 'E' - Deficiencies". *J. Biochem.* 96 (5), 1391-1397 (1984).

43. Combs, G.F., Jr., "Differential Effect of High Dietary Levels of Vitamin 'A' on the Vitamin 'E' Selenium Nutrition of Young and - Adult Chickens". *Journal Nutrition.* 106 (7), 967-975 (1976).

44. Helmsen, Ralph. J., and White, Arnold. A., "Alterations in Tissue and Serum Aldolase in Rabbits Due to Vitamin 'E' Deficiency". *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 136, 785-789 (1971).

45. Chizzolini, Roberto., Bracchi, PierGiovanni., Cabassi, Enrico., and Maggi, Emilio., "Effect of Vitamin 'E' Deficiency on Rabbit - Intramuscular Collagen". *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 1018-1022 (1982).

46. North, L.N., Mathias, M., and Schatte, C.L., "Effect of Dietary - Vitamin 'E' or Selenium on Prostaglandin Dehydrogenase in - Hyperoxic Rat Lung". *Aviat. Space Environ. Med.* 55, 617-19 (1984).

47. Chow, Ching, K., "Effect of Dietary Selenium and Vitamin 'E' on - the Antioxiand Defense Systems of Rat Erythrocytes". *Journal for Vitamin and Nutrition Research.* 49 (2), 182-185 (1979).

48. Katz, Martin. L., Robison, Gerald. W., and Herrman, Roland., - "Lipofuscin Accumulation Resulting from Senescence and Vita- min 'E' Deficiency: Spectral Properties and Tissue Distribu- tion". *Mechanisms of Ageing and Development.* 25, 149-159 (1984).

49. Manwaring, John. D., and Csallany, Saari. A., "Water-Soluble - Fluorescent Compounds in Liver, Lung, Spleen, Kidney, Heart and Brain of Vitamin 'E' Deficient an Supplemented Mice".

Journal Nutrition. 3 (12), 2172-2179 (1981).

50. Goodman, Dewitt. S., "Vitamin 'A' Metabolism"., Federation Proc. 39, 2716-2722 (1980).
51. Lenhinger, Albert., Bioquímica., "Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular"., 2a. Ed. Barcelona España la. - Ed. Omega 1976.
52. Chikhalikar, Pushpa., and Magar, N.G., "Dark Adaptation Test as Related to the Clinical Symptoms of Vitamin A Deficiency - and the Serum Level of Carotene and Vitamin 'A' ". Ind. Jour. Med. Res., 50 (2), 253-258 (1962).
53. Piris, Antoinette., "The Role of Carotene in Prevention of Xerophthalmia". Boroda J. Nutr. 2, 79-84 (1975).
54. Alvarez, Richard, A., and Fong, Shao-Ling., "Vitamin a in Human Eyes: Amount, Distribution, and Composition". Investigative - Ophthalmology and Visual Science. 22 (6), 706-714 (1982).
55. Bjondahl, K., and Virkki, M., "Comparative Studies on Vitamin 'A' Utilization Using Three Different Base Solutions (Xylitol, Polyol

- and Water) in the Ade-Vitamin Solution". Nutrition Reports International. 15 (5), 519-527 (1977).
56. Wright, Kenneth, E., and Hall, Roderick, C. "Association Between Plasma and Liver Vitamin 'A' Levels in the Calf: Weanling Pig, Rabbit and Rat; and Adult Goat Fed Fixed Intakes of Vitamin 'A' ". Journal of Nutrition. 109 (6), 1063-1072 (1979).
57. Hicks, Veronica, A., Gunning, Desires, B., and Olson, James Allen. "Metabolism, plasma Transport and Biliary Excretion of Radioactive Vitamin 'A' and Its Metabolites as a Function of Liver Reserves of Vitamin 'A' in the Rat". J. Nutr. 114, 1327-1333 (1984).
58. Rajguru, Shakuntala, U., Kang, Yuan-Hsu., and Ahluwalia, Balwant, S., "Localization of Retinol (Vitamin 'A') in Rat Testes". J. Nutr. 112, 1881-1891 (1982).
59. Jayarajan, P., Reddy, Vinodini., and Mohanram, M., "Effect of Dietary Fat on Absorption of β -Carotens from Green Leafy Vegetables in Children". Indian J. Med. Res. 71, 53-56 (1980).
60. Olson, James, Allen., "Adverse Effects of Large Doses of Vitamin

'A' and Retinoids"., Seminars in Oncology. 10 (3), 290-293 (1983).

61. Wolf, George., "Multiple Functions of Vitamin 'A' ". Physiological Reviews. 64 (3), 873-937 (1984).
62. Soto, M., and Lieber, C. S., Journal Nutr. III, 2015-2023 (1981).
63. Ahluwalia, G., and Bieri, J.G., "Local Stimulatory Effect of Vitamin 'A' on Spermatogenesis in the Rat". Journal of Nutrition. 101 (2), 141-151 (1971).
64. Chytil, Frank., "Liver and Cellular Vitamin 'A' Binding Proteins". Hepatology. 2 (2), 282-287 (1982).
65. Chaudhary, L.R., and Nelson, E.C., "Separation of Vitamin 'A' and Retinyl Esters by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography". Journal of Chromatography. 294, 466-470 (1984).
66. Haneji, Tatsuji., Maekawa, Mamiko., and Nishimune, Yoshitake., "Retinoic Acid (Vitamin 'A' Acid) Induces Spermatogenesis in Adult Mouse Cryptorchid Testes in Vitro". Biochemical and

Biophysical Research Communications. 108 (3), 1320-1324
(1982).

67. Bring, S.V., Ricard, C.A., and Zaehring, M.V., "Relationship Between Cholesterol and Vitamin 'A' Metabolism in Rats Fed at Different Levels of Vitamin 'A'". Journal of Nutrition. 85 (400), 1983.
68. Erdamn, John. W., and Lachance, Paul, A., "Failure of the Non-Vitamin 'A' Active Carotenoid Lycopene to Act as an Antihypercholesterolemic Agent in Rats". Nutrition Reports International. 10 (5), 277-284 (1974).
69. Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S., Shinitzky, M., "Binding Affinities of Retinol and Related Compound to Retinol Binding Protein". Journal Biochemistry. 65 (71),
70. Goodman, D.S., Raz, A., "Extraction and Recombination Studies of the Interaction of Retinol with Human Plasma Retinol Binding Protein". Journal Lipid. Res. 13, 338 (1972).
71. Heller, J., and Horwitz, J., "Conformational Changes Following Interactions Between Retinol Isomers and Human Retinol-Binding

Protein and Between the Retinol-Binding Protein and Prealbumin". Journal Biol. Chem. 248, 6303 (1973).

72. Ames, S.R., "Factors Affecting Absorption Transport and Storage of Vitamin 'A' ". An. Journal Clin. Nutr. 22, 934 (1969).
73. Corey, Joyce, E., and Hayes, K.C., "Cerebrospinal Fluid Pressure Growth and Hematology in Relation to Retinol Status of the Rat in Acute Vitamin 'A' Deficiency". Journal of Nutrition. 107 (12), 1585, 1594 (1972).
74. Sivakumar, Band., Reddy Vinodini., "Absorption of Labelled Vitamin 'A' in Children During Infection". Br. Journal Nutrition. 27, 299 304 (1972).
75. Arroyave, Guillermo., Wilson, Dorothy., Contreras, Cristina., and Béhar, Moisés., "Alterations in Serum Concentration of Vitamin 'A' Associate with the Biproteinemia of Severe Protein Malnutrition". The Journal of Pediatrics. 62 (6), 920-925 (1963).
76. Arroyave, Guillermo., Wilson, Dorothy., Méndez, José., Béhar, Moisés., and Scrimshaw, Nevin S., "Serum and Liver Vitamin 'A' and Lipids in Children with Severe Protein Malnutrition".

American Journal of Clinical Nutrition. 9, 180-185 (1961).

77. Underwood, Barbara. A., "Effect of Protein Quantity and Quality on Plasma Response to an Oral Dose of Vitamin 'A' as an Indicator of Hepatic Vitamin 'A' Reserves in Rats". Journal of Nutrition. 110, 1635-1640 (1980).
78. Hayes, W.C., Cobel-Geard, S.R., Hanley, T.R., Murray, J.S., Freshour, N.L., Rao, K.S., and John, J.A., "Teratogenic Effects of Vitamin 'A' Palmitate in Fischer 344 Rats". Drug and Chemical Toxicology. 4 (3), 283-295 (1981).
79. Butcher, R.E., Brunner, R.L., Roth, T., Kimmel, C.A., "Learning Impairment Associated with Maternal Hypervitaminosis 'A' in Rats". Life Sciences. 11 (1), 141-145 (1972).
80. Robens, Jane, F., "Teratogenic Effects of Hypervitaminosis 'A' in the Hamster and the Guinea Pig". Academic Press. 209-214 (1969).
81. Jager, F.C., and Houtsmuller, U.M.T., "Effects of Dietary Linoleic Acid on Vitamin 'E' Requirement and Fatty Acid Composition of Erythrocyte Lipids in Rats". Nutr. Metabol. 12, 3-

12 (1970).

82. Neeld., and Pearson., "Macro and Micro Methods for the Determination of Serum Vitamin 'A' Using Trichoroacetic Acid". Journal of Nutrition. 74, 454 (1963).
83. Goodman, A., Goodman, L., Gilman, E.A., "The Pharmacological - Basic of Therapeutics"., MacMillan Publishing Co., Inc. USA.
84. Lambertsen., an Brekkan., "The Spectrophotometric Determination - of -Tocoferol". Anal. R. 84, 705-711 (1959).
85. Kirk, Othmer., Enciclopedia de Química., 3a. Edición., 1, 909, 911 (1978).
86. Murray, R., Estadística., "Teoría de Pequeñas Muestras"., 188-191 (1970).
87. Kreyszig, Erwin., Estadística Matemática., "Distribuciones Usadas - en pruebas"., 168-169, 490 (1981).
88. Lehmann, Joanna., "Relationships Among Levels of Alpha Tocopherol in Platelets, Plasma, and Tissues of Rats: Responses to Grade

Levels of Vitamin 'E' ". Nutrition Reports International. 20 (5)
685-692 (1979).

89. Työppönen, J., Hakkaramen, J., Juokslahti, T., and Lindberg, P., -
"Vitamin 'E' Requirement of Mink with Special Reference to To
copherol Composition in Plasma, Liver, and Adipose Tissue".
Am. J. Vet. Res. 45 (9), 1790-1794 (1983).
90. Ullrey, D.E., "Biological Availability of Fat-Soluble Vitamins: Vita-
min 'A' and Carotene". Journal of Animal Science. 35 (3), 648-
656 (1972).
91. Sokal, P.R.F., and Rohlf., J., "Biometria Blume" Ediciones Madrid.
Cap. 7: 145-194.