

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**Estudio de la Liberación de Vitaminas  
en el Medio de Cultivo por Cepas del  
Basidiomiceto Ustilago ZEAE, Aislado  
de Maíz Mexicano**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

p r e s e n t a

**ELOISA COURET ESPINOZA**

**1973**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Tesis  
1973  
H. t. 75



QUÍMICO

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	NINFA GUERRERO DE CALLEJAS
VOCAL	ENRIQUE GARCIA GALIANO
SECRETARIO	ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
1 er. SUPLENTE	MA. DEL SOCORRO SALAS T.
2 o. SUPLENTE	ALFREDO GARZON SERRA

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA.  
FACULTAD DE QUIMICA.

Sustentante:

  
ELOISA COURET ESPINOZA

Asesor del Tema:

  
ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.

A la memoria de mi madre:

Ernestina E. de Couret.

A mi padre:

Rafael Couret Saracho.

Con profundo amor y gratitud.

A mis hermanos:

Napoleón

Ernestina

Elva

Anibal

Con todo mi cariño

A mi tío:

Raúl M. Couret S.

Con gratitud.

Mi agradecimiento sincero al:

Dr. Carlos del Rio Estrada.

Dr. Alfredo Echegaray Alemán.

por su valiosa ayuda en el desarrollo  
de este trabajo.

A mis maestros.

A mis amigos.

## CONTENIDO.

	Pag.
I.- INTRODUCCION .....	6
II.- GENERALIDADES: .....	9
<u>Ustilago zeae</u> .....	10
Vitamina B <sub>12</sub> .....	16
Vitamina B <sub>2</sub> .....	25
Biotina .....	34
Acido Nicotínico .....	42
III.- MATERIAL Y METODOS .....	58
IV.- PARTE EXPERIMENTAL .....	69
V.- RESULTADOS .....	86
VI.- DISCUSION .....	88
VII.- CONCLUSIONES .....	93
VIII.- BIBLIOGRAFIA .....	95

## INTRODUCCION



La mayor parte de los alimentos que ingiere el hombre son utilizados en funciones metabólicas que consumen energía. Carbohidratos, grasas y proteínas son los componentes de los alimentos principales productores de energía; la proporción de cada uno de ellos en la dieta varía ampliamente según la economía local, la cultura y el gusto personal del individuo. Sin embargo, para las funciones fisiológicas y metabólicas normales, el crecimiento y la reparación, se requiere de una ingestión adecuada de otros nutrimentos que proporcionan funciones estructurales, osmóticas, catalíticas y otras que directamente no proporcionan energía. --- (Cook, 1965).

Las características químicas que debe reunir un alimento según (Sherman, H.C; 1945 y Jacobs M.B; 1951) pueden ser los siguientes: 1) Suficiente cantidad de los nutrientes orgánicos en forma digestible para producir la energía necesaria al organismo. 2) Proteínas en suficiente cantidad y apropiada en clase para producir lo necesario de cada uno de los aminoácidos. 3) Adecuadas cantidades y proporciones propias de los elementos minerales necesarios. 4) Suficientes de cada una de las vitaminas esenciales y 5) Cantidades adecuadas de agua y aire.

Varias de las VITAMINAS se sabe que sirven como cofactores o precursores de los cofactores de las enzimas. Se entiende por vitamina un factor alimenticio de naturaleza orgánica indispensable para el organismo en pequeñas cantidades, cuya carencia produce graves trastornos. (Conn, 1967).

Rosenberg define las vitaminas como compuestos orgánicos necesarios para el crecimiento y conservación normal de la vida animal, incluso del hombre, ya que generalmente la especie humana y los animales son incapaces de sintetizarlas mediante procesos anabólicos independientes del medio ambiente y que son efectivas en pequeñas cantidades, no proporcionan energía y no son utilizadas como unidades constructoras en la estructura del organismo, pero son esenciales para la transformación de energía y en la regulación del metabolismo de las unidades estructurales. Las vitaminas son sintetizadas generalmente por las plantas, microorganismos y algunos animales. Se sabe que tienen funciones metabólicas específicas en las células vegetales y los tejidos vegetales son la fuente principal donde los animales obtienen algunos de estos factores nutritivos protectores. (Cook, 1965).

El objeto de esta tesis, es conocer el contenido de algunas vitaminas en el medio donde se desarrolló Ustilago zeae (U. maydis), hongo parásito del maíz, cuyo nombre vulgar es "HUITLAGOCHE", lo cual significa desecho negro debido al aspecto que presenta: deriva de las raíces: Huitl ó cuitl que significa desperdicio, desecho ó excremento; y de cochi que significa negro.

## GENERALIDADES

USTILAGO. ZEAÆ.

CLAFISICACION. -

- a) Clase: Basidiomicetos
- b) Subclase: Hemibasidiomicetos
- c) Orden: Ustilaginales
- d) Familia: Ustilagináceas
- e) Género: Ustilado
- f) Especie: Ustilago zeaæ (maydis) (Alexopoulos, --  
1962).

Ustilago. - Género establecido por Persoon y que comprende hongos ustilagináceos, con esporas aisladas que germinan por su promicelio de 1 a 5 células, con conidios laterales y terminales, rara vez con tubo germinativo sencillo. Vulgarmente se conoce con el nombre de carbón, lodón o tizón. (EUJEA, 1929).

Ustilago zeaæ. - Comunmente conocido con el nombre de "huitlacoche", es un hongo que parasita varias partes del huésped, se presenta en forma de vesículas prominentes pequeñas y grandes, cubiertas por una membrana blanquecina, la cual se caracteriza por tener quebraduras de color café olivo, la masa de esporas son de aspecto pulverulento; las esporas en su mayor parte son globosas y subglobosas, de color café olivo claro y de un tamaño de 9-12 micras de diámetro.

En gramínea: la germinación de las esporas es caracterizada -- por la producción de 4 células promicelia, cada célula produce esporidios.

Este es el común tizón de campo que aparece en el maíz tierno y maíz reventón. Es uno de los tizones conocidos más comunes: debido a las grandes vesículas familiares los cuales se producen en la planta de maíz. En algunos países estas vesículas son usadas como alimento cuando son tiernos. (Fisher, 1945).

Un análisis de su composición química nos indica lo siguiente: -

Humedad . . . . .	89.2	g%
Nitrógeno . . . . .	0.26	g%
Cenizas . . . . .	0.7	mg%
Calcio . . . . .	6.0	mg%
Fósforo . . . . .	39.0	mg%
Hierro . . . . .	----	
Caroteno . . . . .	0.0	
Tiamina . . . . .	0.07	mg%
Riboflavina . . . . .	0.26	mg%
Niacina . . . . .	0.69	mg%
Ac. Ascórbico . . . . .	3.7	mg%
Proteína (N) . . . . .	1.62	g%
Extracto etéreo . . . . .	0.43	g%
Fibra cruda . . . . .	1.81	g%

Carbohidratos . . . . .	8.05 g%
Extracto no nitrogenado . . . .	6.24 g%

Este análisis químico nos indica que se trata de un alimento que tiene una gran variedad de componentes útiles para la alimentación, -- (Cravioto, 1951).

El "huitlacoche" por pertenecer al grupo de los basidiomicetos, se caracteriza por tener un micelio bien desarrollado constituido por - hifas septadas, cuyas células tienen uno o dos núcleos según la fase de desarrollo en que se encuentre dicho hongo.

Respecto a su forma de reproducción, las basidiosporas que comúnmente son cuatro, se generan sobre una estructura especial llamada basidio, quedando sostenidas por pequeños peciolo denominados esterigmas.

Los basidiomicetos son hongos que carecen de órganos sexuales especiales diferenciados, sin embargo, la sexualidad está presente aun que reducida a fusión de núcleos y a cambios cromáticos que son muy - interesantes. (Alexopoulos, 1962).

Infección y desarrollo. - La infección del hongo, generalmente se produce antes de que la planta tenga setenta o noventa centímetros de altura. La primera unión de la panoja es el punto más común del ataque. Después de éste hay un crecimiento rudimentario de las mazorcas que se ---

desarrollan de los nódulos inferiores, las raíces adventicias son los --  
únicos puntos por donde puede penetrar la infección, debido a que allí -  
se encuentra tejido en crecimiento. El hongo se halla en estado vegeta-  
tivo constituido solo de micelio; el crecimiento se efectúa paralelo al -  
de la planta y va extendiéndose de manera uniforme por todos los teji--  
dos blandos, atravesando las paredes celulares. Es difícil seguir el de-  
sarrollo del hongo desde su punto de entrada, porque el micelio joven -  
es fino y el que muere es arrojado o bien puede ser absorbido por la --  
misma planta.

La fructificación del hongo puede ser en cualquier parte del vege-  
tal que se encuentre sobre el nivel de la tierra: tallo, raíces adventi--  
cias, hojas, mazorcas o panículo.

El primer paso para la formación de las esporas es la ramifica-  
ción de los hilos miceliales a modo de matorral, originando hinchamien-  
tos o tumores de color marcado, que la madurez de las esporas acaba -  
de completar, así como la multiplicación anormal de los tejidos de la -  
planta, las extremidades de las ramificaciones se ensanchan formando  
extremidades o hifas de células mononucleadas. Dos de estas células -  
sufren más tarde la plasmogénesis, originándose una célula binucleada,  
destinada a formar la clamidospora. La célula llamada basidio, crece,  
su contenido se vuelve densamente granular y las células intercalares -  
o las membranas de las células contiguas se gelatinizan (debido a esto -  
se presenta el aspecto viscoso de la masa), la reabsorción de la gelati-

na da lugar a la liberación de una sola espora. Cuando las esporas llegan a la madurez los dos núcleos se unen, las nuevas paredes se engruesan y se tiene la espora mononucleada característica llamada clamidospora.

Cuando la gelatina se reabsorbe desaparece el aspecto viscoso y nacarado del tumor, convirtiéndose en una masa negra pulverulenta formada por esporas libres. Cuando se llega a romper dicho tumor, las clamidosporas son transportadas por el viento y producen una nueva infección en una o varias plantas.

La germinación se puede llevar a cabo después de un período corto o bien inmediatamente después de alcanzada la madurez, formándose un promicelio dividido en basidios. De cada célula brotan lateralmente una serie de esporidias o basidiosporas las cuales pueden germinar en forma de levadura y cuando eventualmente los brotes o conidias se ponen en contacto con los tejidos del huésped, forman una hifa infecciosa.

Las hinchazones que se pueden presentar varían de tamaño desde 0.5 cm. hasta 14 cm. de diámetro; las menores de 5 cm. aparentemente causan poco daño, a menos que se encuentren en el nivel donde crecen las mazorcas. Los tumores mayores de 5 cm. situados arriba de la mazorca, a menudo causan la esterilidad; los situados abajo, a menos de que el tumor sea muy grande no causan grandes estragos. Una -



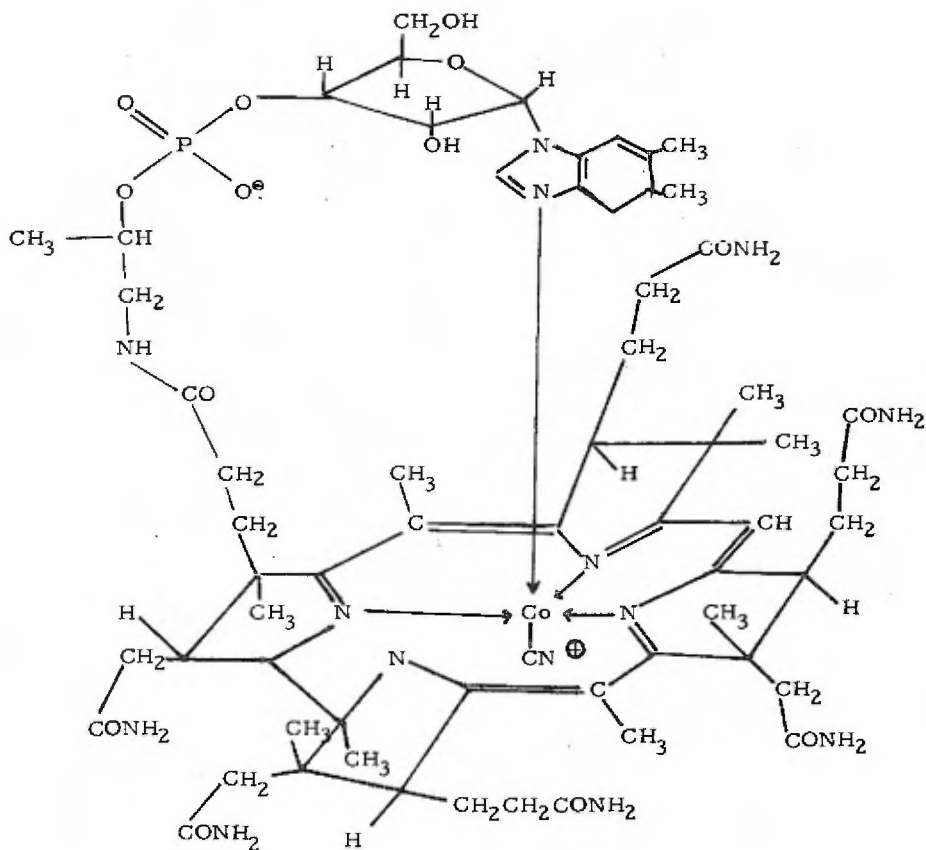
infección en la mazorca causa mayores perjuicios que si dicha infección se localiza en otra parte de la planta.

Con respecto a la susceptibilidad del vegetal para adquirir la infección, las investigaciones que se han llevado a cabo indican que la propensión de las plantas parasitadas es mayor en los suelos bien tratados con abono. Algunos autores explican éste hecho diciendo que las esporas del hongo se encuentran en un medio más apropiado para su desarrollo cuando el suelo es fertilizado.

Otros autores creen que esto es precisamente lo que aumenta el desarrollo del tejido tierno de crecimiento, de donde resulta más accesible la infección.

Usos. - El Ustilago zeae se utiliza como alimento en muchas regiones de nuestro país, como por ejemplo: Jalisco, Michoacán, Edo. de México, etc. Dicho hongo es conocido desde los tiempos de los aztecas y fué el hambre lo que los hizo almacenar el maíz infestado, o "huitlacoche".

## CIANOCOBALAMINA.

Vitamina B<sub>12</sub>

(Cobalamina). (Conn, 1967).

HISTORIA. - Después de muchos años de intenso trabajo, fué aislada -- del extracto de hígado, el factor antianemia perniciosa en 1948, por -- Ricker y colaboradores y por Smith. Desde esta fecha se han publicado centenares de trabajos referentes a la vitamina B<sub>12</sub>. Han aparecido re-

visiones generales de Goldeck (1953), Boettge (1953), Smith (1954), --- Heinrich y Lahaan (1954), Harris et al. (1954), Briggs y Daft (1955), -- Williams et al. (1955) y otros muchos. (Staunton, 1969; Prescott, - - - 1962).

La vitamina B<sub>12</sub> es una vitamina hidrosoluble, conocida comunemente como cobalamina. Las diversas formas estructurales relacionada con la B<sub>12</sub> y que poseen actividad en los animales (vertebrados) --- constituyen el grupo de la vitamina B<sub>12</sub> o cobalaminas. Debe distinguirse este grupo de verdaderas vitaminas B<sub>12</sub>, de la serie de compuestos relacionados que solo promueven actividad de crecimiento en formas -- inferiores de vida y que se designan más adecuadamente como miembros del grupo pseudo-B<sub>12</sub> (Briggs y Daft, 1955). Los integrantes de este último grupo se estima que están estrechamente relacionados, pero sin ser realmente vitaminas. (Prescott, 1962).

El hallazgo de que el principio activo podía ser separado por -- cromatografía siguió el rápido progreso en el aislamiento de la vitamina B<sub>12</sub>.

Se siguió su actividad durante la purificación, por valoración -- microbiológica. La actividad parecía estar asociada a un color rosa. -- Finalmente se aislaron cristales rojos de la sustancia pura. (Staunton, 1969).

PROPIEDADES FISICAS. - Cristales o polvo cristalino color rojo obscuro. Es higroscópica. Cuando el compuesto anhidro se expone al aire -- puede absorber aproximadamente 12% de agua. Es un compuesto hidrosoluble complejo que cristaliza en forma de agujas rojas pequeñas que tienen una rotación específica de  $-59^{\circ}$ . La absorción característica -- máxima del aspecto ocurre a 278  $m\mu$ , 361  $m\mu$  y 550  $m\mu$ . La sustancia cristalina se ennegrece a  $300^{\circ}\text{C}$ . Cristales inodoros e insípidos. 1 g. se disuelve aproximadamente en 80 ml. de agua. Las soluciones acuosas -- son neutras, su estabilidad es máxima a un pH entre 4.5 - 5.0. Las so-- luciones a este pH pueden ser autoclaveadas por 20 min. a  $120^{\circ}\text{C}$ . (Wag-- ner, 1964; Cook, 1965; Stecher, 1968).

PROPIEDADES QUIMICAS. - Es un hecho notable que la cobalamina con tiene alrededor de 4.35% de cobalto. El peso molecular es 1,355, esti-- mado por su estructura. Es soluble en alcohol. Insoluble en acetona, -- cloroformo, éter. Las soluciones acuosas se deterioran en presencia -- de acacia, aldehídos, ácido ascórbico, gluconato ferroso, sulfato ferro-- so y vainillina. Las mismas soluciones se estabilizan por adición de -- sulfato de amonio. (Staunton, 1969).

El compuesto es un complejo de coordinación de cobalto, en que el cobalto es trivalente y tiene un número seis en coordinación. El complejo es neutro y contiene un grupo ciano, enlazado por enlace coordina-- do, un nitrógeno de pirrol coordinado, y un enlace coordinado con un ni-- trógeno de la mitad 5,6-dimetilbencimidazol. Se conocen otros com---

puestos con actividad de B<sub>12</sub> en los cuales el radical cianuro está reemplazado por diversos grupos que forman otras cobalaminas, como hidroxicobalamina, clorocobalamina, nitrocobalamina y tiocianatocobalamina. El tratamiento con cianuro convierte estas moléculas en cianocobalamina.

La similitud de la molécula de cianocobalamina y la de porfirinas es de interés. En la vitamina B<sub>12</sub>, dos anillos de pirrol están unidos directamente en vez de estarlo por el puente de meteno (-CH=) como en otras porfirinas. (Staunton, 1969).

**DISTRIBUCION.** - Las plantas no contienen vitamina B<sub>12</sub>. Los microorganismos sintetizan cobalaminas, en especial los que se hallan presentes en el rumen de animales herbívoros. En el hombre puede haber alguna síntesis bacteriana, pero no en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades, pues como se sabe, depende de las fuentes en su dieta. El hígado y el riñón son fuentes excelentes; los músculos de mamíferos y peces contienen cantidades moderadas, mientras que los vegetales y granos poseen poca o ninguna vitamina. (Staunton, 1969).

La síntesis microbiana es actualmente la fuente principal de la vitamina que se encuentra en el mercado para fines terapéuticos. (Cook, 1965).

**MÉTODOS ANALÍTICOS.** - Los métodos más sensibles se basan en la

estimulación del crecimiento en microorganismos. Se necesitan procedimientos especiales para liberar la vitamina de las formas en que aparece combinada cuando se extrae de muestras brutas. Se ha usado Lactobacillus leichmannii para la determinación de cobalaminas, para lo cual se puede tomar como punto final el crecimiento o la producción de ácido.

Los métodos espectrofotométricos son sensibles y aplicables a sustancias puras. El método de la USP implica la determinación de la absorbancia de una solución de la vitamina, a 361 milimicras.

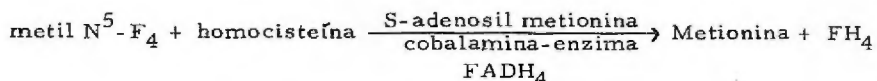
Bruening y otros han publicado pormenores de una técnica de valoración con radioisótopos para cobalaminas y un estudio de la adaptabilidad del método para muestras brutas. (AOAC, 1960; Staunton, 1969).

ASPECTO BIOQUIMICO.- Aunque todavía no se sabe el mecanismo exacto, interviene en dos tipos de reacciones: 1) isomerización de los ácidos dicarboxílicos y 2) conversión de compuestos dihidroxivecinales a grupos de oxi y monohidroxilos. (Conn, 1967).

Una forma de coenzima de B<sub>12</sub>, coenzima 5,6-dimetilbencimidazolcobamida, es idéntica a la vitamina salvo que, en lugar del radical cianuro -CN, lleva unido el cobalto un nucleósido de adenina en el cual el azúcar es 5'-desoxirribosa y en que la unión al cobalto es en el átomo de carbono 5'. La enzima actúa en el sistema enzimático que catali

za la isomerización reversible de metilmalonil CoA a succinil CoA en el metabolismo de mamíferos y microbiano así como en la isomerización de metilaspártato a glutamato en microorganismos. (Staunton, --- 1969).

Otra forma de B<sub>12</sub> tiene un grupo metilo unido directamente al cobalto en lugar del nucleósido de desoxiadenosina. Esta coenzima participa en la formación de metionina a partir de homocisteína, en presencia de N<sup>5</sup>-metil fólico y otros factores. Las evidencias directa e indirecta indican que la formación del grupo metilo de la metionina está relacionada con la vitamina B<sub>12</sub> tanto en extractos de E. coli como en sistemas de mamíferos. Aunque los detalles no han sido elucidados, se ha sugerido una secuencia de reacciones para la interacción de la B<sub>12</sub>, ácido fólico y metionina: (Conn, 1967; Staunton, 1969).



Esta enzima actúa también en la metilación del anillo de purina en la síntesis de timina. Se cree que la vitamina B<sub>12</sub> interviene en el metabolismo de colesterol, en la biosíntesis de porfirina y en otras fases metabólicas. (Staunton, 1969).

Otra función de coenzima de las coenzimas de cobamida es el metabolismo de 1,2-glicoles. Abeles y otros encontraron que los extractos libres de células de Aerobacter aerogenes tratados con carbón -

activo pierden su capacidad para intervenir como mediadores en la con versión de etilenglicol a acetaldehído y de propanodiol a propionaldehído. La actividad se restablecía plenamente en el extracto tratado al a-gregarle coenzima cobamida. Estudios ulteriores efectuados por estos investigadores sugirieron que en la reacción enzimática intervienen una transferencia de hidrógeno del C-1 al C-2 del diol y una pérdida de los elementos del agua:



Otros estudios de purificación de la enzima llamada dioldehidra sa demostraron que la hidroxicobalamina y la cianocobalamina son inhi bidores de esta reacción. Se postularon ciertas interacciones entre en zima y coenzima y se creyó que guardaban relación con la actividad ca lítica. (Staunton, 1969).

En el hombre tiene más interés la relación de la vitamina B<sub>12</sub> - con la anemia perniciosa y otras enfermedades. Castle y otros hace -- unos años sugirieron que en la anemia perniciosa hay carencia de un -- factor intrínseco (factor estomacal) y un factor extrínseco (factor ali - menticio). Se cree que los dos factores reaccionan para formar algo ne cesario para la maduración de los glóbulos rojos. El factor extrínseco (EF) de Castle se ha establecido ahora que es la vitamina B<sub>12</sub>. El fac - tor intrínseco (IF), una mucoproteína de bajo peso molecular, ocurre - normalmente en el jugo gástrico, y la anemia perniciosa se debe a la -



falta de esta substancia, pues la vitamina no es absorbida en su ausencia. El mecanismo todavía no está claro. Sin embargo, se ha propuesto que el IF separa a la vitamina de sus complejos proteínicos naturales con proteínas animales.

Después de ser absorbida en la sangre, la vitamina  $B_{12}$  se combina con las proteínas del plasma y puede circular así hasta los lugares en que ejerce su actividad. La porción que se convierte en coenzima se almacena principalmente en el hígado. Pequeñas cantidades de  $B_{12}$  están presentes en la sangre de individuos normales. Las heces de pacientes de anemia perniciosa contienen grandes cantidades de la vitamina después de su administración por vía bucal, si no se les administra también factor intrínseco. Otro papel del factor intrínseco consiste en su intervención en la retención de  $B_{12}$  por los tejidos. El sorbitol (alcohol polihídrico o alcohol de azúcar, análogo de la glucosa) aumenta la absorción de  $B_{12}$  en el hombre.

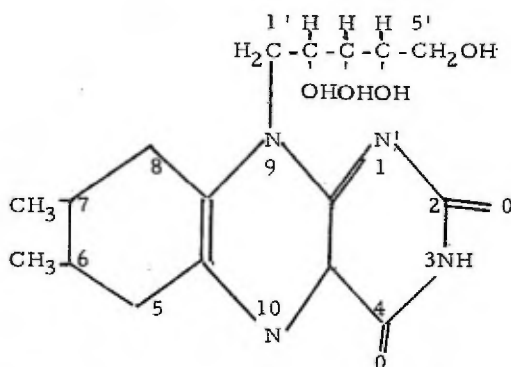
La vitamina  $B_{12}$  se usa clínicamente no sólo en anemia perniciosa. Es eficaz en varias anemias megaloblásticas y en los trastornos neurológicos que acompañan a diversos padecimientos. (Staunton, 1969).

REQUERIMIENTO DE  $B_{12}$ . - La cantidad de vitamina  $B_{12}$  necesaria en la nutrición normal del hombre se desconoce. La inyección de 1 mcg. diario es suficiente para la recuperación y mantenimiento de un paciente de anemia perniciosa. Cuando se administra por vía bucal, y el jugo

gástrico es normal, 5 mcg. diarios son suficientes. Las necesidades diarias en individuos normales podrán caer en este intervalo. Los individuos con anemia megaloblástica por carencia de vitamina B<sub>12</sub> responden a una cantidad tan pequeña como 0.1 mcg. diario administrado parenteralmente. (Cook, 1965).

USOS. - La dosis de cianocobalamina varía según la gravedad de la anemia, su respuesta a la terapia y otros signos y síntomas de la enfermedad. En el paciente con anemia perniciosa no complicada en recidiva, la dosis intramuscular inicial de cianocobalamina es de 30 mcg. inyectados diariamente o en días alternos hasta 10 dosis; después se inyectan 15 a 30 mcg. una o dos veces a la semana hasta que el cuadro sanguíneo sea normal. Los pacientes en estado grave y los que sufren infecciones interrecurrentes o tienen complicaciones neurológicas requieren un tratamiento parenteral vigoroso y dosis mayores tanto en la terapia inicial como en la de mantenimiento. (Cook, 1965).

## RIBOFLAVINA.



La riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) está formada por un alcohol de azúcar (D-ribitol) unido por sustitución, a un anillo de isoaloxazina (Conn, 1967).

**HISTORIA.** - El estudio inicial de la riboflavina o de un derivado de la riboflavina fué el aislamiento de un pigmento resinoso impuro, llamado lactocromo, por Blyth en 1879, Emmett y McKum indicaron la presencia de dos vitaminas hidrosolubles en el salvado de arroz, una que curaba la polineuritis de la rata y otra que producía ganancia de peso en ratas alimentadas con raciones específicas. Ahora sabemos que el segundo factor contenía riboflavina, y en aquel tiempo el principio fué llamado vitamina B<sub>2</sub> o vitamina G. Bleyer y Kallmann aislaron un pigmento amarillo del suero de leche, y Blooher presentó pruebas que indicaban la probable identidad de la vitamina G (B<sub>2</sub>) y del pigmento amarillo hidrosoluble con fluorescencia verde del suero de leche. En 1932, Warburg y Christian aislaron un fermento respiratorio amarillo (enzima a-

marilla de Warburg) de la levadura de baja fermentación. Este fué separado después en una fracción proteínica y una pequeña molécula de pigmento (riboflavina), ninguna de las cuales sola poseía actividad enzimática. Kuhn y colaboradores, en 1933, aislaron de la leche y otros alimentos riboflavina pura. Las sustancias lactoflavina (leche), aislada por Ellinger, hepatoflavina (higado), ovoflavina (huevos), aislada por Wagner-Juaregg y sus asociados, verdoflavina (césped), citoflavina aislada por Bauza y Szent-Györgii, biocromo, aislado por Ellinger y Koschara, resultaron ser químicamente idénticas a la riboflavina, y se reconoció finalmente que la riboflavina es en realidad la sustancia que había sido llamada vitamina B<sub>2</sub>. La estructura de esta vitamina fué establecida en 1935 por síntesis por Kuhn. (Maller, 1967; Staunton, 1969; Cook, 1965).

PROPIEDADES FISICAS. - Polvo cristalino, amarillo o amarillo anaranjado, con un ligero olor. Se funde aproximadamente a 280°C y su solución saturada es neutra al tornasol. Cuando está seca, no la afecta en forma apreciable la luz difusa; pero en solución, especialmente en presencia de álcalis, se deteriora con gran rapidez, acelerándose esta deterioración con la luz. Su rotación específica es de -122° (50 mg. secados previamente en la oscuridad a 105°C. durante 2 horas, disueltos en una mezcla de 2 ml. de NaOH alcohólica 0.1 N y suficiente agua fría (exenta de CO<sub>2</sub>) para completar exactamente 10 ml; la determinación se hace en 30 min. después de haber preparado la solución).

Los puntos de absorción máxima son: 220-225, 226, 371, 444, 475 milimicras.

Un gramo se disuelve en 3,000 a 15,000 ml. de agua aproximadamente; las variaciones de solubilidad se deben a la diferencia en la estructura cristalina interna de la riboflavina. Es más soluble en solución isotónica de cloruro de sodio y menos soluble en alcohol que en agua. Es insoluble en éter, cloroformo, acetona y benceno, pero muy soluble en soluciones diluidas de álcalis (con descomposición).  $pK_a$  -- 10.2;  $pK_b$  1.7. El pH de saturación en solución ácida es de 6 aproximadamente. Las soluciones acuosas son amarillas mostrando una --- fluorescencia verde. Es estable en ácidos minerales en la oscuridad. (Stecher, 1968; Cook, 1965).

**PROPIEDADES QUIMICAS.** - La riboflavina difiere de la lumiflavina - (producto de fotólisis de riboflavina) en que la primera hay un grupo - D-ribitilo en substitución del grupo metilo en posición 9 de lumiflavina. La D en el nombre químico de riboflavina indica que el grupo ribitilo está relacionado con la serie D de los azúcares. La riboflavina es reducida reversiblemente por tiosulfato  $H_2S$  y  $H_2$ , con formación de - la leucorriboflavina, incolora. Los oxidantes fuertes la descomponen, pero el agua de bromo y  $H_2O_2$  tiene poco efecto. La molécula es en - general estable frente a ácidos y lábil a los álcalis, la luz visible y la luz ultravioleta la descomponen irreversiblemente.

Una purina preformada puede ser convertida a riboflavina, -- aunque no se sabe con certeza si las purinas son normalmente precursores directos. (Staunton, 1969; Stecher, 1968; Cook, 1965).

DISTRIBUCION. - Se demostró que en un factor de crecimiento para las ratas. Se obtiene comercialmente a partir del medio de cultivo de ciertos microorganismos que la liberan. La vitamina se halla en la naturaleza exclusivamente como integrante de las dos flavinas coenzimas, el mononucleótido (FMN) y el adenín dinucleótido (FAD). (Conn, 1967).

Todas las células de vegetales y animales contienen la vitamina. Las semillas de plantas la sintetizan durante la germinación. Algunas bacterias, hongos filamentosos y las levaduras son fuentes --- abundantes de la vitamina. El tejido muscular contiene baja concentración de riboflavina, pero ciertos órganos internos, como el hígado y el riñón pueden contenerla en cantidades apreciables. La leche, la orina y la retina contienen principalmente la vitamina libre. Los nucleótidos pueden estar combinados en parte con proteínas específicas para formar enzimas. (Staunton, 1969; Goodwin, 1963).

METODOS ANALITICOS. - Snell y Strong fueron los primeros que midieron la potencia de las vitaminas por medio de microorganismos. El Lactobacillus casei es incapaz de sintetizar la riboflavina que necesita para su propio crecimiento. Al agregar cantidades graduadas de ri

boflavina en una serie de tubos de cultivo que contienen un medio deficiente en la vitamina, se encuentra que el crecimiento es directamente proporcional a la cantidad de vitamina agregada, dentro de cierto intervalo. Se mide por la producción de ácido láctico o por la turbiedad del medio de cultivo.

Un método fisicoquímico para determinar la riboflavina, se basa en la medida de la fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia de una solución de riboflavina (en condiciones especificadas) es proporcional a la concentración de vitamina. La luz con longitud de onda en la región de 400 a 500 milimicras induce la fluorescencia, y la intensidad de la misma puede medirse con uno de los diversos fluorofotómetros comerciales.

Yagi ha descrito métodos de separación de las diversas formas de riboflavina, por cromatografía en papel y electroforésis en papel, y una técnica simplificada para su determinación. (AOAC, 1960; Cook, - 1965).

ASPECTO BIOQUIMICO. - Las enzimas llamadas flavoproteínas son las que contienen riboflavina. Se conocen dos coenzimas mononucleótido de riboflavina (FMN) y dinucleótido de flavina y adenina (FAD) (Staunton, - 1969).

Los nucleótidos FAD y FMN se combinan con diferentes apoenzi

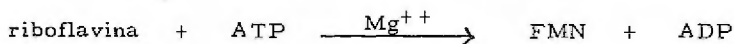
mas para formar gran número de enzimas de oxidación-reducción. A diferencia de las piridin nucleótidos deshidrogenasas, las coenzimas -- prostéticas FAD y FMN se hallan firmemente unidas a la proteína y -- van juntas durante todo el proceso de purificación de la enzima. Así ve mos que las flavincoenzimas únicamente se separan de la apoenzima -- tratándolas en frío, por ácidos o por ebullición. Este último procedi--- miento destruye la proteína de la apoenzima (desnaturalizada) y la sepa ración es irreversible. La separación en frío por ácidos es reversible, y mezclando la flavincoenzima con la apoenzima se recupera la activi-- dad. (Conn, 1967).

El FAD, se encuentra en la xantin oxidasa, la oxidasa de D-aminoácidos, la oxidasa de aldehído y la deshidrogenasa fumárica. El --- FMN está asociado con la enzima amarilla de Warburg, la reductasa de citocromo C, la oxidasa de l-aminoácidos, y otras. Estas enzimas fun cionan en sistemas de transporte electrónico.

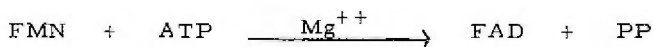
El FAD y FMN se encuentran en un gran número de sistemas -- que funcionan en el metabolismo de carbohidratos y sirven como agen-- tes para la transferencia de hidrógeno entre el ácido nicotínico conte-- niendo coenzima I y II y el citocromo de hierro porfirina. Estas enzi-- mas flavin actualmente constituyen solamente parte de un sistema com-- plejo de enzimas que transportan hidrógeno de un sustrato de oxígeno-- molecular formando agua.



El mononucleótido (riboflavina-5'-fosfato) se sintetiza a partir de la vitamina B<sub>2</sub> y ATP bajo la influencia de una enzima flavocinasa:



El ATP reacciona con el mononucleótido para formar FAD. La enzima por cuya mediación se efectúa esta reacción ha sido llamada pirofosforilasa de nucleótido de flavina o sintetetasa de FAD:



Tong y otros han demostrado que el FMN tiene acción estimulante en la conversión de yoduro y yodoproteína, por preparados de mitocondrias y microsomas de glándula tiroides de ovejas. Las pruebas indican que la mayor conversión es enzimática y es inhibida por tio-uracilo y otras moléculas bociógenas.

En carencia moderada de riboflavina, los tejidos no mostraron disminución en la actividad de deshidrogenasa DPNH (flavoenzima), según Burch y colaboradores. En carencia grave, la actividad de xantina oxidasa guardó paralelismo con la disminución en FAD, mientras a la disminución en FMN siguió disminución en la actividad de oxidasa de D-aminoácidos.

Entre los antagonistas de la riboflavina encontraron la galacto-

flavina (Emerson y colaboradores). El derivado dietílico es antagonista en ratas, sin embargo puede reemplazar a la riboflavina en el crecimiento de L. casei. Egami y otros demostraron que el monosulfato de flavina inhibe la oxidasa de D-aminoácidos y es inhibidor del crecimiento de L. casei. Otros antagonistas son los analógos formilmetílico e hidroxietílico.

La carencia de riboflavina en el hombre va acompañada por conservación anormal del tejido ectodérmico. Los signos usuales de ello son: a) inflamación de la lengua (glositis); b) queilosis o fisuras en los ángulos de la boca y de los labios y c) dermatitis seborréica. (Stanton, 1969).

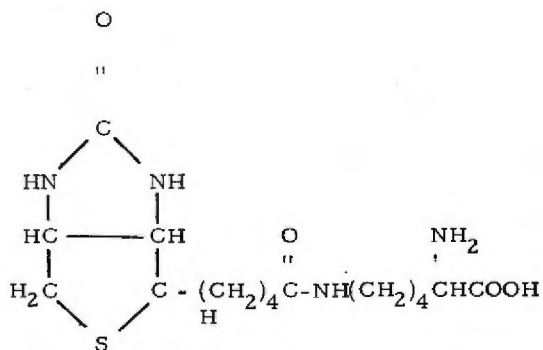
Necesidades de riboflavina en el organismo. - La demanda de riboflavina se ha fijado en 1.6 mg. por día para el adulto por la Junta de Alimentos y Nutrición. La medida de las necesidades humanas ha sido difícil de precisar, y una cifra más exacta puede depender de que haya una mejor comprensión de los factores que afectan a la síntesis intestinal. (Cook, 1965).

USOS. - No está muy extendida la deficiencia de riboflavina en el hombre en ninguna parte del mundo; pero es indudablemente un factor que complica otras enfermedades carenciales, como la pelagra. Para fines terapéuticos se han administrado dosis diarias de 1 a 10 mg. La desaparición rápida de los síntomas de arriboflavinosis ocurre con dosis de

10 mg. y se duda acerca de la conveniencia de administrar cantidades mayores.

Los concentrados de riboflavina obtenida de la levadura o de los residuos de la fermentación acetona-butanol, que tienen un elevado contenido de riboflavina, se usan extensamente como aditivos en los ali---mentos para animales. (Cook, 1965).

## BIOTINA.



(Cook, 1965)

Cis tetrahidro-2-oxotieno (3,4-d) imidazol 4 ácido valérico (Stecher, 1968).

La biotina, uno de los miembros del grupo B de vitaminas, se conoce bajo muy diversos nombres, entre ellos Bios II, Vitamina H y Coenzima R. (Staunton, 1969).

HISTORIA.- En 1916 ya se había observado la toxicidad de dietas ricas en clara de huevo. Unos años después, Boas describió el daño producido por clara de huevo en ratas alimentadas con dietas que contenían clara de huevo cruda como fuente de proteínas. La autora describió como síntomas de este síndrome: incoordinación muscular, dermatitis, pérdida de pelo y manifestaciones nerviosas. Observó, asimismo; que la clara de huevo cocida no era tóxica y que el hígado, la levaduras y otros alimentos parecían contener una sustancia que protegía a las ratas -- contra la toxicidad de la proteína de clara de huevo cruda. La substan-

cia protectora fué llamada Vitamina H por Gybrgy; Lease y Parsons - demostraron que los pollos eran también susceptibles a daños producidos por clara de huevo. Williams y colaboradores demostraron; unos - seis años después, que la enfermedad de la clara de huevo en ratas y - pollos se debía en realidad a una antivitamina en la clara de huevo. Esta substancia, conocida como avidina, es una proteína básica, y su capaci - dad para inactivar a la biotina fué confirmada en 1941. (Staunton, 1969).

Antes de esa fecha, en 1936 Kögl y Tonnis habían aislado de la - yema de huevo desecada, un poderoso estimulante del crecimiento de - levaduras que había sido llamada biotina. Se dió el nombre de coenzi - ma R a otro factor de crecimiento aislado en 1933. Fué ya en 1940 --- cuando György, du Vigneaud y colaboradores anunciaron la identidad de la vitamina H (factor antienfermedad de la clara de huevo), coenzima R y biotina. (Cook, 1965; Staunton, 1969).

Du Vigneaud y colaboradores caracterizaron la biotina y publica - ron su estructura en 1942. Harris y otros anunciaron la síntesis de -- d-biotina, en 1943. Ha habido desde entonces muchos progresos en la - síntesis y hoy se dispone de biotina fácilmente para efectuar trabajos - de investigación.

La elucidación de la naturaleza de la biotina es única entre los - estudios efectuados en el campo de las vitaminas. El verdadero progre - so se logró después de la demostración del efecto tóxico de la clara de

huevo y luego se encontró que los alimentos contenían una sustancia protectora, de naturaleza semejante a la de una vitamina. Después se demostró que la avidina de la clara de huevo se combina con la biotina de los alimentos y la inactiva, lo cual quizá también hace con la producida por bacterias intestinales, con el resultado de causar una carencia dietética. (Staunton, 1969).

PROPIEDADES FISICAS. - La biotina se presenta en cristales en forma de agujas largas, finas, incoloras que funden a 231-232°C. Soluble en agua. (0.03 a 0.04 g. en 100 ml. a 25°C) y en alcohol (0.06 g. en 100 ml. a 25°C). Las soluciones acuosas (pH 4-9) son estables a 100°C y la sustancia seca es termoestable y fotoestable. Es estable al calor en soluciones ácidas concentradas, pero inestable en soluciones alcalinas y lo inactivan los oxidantes como peróxido de hidrógeno y permanganato. La rotación específica,  $(\alpha)_D^{26}$ , es 91.0° en NaOH 0.1N, su punto isoeléctrico es a pH de 3.5 y muestra absorción máxima en la región ultravioleta a una longitud de onda de 234 milimicras. (Stecher, 1968; Staunton, 1969).

PROPIEDADES QUIMICAS. - El compuesto puro es estable en presencia de aire. Las sales de este ácido monocarboxílico son muy solubles: la sal sódica puede prepararse en solución acuosa al 20%. Soluciones de biotina moderadamente ácidas y neutras son estables por varios meses, soluciones alcalinas son menos estables, pero parece que es razonablemente estable a un pH de 9. Las soluciones ácidas pueden ser esterili-

zadas por calor. Es incompatible con ácido nitroso, formaldehído, clo-  
ramina T, ácidos fuertes o álcalis. (Stecher, 1968; Staunton, 1969).

DISTRIBUCION. - La biotina se halla muy difundida y se encuentra en -  
tejidos vegetales y animales. Entre los alimentos ricos en biotina figu-  
ran hígado, riñón, melazas, levadura, leche y yema de huevo. La vita-  
mina se encuentra combinada con proteína a través del enlace  $\epsilon$ -N-bio-  
tinil-L-lisina. La hidrólisis de proteínas conteniendo Biotina liberan --  
Biocetina  $\epsilon$ -N-biotinil-L-lisina, debido a que su unión con las proteí--  
nas se hace por medio de enlaces péptidos covalentes, la biotina no se  
disocia por diálisis, técnica corriente para separar grupos disociables  
tales como piridin nucleótidos. De aquí que no se conozcan enzimas --  
que se vuelvan activas añadiendo biotina a la apoenzima. Sin embargo, -  
una enzima que contenga biotina se inhibe añadiendo avidina.

Las hortalizas, las nueces y los granos contienen también bioti-  
na en forma libre y combinada. Para el hombre y para algunas espé---  
cies animales, la biotina producida por las bacterias presentes en el --  
intestino grueso pudieran ser una fuente más importante (cuantitativa--  
mente) que la correspondiente a la dieta. (Staunton, 1969; Conn, 1967).

METODOS Y PRUEBAS ANALITICAS. - Hay procedimientos microbió--  
logicos de ensayo para la biotina, empleando Lactobacillus casei, Lac-  
tobacillus arabinosus o Saccharomyces cerevisiae. También son útiles  
los bioensayos en que el agotamiento de biotina se logra en los anima--



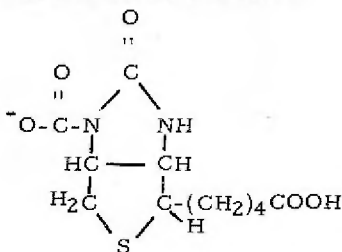


Para que el  $\text{CO}_2$  pueda carboxilar el átomo de C- $\alpha$  en las reacciones 1 y 2 deben estar presentes ATP y Mg. En la reacción 3 no es necesario añadir cofactores. La reacción producida podremos deducirla al conocer la etapa de activación del  $\text{CO}_2$ .

Parece ser que el complejo carboxil-biotinil proteína es la verdadera unidad carboxilante donadora de  $\text{CO}_2$ . (Conn, 1967).

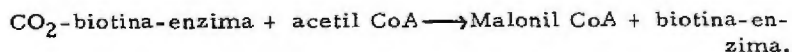
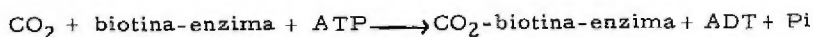
El oxalacetato estimula el crecimiento de L. arabinosus en un medio pobre en ácido aspártico y biotina. Este es probablemente resultado de la incapacidad del organismo carente para condensar ácido pirúvico con  $\text{CO}_2$  a fin de formar oxalacetato, que entonces podría ser transaminado, con formación de ácido aspártico, (Wagner, 1964).

La carboxilasa propionil CoA reacciona con  $\text{CO}_2$  y ATP; de esta manera, la enzima incorpora  $\text{CO}_2$  en forma de ácido propiónico (como propionil CoA) para formar metilmalonil CoA. El  $\text{CO}_2$  reacciona con biotina y forma una combinación  $\text{CO}_2$ -biotina (una molécula de  $\text{CO}_2$  activa). No está bien establecido cuál sea el punto de unión de  $\text{CO}_2$ , pero según Lynen y colaboradores el  $\text{CO}_2$  se combina con el átomo de nitrógeno, como se indica en la estructura mostrada.



combinación biotina- $\text{CO}_2$

De otra reacción de carboxilación resulta ácido malónico a partir de ácido acético. En estas reacciones de carboxilación, el proceso se supone que actúa como un mecanismo de dos pasos:



El punto de unión del  $\text{CO}_2$  en la transcarboxilasa oxalacética está también en el nitrógeno indicado de la biotina, según Wood y otros.

En la producción de urea en el organismo, un paso implica la reacción de fosfato de carbamilo y ornitina para formar citrulina. Mac Cleod y otros demostraron que el hígado de ratas con carencia de biotina podía efectuar esta conversión a una velocidad mitad que la de esta reacción en hígados normales.

En los microorganismos está bien establecido el papel de la biotina en la síntesis de purina. Un paso en la síntesis es la fijación de  $\text{CO}_2$  (ribótido de 5-aminoimidazol (AI) +  $\text{CO}_2 \longrightarrow$  ribótido de ácido 5-amino-4-imidazol-carboxílico (AICA). Es en este punto cuando interviene la biotina, pues el AI se acumula en Saccharomyces cerevisiae en condiciones de carencia de biotina y es utilizado en la formación de AICA al suministrar al microorganismo la vitamina. Es bastante interesante que la biotina parezca intervenir también en un paso subsiguiente,

la formación del derivado carboxamida. (Stecher, 1968).

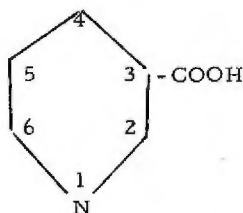
CARENCIA, REQUERIMIENTO Y DESTINO DE LA BIOTINA. - Syden-tricker y colaboradores hicieron pruebas en adultos voluntarios admi-nistrándoles una dieta a base de clara de huevo cruda. Después de 3 - 4 semanas observaron dermatitis transitoria y poco después laxitud, ano-rexia, dolores musculares e hiperestesia. La administración diaria de 150 a 300 mcg. de un concentrado de biotina alivió estos síntomas. Du-rante el curso del experimento, disminuyó la excreción urinaria de biotina, que ascendió bruscamente con la terapéutica vitamínica.

El requerimiento de biotina de los microorganismos está bien - establecido mientras que en los animales no existe por el momento un método práctico para establecer la necesidad cuantitativa de esta vita--mina, pues les es proporcionada gran cantidad de ella por síntesis bac-teriana intestinal. De todos modos, las necesidades diarias de la vita--mina parecen satisfacer con dietas con contenga de 150 a 300 mcg.

Mistry y colaboradores sacrificaron ratas y pollos, una o dos - horas después de administrarles una inyección de biotina marcada con  $C^{14}$  en el carboxilo. Se halló en el hígado un máximo de 14% de la acti-vidad. Después del homogenizado de hígado, se halló del 39 al 53% de - dicha actividad en el sobrenadante, de 18-19% en mitocondrias, de 15 - a 23% en substancia nuclear y sólo 2% en los microsomas. (Staunton, - 1969).

## ACIDO NICOTINICO.

El ácido nicotínico (ácido nicotínico, ácido 3-piridincarboxílico, ácido piridin- $\beta$ -carboxílico, factor PP (preventivo de la pelagra), vitamina PP, vitamina antipelagra). Este compuesto es comunmente conocido como niacina, especialmente con referencia a su papel como una vitamina, La Niacina y Nicotinamida son considerados como parte de las vitaminas del complejo B.

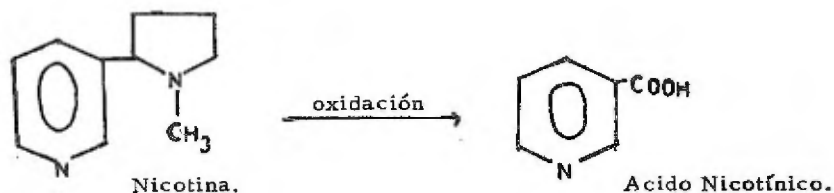


Acido Nicotínico (Niacina) :

Acido 3- piridincarboxílico.

HISTORIA.- La falta de niacina en la dieta causa pelagra en el hombre y lengua negra en el perro. la pelagra se sabe que ha existido en España desde 1735 pero fué reportada en el sur de Estados Unidos hasta el siglo XX; donde hubo 170,000 casos anuales de 1910-1935.

El nombre de ácido nicotínico se debe a que fué obtenido por primera vez en 1867 en Alemania por C. Huber de la oxidación de la nicotina con dicromato de potasio:



En la próxima tabla se dá una breve cronología sobre la niacina y deficiencia de ésta.

#### Cronología de Niacina y su deficiencia.

Año	Desarrollo
1735	La pelagra era reconocida por el Médico Español Real Don Gaspar Casal.
1830	5% de la gente del Norte de Italia padecieron la pelagra.
1850	Enfermedad endémica en toda Francia.
1863	Pelagra reportada en los Estados Unidos por Gray en New York y Tyler en Massachusetts.
1867	Huber preparó ácido nicotínico por la oxidación de nicotina.
1870	Huber estableció una fórmula del ácido nicotínico, $C_6H_5O_2N$ .
1912	Se presentaron 30,000 casos de pelagra con un 40% de rango de fatalidad en los Estados Unidos.
1911-1913	Funk aisló niacina de levaduras.
1912	Suzuki y colaboradores aislaron niacina de salvado de arroz.
1915	Goldberger comprobó que la pelagra sería prevenida por la dieta conveniente y produjo pelagra experimentalmente en prisioneros voluntarios.

- 1925 Goldberger estableció que la pelagra es causada por una deficiencia de vitamina.
- 1935 Warburg y Christian encontraron nicotinamida en la coenzima de los eritrocitos.
- 1937 Elvehjem y colaboradores establecieron la relación entre nicotinamida, extractos vivientes activos y la propia enfermedad con la deficiencia de vitamina.
- 

PROPIEDADES FISICAS. - El ácido nicotínico se presenta en cristales de forma de agujas regulares o polvo cristalino, inodoro o con poco olor, y con sabor ácido. Es soluble en agua, pero la solubilidad varía de acuerdo a la temperatura, el ácido nicotínico es soluble en agua hirviendo y etanol. También es soluble en glicerol, propilenglicol, soluciones alcalinas y ácidos diluidos, pero insoluble en éter. Se funde a 235-237°C, se sublima sin descomponerse. Tiene un pK de 4.76 y su solución saturada muestra un pH de 2.7. A 22°C da dos constantes de disociación ácidas:  $1.12 - 1.23 \times 10^{-5}$  para el protón carboxílico y  $3.55 \times 10^{-11}$  para el protón cuaternario básico del N. Su absorción en ultravioleta es de 263 milimicras.

PROPIEDADES QUIMICAS. - No es higroscópico, muy estable en presencia de aire, resiste el autoclave a 120°C por 20 min. Sin embargo, en un medio alcalino y con temperaturas elevadas sufre descarboxilación para formar piridina. La niacina es estable a la oxidación en presencia de los agentes oxidantes comunes, aún a elevadas temperaturas.

Las irradiaciones de Ultravioleta a 235.7 milimicras producen cambios espectrales y productos biológicamente inactivos. La cantidad de ácido nicotínico en diferentes comestibles es más estable si el pH se mantiene cerca de 4.5 - 5.0 . Como tiene un grupo carboxílico, el ácido nicotínico forma sales con varios metales como Na, Ca, Cu, Al, etc. Los metales pesados, como el Cu, generalmente se usan en el análisis, purificación y recuperación del ácido en soluciones diluídas; las sales de aluminio se pueden administrar terapéuticamente. Como derivado de la piridina, también hidroclozuros o sales obtenidas de ácidos fuertes excepto el HCl.

DISTRIBUCION. - El ácido nicotínico ha sido encontrado en pequeñas cantidades en toda clase de bacterias, plantas y animales. Se pueden encontrar cantidades apreciables en órganos de animales, como hígado, riñón, cerebro, sangre y glándulas adrenales. La levadura y los hongos también son buenas fuentes, así como la alfalfa, algunas legumbres, los cereales completos y el maíz. La vitamina está libre sólo después de una hidrólisis ácida o alcalina, que libera la niacina de una combinación péptica, haciéndola inútil aún con digestión. El ácido nicotínico y la nicotinamida se encuentran normalmente combinadas en forma de grandes moléculas unidas a un azúcar pentosa (D-ribosa), ácido fosfórico y algunas veces a la purina, ácido adenílico nucleótido, formando los compuestos de la siguiente tabla, de los cuales se separa por el proceso de aislamiento.

## Formas naturales biológicamente activas de Acido Nicotínico

## combinado y Nicotinamida.

Nombre del compuesto	Composición
Nucleósido nicotinamida	nicotinamida-ribosa
Mononucleótido nicotinamida	nicotinamida-ribosa-fosfato
Dinucleótido adenina nicotinamida	nicotinamida-ribosa-fosfato adenina-ribosa-fosfato fosfato
Fosfato de dinucleótido adenina nicotinamida (NADP)	nicotinamida-ribosa-fosfato adenina-ribosa-fosfato

La amida participa en la transferencia de electrones biológicos como la porción funcional de los nucleótidos NAD y NADP que actúan -- como coenzima de muchas reacciones enzimáticas de óxido-reducción.

MÉTODOS Y PRUEBAS ANALÍTICAS. - La identificación de niacina y - niacinamida puede ser fácilmente hecha por la siguiente prueba: colocar una gota de solución en papel filtro, rociar la zona con solución alcohólica de O-tolidina al 1.5% y colocar el papel en una atmósfera de bromuro de cianógeno, generalmente en un matraz de boca ancha que contenga cristales de este reactivo, guardarlo herméticamente cerrada todo el tiempo en frío. Tan poco como 1  $\mu$  puede ser detectado cuando aparece un punto rojo. la niacinamida y otras piridinas también dan positiva esta prueba, pero el ácido isonicotínico dá un color púrpura. Esta Reacción ha sido usada para distinguir el bacilo tuberculoso humano del



tipo bovino, ya que éste no sintetiza cantidades apreciables de niacina.

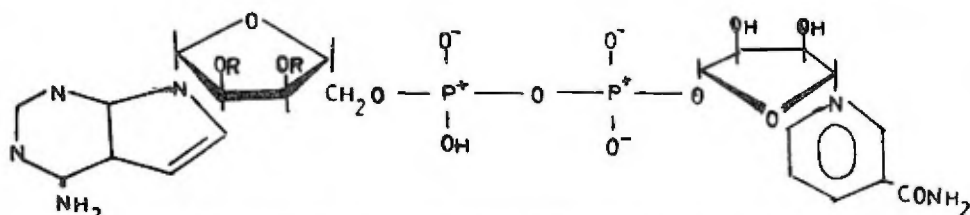
Sin embargo, el método más seguro, porque suministra no solamente datos químicos sino también biológicos, es la prueba microbiológica, que usa Lactobacillus arabinosus o un organismo similar. El crecimiento puede ser estimado por lecturas de turbiedad o por titulación de ácido láctico formado.

ASPECTO BIOQUIMICO. - Una deficiencia nutricional de la niacina resulta en un complejo de síntomas llamado pelagra en humanos y lengua negra canina en perros. La pelagra se caracteriza por demencia, diarrea y dermatitis y ha sido correlacionada con climas cálidos y dietas a base de maíz. La asociación de pelagra con una dieta de maíz confundió a los investigadores hasta que se estableció una relación entre triptofano y ácido nicotínico. Se encontró que un bajo crecimiento inducido en ratas por una dieta de maíz deficiente en ácido nicotínico sería regresado a lo normal por la adición de 1 mg. de ácido nicotínico o 50 mg. de L-triptofano para cada 100 g. de dieta. La pelagra aparece, por lo tanto, cuando la dieta es deficiente en ácido nicotínico y triptofano. Harden y Young establecieron en 1904 que un cofactor dializable era requerido por el extracto de levadura para convertir glucosa a etanol. Este cofactor se ha demostrado que es NAD.

Warburg y Christian en un estudio de la oxidación de glucosa-6-fosfato por eritrocitos de mamíferos establecieron el requerimiento pa

ra un cofactor dializable similar, el cual reemplazaría el factor de --- Harden y Young. Esta coenzima está compuesta de 1 ml. de nicotinamida, 1 ml. de adenina, 2 moles de pentosa y 3 moles de fosfato.

Las enzimas han sido aisladas, las cuales catalizan la interconversión de NAD a NADP en presencia de adenosintrifosfato (ATP).

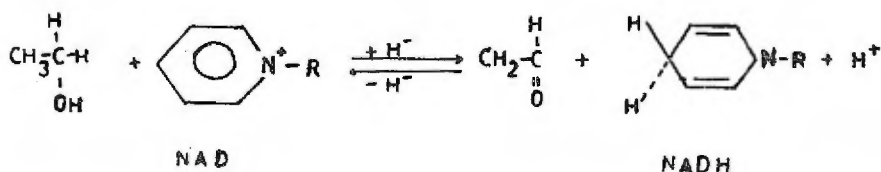


Estructura de NAD (donde R=H) y NADP (donde R=PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>).

Aproximadamente la mitad de todas las reacciones de oxidación-reducción son catalizadas por la deshidrogenasa utilizando cualquiera de los dos NAD o NADP como coenzimas (Ver fig. superior). Estas enzimas piridin-nucleótidos dependientes son típicamente específicos por cualquiera de los dos, NAD o NADP.

NAD oxidado tiene una absorción máxima cerca de 260 milimicras, la cual es la absorción de las porciones de adenin y nicotinamida de la molécula. Sin embargo, en la reducción, la absorbancia a 260 -- disminuye y una nueva banda aparece con un máximo de 340 milimicras. Esta banda es característica de dihidronicotinamida e indica que la mitad de nicotinamida, es el lugar en el cual se lleva a cabo la reducción. Esta reducción fué demostrada que ocurre en la posición 4 de la mitad-

de la nicotinamida. En la reducción del NADP un nuevo centro asimétrico es producido y la estereoespecificidad de la introducción del hidrógeno adicional ha demostrado ser específica para una variedad de enzimas. Entonces las deshidrogenasas NAD y NADP-ligadas pueden ser clasificadas como A o B con respecto a su requerimiento para los isómeros  $\alpha$  o  $\beta$  de nicotinamida adenin nucleótido reducido. Usando deuterio marcada se reduce el  $\text{NAD}^+$ , Vennesland y Westheimer pudieron demostrar que la deshidrogenasa alcohólica y la deshidrogenasa láctica, ambas requieren la forma  $\alpha$  de NADP. Hay solamente un ejemplo conocido de una enzima la cual puede intercambiar hidrógeno a ambos lados de la nicotinamida media. Esta enzima es la lipoideshidrogenasa. Estereoespecíficamente es manifestado no solamente con respecto a la coenzima; pero al menos en el caso de la deshidrogenasa alcohólica, también es manifestado con respecto al hidrógeno en la posición 1 del etanol. Entonces, al menos en este caso único, estereoespecíficamente con respecto al sustrato y coenzima es presentado. En un juicio formal, las reacciones dependen de NAD y NADP que implican la interferencia de un ión hidrógeno, que es, un núcleo de hidrógeno que posee 2 electrones entre el sustrato y la coenzima:



donde R= porción de la molécula de NAD que no participa en la reacción.

Sea que en efecto una transferencia del ión hidrógeno ocurre o, la alternativa, transferencia de un ión sucedido por una transferencia de un electrón en un segundo paso, no es conocido. Sin embargo, Westheimer ha estudiado algunas reacciones modelos las cuales sugieren -- que la reducción ocurre por la transferencia del ión hidrógeno, más -- que por la ruta de un radical libre.

**BIOSINTESIS DE NAD Y EL CICLO DE PIRIDIN NUCLEOTIDO.** - El esquema resume la síntesis, interrupción y resíntesis de NAD, Hace poco investigadores propusieron la biosíntesis de NAD desde nicotinamida, ribosa-1-fosfato, y ATP. Sin embargo, un mecanismo sintético mucho más significante fisiológicamente fué descubierto en eritrocitos humanos donde la nicotinamida y fosforibosilpirofosfato condensado se -- unen para producir nicotinamida mononucleótido y pirofosfato. Sin embargo, esta reacción que fué descubierta requiere de una alta concentración de nicotinamida y un Km aparentemente alto, esto hace difícil -- que esta reacción fuera significante en la síntesis de NAD. Subsecuentemente, fué descubierto que el ácido nicotínico sería convertido a nicotinato mononucleótido (NMN) y que la enzima tuvo una afinidad muy fuerte por el ácido nicotínico. Estas observaciones condujeron a las conclusiones que el nicotinato era el precursor de elección para la síntesis de -- NAD (método de Preiss-Handler). Sin embargo, recientemente ha sido aclarado que esto, en efecto, representa un camino de solución, permitiendo que el nicotinato sea reciclado para formar NAD. De nuevo la -- biosíntesis aparece para resultar de la producción de ácido quinolínico

ya sea triptofano o aspartato y glicerol, con la condensación de fosforribosilpirofosfato para producir nicotinato de mononucleótido. La enzima responsable quinolinato-fosforribosil pirofosfato transferasa, fué observada primero en homogenizado de hígado por Nishiyuka.

El descubrimiento de una desamidasa, la nicotinamida hepática permite la terminación del ciclo de nicotinamida a nicotinato. En cuanto al resto, permanece la duda de como sí la biosíntesis de NAD ocurra por vía del ácido nicotínico bajo condiciones fisiológicas, puesto que la mayoría de los estudios han ocurrido bajo condiciones fluctuantes de la nicotinamida, ej. concentraciones altas. Sin embargo, estas concentraciones de nicotinato fueron usadas en experimentos de perfusados de hígados de ratas. Se concluyó que el ácido nicotínico se convierte en NAD exclusivamente a través del ciclo metabólico de Preiss-Handler y que muy poca o ninguna desaminación de la nicotinamida ocurre en perfusado de hígado de ratas. La nicotinamida fué metilada bajo estas condiciones. En adición, hay parámetros cinéticos de desamidasa de nicotinamida la cual aparentemente hace difícil aceptarla como mecanismo en la biosíntesis de NAD a los niveles fisiológicos de nicotinamida.

Parece, sin embargo que la pregunta de que sí el nicotinato o la nicotinamida es el precursor más adecuado de NAD lo hace más importante por el hecho de que la síntesis de nuevo parece no envolver nicotinato libre o nicotinamida libre sino que esto ocurre de triptofano a través de quinolato y de ahí al mononucleótido nicotinato. Estas observa-

ciones. Explican los estudios nutricionales iniciales, los cuales indican que dietas a base de triptofano en grandes cantidades abolirían las necesidades de ácido nicotínico en animales. Se ha demostrado que el triptofano es el precursor de ácido quinolínico en animales, Neurospora y levaduras de crecimiento aeróbico. El ácido quinolínico parece ser formado de aspártato y glicerol en plantas superiores y muchos microorganismos. Las reacciones responsables para la formación de ácido quinolínico de aspártato y glicerol no han sido elucidadas. En el esquema se resumen estos conocimientos del triptofano.

La oxidación de triptofano se inicia por la enzima inducible llamada triptofano pirrolasa. Los niveles de estas enzimas son elevadas en mamíferos por la administración de  $\alpha$ -metil triptofano o glucocorticoides. El producto L-N-formilcinurenina puede formar cinurenina o ácido antranílico. En mamíferos, el ácido antranílico es excretado como un producto final en la orina. La cinurenina forma 3-hidroxicinurenina, la cual forma ácido 3-hidroxiantranílico. Algunas relaciones metabólicas importantes de ácido nicotínico y nicotinamida a triptofano y ácido quinolínico son resumidos en el esquema 1. La primera evidencia de ácido nicotínico sintetizado por 3-carbón más un 4-carbón precursor, fué demostrado en E. coli y un mecanismo similar fué reportado para M. tuberculosis.

El producto de degradación primaria del NAD en varias bacterias lesionadas ha sido demostrado que es la nicotinamida. En mamíferos

ros, un metabolismo mayor que el ácido nicotínico se demostró que es N-metil-4-piridona 5-carboxamida. Ha sido propuesto que 4-piridona-5-carboxamida proviene in vivo de N-metilnicotinamida, la cual se forma de nicotinamida, por metilación con S-adenosil-L-metionina. Una subsecuente oxidación introduce oxígeno derivado exclusivamente del agua. Algunas especies parecen formar 2-piridona-5-carboxamida en preferencia a los 4-derivados, ej. en el conejo. La síntesis de 2-piridona-5-carboxamida parece ser catalizada por aldehído oxidasa.

El ácido 6-hidroxinicotínico y 6-hidroxinicotinamida han sido reportados como metabolitos menores excretados de nicotinato o nicotinamida. Su significancia fisiológica no ha sido determinados. Estos metabolitos son excretados en la orina por ratas. Estos son varios aspectos del metabolismo de nicotinamida que están comúnmente bajo investigación.





1. - Triptofano pirrolasa.
2. - Formamidasas.
3. - Cinurerina-3-hidroxilasa.
4. - Cinureninasa.
5. - 3-hidroxiantranílico oxigenasa.
6. - Cis-trans isomerasa.
7. - Condensación 2-pasos no enzimática.
8. - Desarrollo probablemente no enzimático, reacción rápida.
9. - Quinolato-fosforribosil pirofosfato transferasa.
10. - NAD-pirofosforilasa.
11. - NAD-sintetasa.
12. - NAD-asa.
13. - Nicotinamida desamidasa.
14. - Nicotinato-fosforribosil transferasa.
15. - Transmetilasa.
16. - Acido nicotínico sintetasa.
17. - No conocido.
18. - Nicotinamida metil transferasa.
19. - Xantina oxidasa.
20. - Aldehido oxidasa.

TOXICIDAD.- Grandes cantidades de niacina son tóxicas, y en personas susceptibles, dosis elevadas de niacina pueden ser causa de rubor, quemadura, picazón y una sensación de calor en la piel en menos de 1 hora. Unas cuantas veces la dosis terapéutica de niacina es fatal. Aparentemente la niacinamida no produce tales efectos. Cuando las soluciones diluidas de niacina o niacinamida son inyectadas, causan insomnio. Estos síntomas cesan después de 1-3 horas.

Un metabolismo de carbohidratos anormal fué reportado en pacientes que recibieron una gran dosis de niacina por períodos prolongados como un agente hipocolesterolémico. Aparentemente agrava la diabetes y causa una función anormal del hígado.

USOS.- El uso obvio de la niacina es la cura o prevención de la pelagra. El requerimiento promedio para humanos es de 5 mg/1000 cal. y la dosis profiláctica usual es de 25 mg. del ácido o su amida. La niacina se usa para combatir niveles altos de colesterol en sangre y órganos.

La acción farmacológica de la niacina incluye la curación de vasos sanguíneos quebradizos y actividad como agente espasmolítico y vasodilatador, o como una droga para disminuir la concentración de ácidos grasos libres en el plasma. El uso de niacina ha sido recomendado para mejoramiento de procesos odontogénicos, produciendo más rápida la erupción dental, aumentar la calcificación y disminuir las caries.

Como un simple anión pero biológicamente muy activo, la niacina ha sido utilizada para administrar ácido pantoténico como nicotinato o sales de cloranfenicol, con excelentes resultados contra Shigella dysenteriae resistente al cloranfenicol. Usando sus propiedades vitamínicas puede ser convertida en un agente quimioterapéutico añadiéndole --- fluoruro, se forma ácido 5-fluoronicotínico y 5-fluoronicotinamida, las cuales son efectivos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Un uso muy importante de la niacina es para alimentos de animales.

Industrialmente, el ácido nicotínico es muy usado como agente anticorrosivo para metales, principalmente zinc y aluminio en contacto con ácidos. (del Rio, 1970).

## MATERIAL Y METODOS

Material biológico. - Mazorcas de maíz infestadas de tizón (Ustilago --  
zeae).

Cepa de Lactobacillus leichmannii ATCC 4797

Cepa de Lactobacillus casei ATCC 7469

Aparatos. - Estufa, centrífuga, fotocolorímetro Klett Summerson: con -  
filtro verde.

Medios de cultivo. - PDA (papa dextrosa agar). Para el aislamiento del  
hongo.

Papa 200 g.

Dextrosa 20 g.

Agar 15 g.

Agua 1 000 ml.

Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

Bacto-Micro Inoculum Broth "Difco". - Es recomendado para el  
cultivo de Lactobacillus sp. usados en pruebas microbiológicas. Se em-  
plea en la preparación del inóculo.

Bacto-B<sub>12</sub> Assay Medium USP "Difco". - Está libre de Vitamina  
B<sub>12</sub> pero contiene todos los otros factores necesarios para el creci-  
miento de Lactobacillus leichmannii. La adición de Vitamina B<sub>12</sub> a este  
medio en concentraciones crecientes y especificadas dá una respuesta -  
al crecimiento por los microorganismos, los cuales pueden ser medi-

dos turbidimétricamente.

Bacto-Riboflavin Assay Medium "Difco". - Medio para la prueba microbiológica de Riboflavina. Está libre de Riboflavina pero contiene todos los factores necesarios para el crecimiento de Lactobacillus casei. La adición de Vitamina B<sub>2</sub> en ciertas concentraciones aumentadas progresivamente, dá una respuesta de crecimiento con L. casei, la cual puede ser medida turbidimétricamente.

Bacto-Niacin Assay Medium "Difco". - Medio para el ensayo de Acido Nicotínico (Niacina). Está libre de Acido Nicotínico y sus análogos, pero contiene todos los otros factores necesarios para el crecimiento de L. casei. La adición de Acido Nicotínico o sus análogos en concentraciones crecientes dá una respuesta de crecimiento proporcional usando L. casei, la cual puede ser medida turbidimétricamente.

Bacto-Biotin Assay Medium "Difco". - Medio para el ensayo de Biotina. Está libre de Biotina pero contiene todos los otros factores necesarios para el crecimiento de L. casei. La adición de Biotina en cantidades variables dá una respuesta de crecimiento proporcional usando L. casei, la cual puede ser medida turbidimétricamente. (Manual Difco, 1971).

AISLAMIENTO DEL HONGO. - El hongo se aisló de mazorcas de maíz infestadas con el tizón, agitándolas sobre placas de petri conteniendo -

PDA, las placas se incuban de una a dos semanas a 28-30°C; seleccionando después cultivos puros mediante resiembras en tubos inclinados con PDA. (Prescott, 1962).

Se hicieron frotis del hongo y se tiñeron con cristal violeta y -- lactofenol, observandose las características morfológicas que presenta, comprobando así la presencia del basidiomiceto.

CULTIVO DEL HONGO. - El Ustilago zeae se cultivó en el medio de papa dextrosa agar líquido estéril, colocado en matraces baffleados en --- cantidades de 150 ml. Como inóculo se utilizó una suspensión acuosa de las esporas de un cultivo del hongo en medio de cultivo inclinado de -- PDA agar. El inóculo se agregó a los matraces en condiciones de esterilidad y su concentración fué del 1.5% v/v. Los matraces inoculados - fueron colocados en la máquina agitadora e incubados a una temperatura de 28°C durante 24 días. A medida que transcurre el tiempo de incu bación, se observaron cambios en el color del medio de cultivo, fenó-- meno también notado en los cultivos del hongo en medio de cultivo sólido en tubo y cajas petri (ver fig. # 1).

Al término del período de incubación el contenido de los matraces se centrifugó a 3,500 rpm y el sobrenadante fué utilizado para la - determinación microbiológica de las vitaminas.



Fig. # 1 Aspecto de los matraces con Ustilago zeae a los 0, 5, 9, 14, y 24 días de incubación.

PREPARACION DEL INOCULO DE LACTOBACILLUS sp.- (Manual Difco, 1971). Cultivos de Lactobacillus sp. conservados en Bacto-Micro Assay Culture Agar, se inoculan a tubos conteniendo 10 ml. del medio Bacto-Micro Inoculum Broth y se incuban a 37°C durante 24 hrs. El cultivo es centrifugado, lavado en solución isotónica de cloruro de sodio - estéril varias veces y diluido antes de usarse como inóculo. Es esencial que las instrucciones para la preparación de cada medio, sean seguidas con todo detalle, ya que el tiempo de preparación y medida del inóculo - son los factores mas importantes para la obtención de una prueba satisfactoria.

Para la determinación de Vitamina B<sub>12</sub> se emplearon Lactobaci-



llus leichmannii y para las vitaminas: B<sub>2</sub>, Biotina y Acido Nicotínico -  
el Lactobacillus casei.

VALORACION DE VITAMINAS. - Vitamina B<sub>12</sub> (Cianocobalamina): La dilución del inóculo se obtiene añadiendo a 10 ml. de solución salina estéril 0.1 ml. de la suspensión de células lavadas con solución salina estéril varias veces. Se mezcla perfectamente bien y la suspensión de células así obtenida constituyen el inóculo.

Es esencial que la curva sea construida cada vez que la prueba se efectuó usando Cianocobalamina USP, ya que las condiciones de autoclave, temperaturas de incubación, etc., influyen en las lecturas de la curva estandar y no puede ser duplicada de una vez a otra. La curva estandar se obtiene usando Bacto-B<sub>12</sub> Assay Medium USP en concentraciones de 0.0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2 y 0.25 mmcg. de cianocobalamina por tubo de ensaye (10 ml), para las determinaciones turbidimétricas. Las determinaciones son hechas por duplicado.

La concentración de vitamina B<sub>12</sub> requerida para la preparación de la curva estandar son obtenidas añadiendo suficiente etanol al 25% a una cantidad cuidadosamente pesada de Cianocobalamina. La solución patrón se prepara pesando 0.01 g. a la que se añaden 999 ml. de etanol al 25%. Las demás diluciones se hacen de la siguiente manera:

Solución A. - Añadir 1 ml. de solución patrón a 999 ml. de a---

gua destilada.

Solución B. - Añadir 1 ml. de la solución A a 99 ml. de agua --  
destilada (esta solución contiene 0.1 mmcg/ml.).

Las determinaciones turbidimétricas son hechas después de 16-  
24 horas de incubación.

Para el análisis cada tubo debe contener 5 ml. de Bacto-B<sub>12</sub> -  
Assay Medium USP rehidratado, cantidades incrementadas del estan--  
dar, 1 ml. del problema y 1 ml. de medio PDA líquido estéril en su tu-  
bo correspondiente y suficiente agua destilada para dar un volumen total  
de 10 ml. por tubo. Los tubos son esterilizados en autoclave por 5 minu-  
tos a 15 lbs. de presión (121°C). Se inocula cada tubo asépticamente con  
una gota de la suspensión de células de Lactobacillus leichmannii.

Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina). - Las células de L. casei después de lavadas  
se suspenden en 10 ml. de solución isotónica de cloruro de sodio. Inme-  
diatamente se diluyen 1:20 con solución salina estéril al 0.85%.

Es esencial que la curva estándar sea construida cada vez que -  
se haga la prueba, ya que las condiciones de esterilización, temperatu-  
ra de incubación, etc., influyen en las lecturas de la curva, por lo tan-  
to no puede ser usada de una vez a otra. La curva estándar se obtiene -  
usando Riboflavina a concentraciones de 0.0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1,  
0.1 y 0.3 mmcg. de Riboflavina por tubo ( 10 ml.).

La concentración de Riboflavina requerida para la preparación de la curva estandar se prepara disolviendo 0.1 g. de Riboflavina en 1000 ml. de agua destilada, calentar para disolver. Esta solución patrón contiene 100 mcg/ml.

Solución A. - Añadir 1 ml. de la solución patrón a 999 ml. de agua destilada.

Usar 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 ml. de la solución A, 1 ml. de problema y 1 ml. de medio PDA líquido estéril en su tubo correspondiente. Se distribuyen en cada uno de los tubos de la curva estandar, problema y medio PDA, 5 ml. de Bacto-Riboflavin Assay Medium rehidratado y suficiente agua destilada para completar un volumen de 10 ml. Esterilizar en autoclave por 10 min. a 15 lbs. de presión (121°C). Inocular con una gota de la suspensión de células en cada uno de los tubos de ensaye.

Las lecturas turbidimétricas se hacen después de 18-24 horas de incubación a 37°C.

Biotina (Vitamina H). - Las células de L. casei lavadas en condiciones asépticas, se suspenden en 10 ml. de solución salina estéril al 0.85%. Estas células se diluyen 1:100 con la solución isotónica salina estéril.

La curva estandar se obtiene usando Biotina a concentraciones -

de 0.0, 0.25, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1.0 mmcg. por tubo de ensayo ( 10 ml. )

La concentración de Biotina que se requiere para la preparación de la curva estandar se prepara disolviendo 0.1 g. de biotina en 1 000 ml. de agua destilada (esta solución contiene 100 mmcg. por ml).

Solución A.- Añadir 2 ml. de la solución patrón a 98 ml. de agua destilada.

Solución B.- Añadir 1 ml. de la solución A a 999 ml. de agua destilada (esta solución contiene 2 mmcg. de biotina por ml.).

Solución C.- Añadir 5 ml. de la solución B a 95 ml. de agua destilada (esta solución contiene 0.1 mmcg. de Biotina por ml.).

Usar 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ml. de la solución C y en el último tubo de la curva estandar usar 0.5 ml. de la solución B, 1 ml. de problema y 1 ml. de medio PDA líquido estéril en el tubo correspondiente.

Distribuir en cada uno de los tubos tanto de la curva estandar como del problema 5 ml. de Bacto-Biotin Assay Medium rehidratado y suficiente agua destilada para dar un volumen total de 10 ml. Los tubos se esterilizan en autoclaves por 10 min. a 15 lbs. de presión (121°C).

Se usa una gota de la suspensión de células para inocular los tubos de la prueba.

Las lecturas turbidimétricas se hacen después de 16-20 horas de incubación a 37°C.

Acido Nicotínico (Niacina). - La dilución de células de L. casei 1:100, se hace en la misma forma que en los casos anteriores.

La curva estandar se obtiene usando Niacina a concentraciones de 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mcg. de Niacina por tubo de ensayo (10 ml).

Las concentraciones de Niacina requeridas para la preparación de la curva estandar pueden ser preparadas disolviendo 0.1 g. de Niacina en 1000 ml. de agua destilada obteniéndose una solución patrón de 100 mcg/ml.

Solución A.- Añadir 1 ml. de la solución patrón a 999 ml. de agua destilada.

Usar 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ml., 1 ml. de problema y 1 ml. de medio PDA líquido estéril en el tubo correspondiente.

En cada tubo tanto de la curva estandar como del problema y --

del medio PDA añadir 5 ml. de Bacto-Niacin Assay Medium rehidratado y suficiente agua destilada para dar un volumen total de 10 ml. Los tubos se esterilizan en autoclave por 10 min. a 15 lbs. de presión --- (121°C). Se usa una gota de la suspensión de células para inocular cada tubo de prueba.

Las lecturas turbidimétricas se hacen después de 16-18 horas de incubación a 37°C.

PARTE EXPERIMENTAL.

Vitamina B<sub>12</sub> (Cianocobalamina).

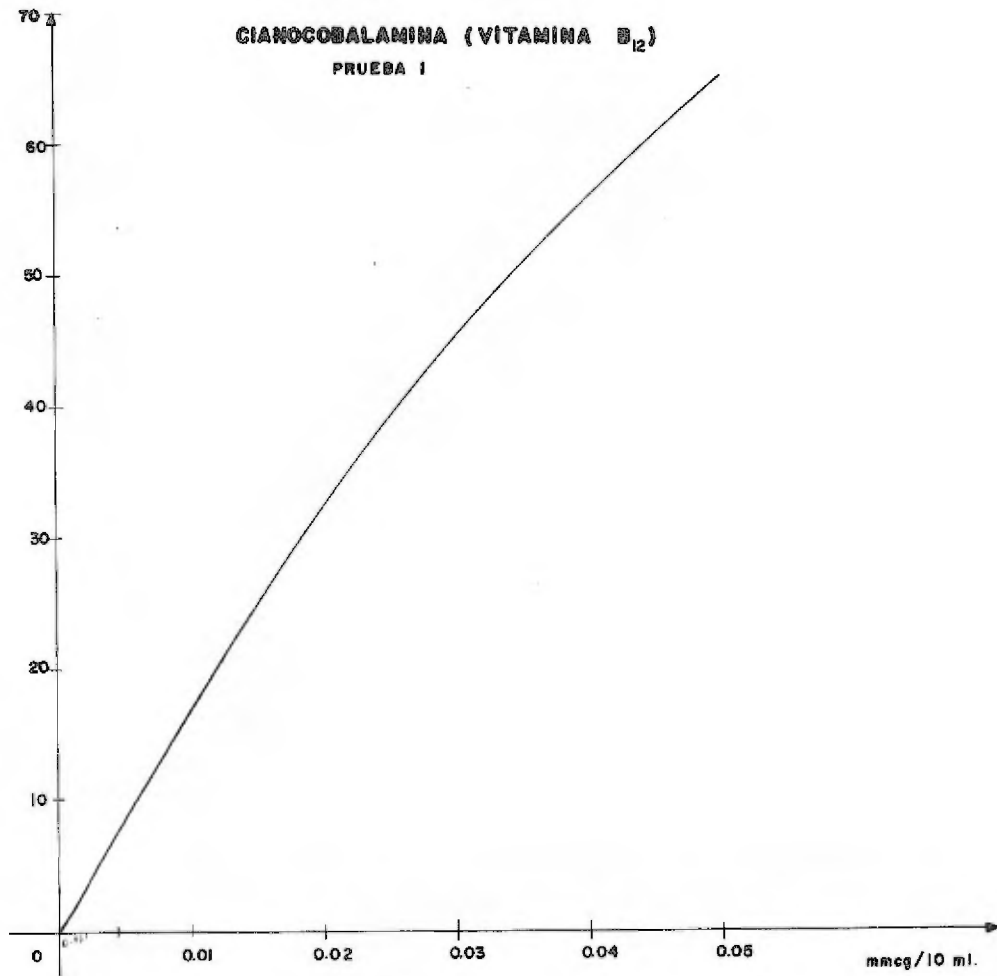
Prueba I

No. tubo	Conc. B <sub>12</sub> (mmcg/10 ml)	Solución B (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BB <sub>12</sub> AM. (ml.)	Lecturas U. Klett	Medio PDA lfq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml)	Cantidad en 10 ml. de PDA - lfq. esté ril en -- mmcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre nadante - en mmcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.025	0.25	4.75	5.0	40				
3	0.05	0.5	4.5	5.0	65				
4	0.075	0.75	4.25	5.0	72				
5	0.1	1.0	4.0	5.0	80				
6	0.125	1.25	3.75	5.0	110				
7	0.15	1.5	3.5	5.0	115				
8	0.2	2.0	3.0	5.0	135				
9	0.25	2.5	2.5	5.0	135				
10			4.0	5.0	50	1.0		0.034	
11			4.0	5.0	65		1.0		0.05

RESULTADO: 0.0016 mmcg. de Vitamina B<sub>12</sub>/ml. de problema.



U. Klott.



Vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina)

Prueba II

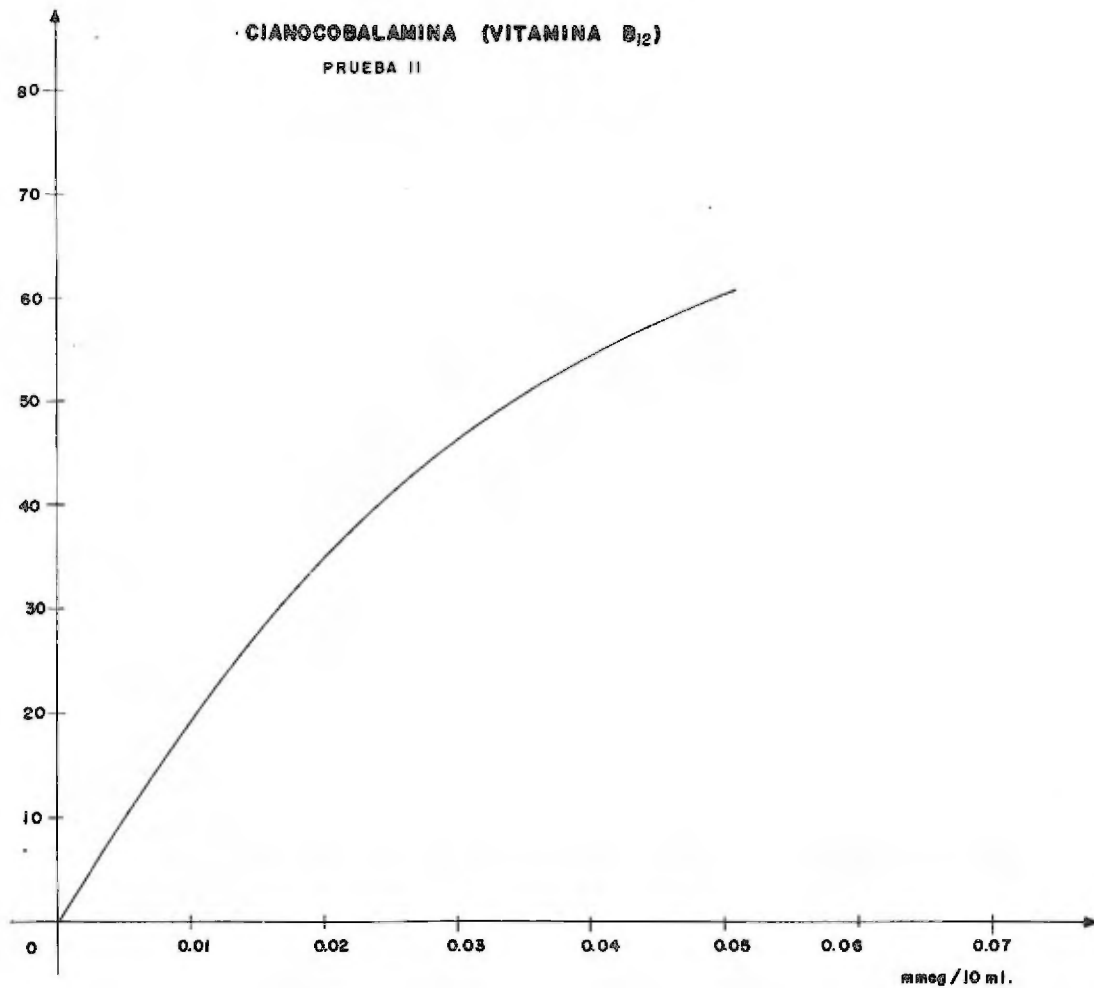
No. tubo	Conc. B <sub>12</sub> (mmcg/10 ml)	Solución B (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BB <sub>12</sub> AM (ml.)	Lecturas U. Klett	Medio PDA lfq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml)	Cantidad en 10 ml. de PDA - lfq. este ril en -- mmcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre- nadante - en mmcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.025	0.25	4.75	5.0	40				
3	0.05	0.5	4.5	5.0	60				
4	0.075	0.75	4.25	5.0	80				
5	0.1	1.0	4.0	5.0	90				
6	0.125	1.25	3.75	5.0	100				
7	0.15	1.5	3.5	5.0	110				
8	0.2	2.0	3.0	5.0	135				
9	0.25	2.5	2.5	5.0	135				
10			4.0	5.0	50	1.0		0.034	
11			4.0	5.0	60		1.0		0.05

RESULTADO: 0.0016 mmcg. de Vitamina B<sub>12</sub>/ml. de problema.

U. Klatt.

# CIANOCOBALAMINA (VITAMINA B<sub>12</sub>)

PRUEBA II



Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina).

Prueba I

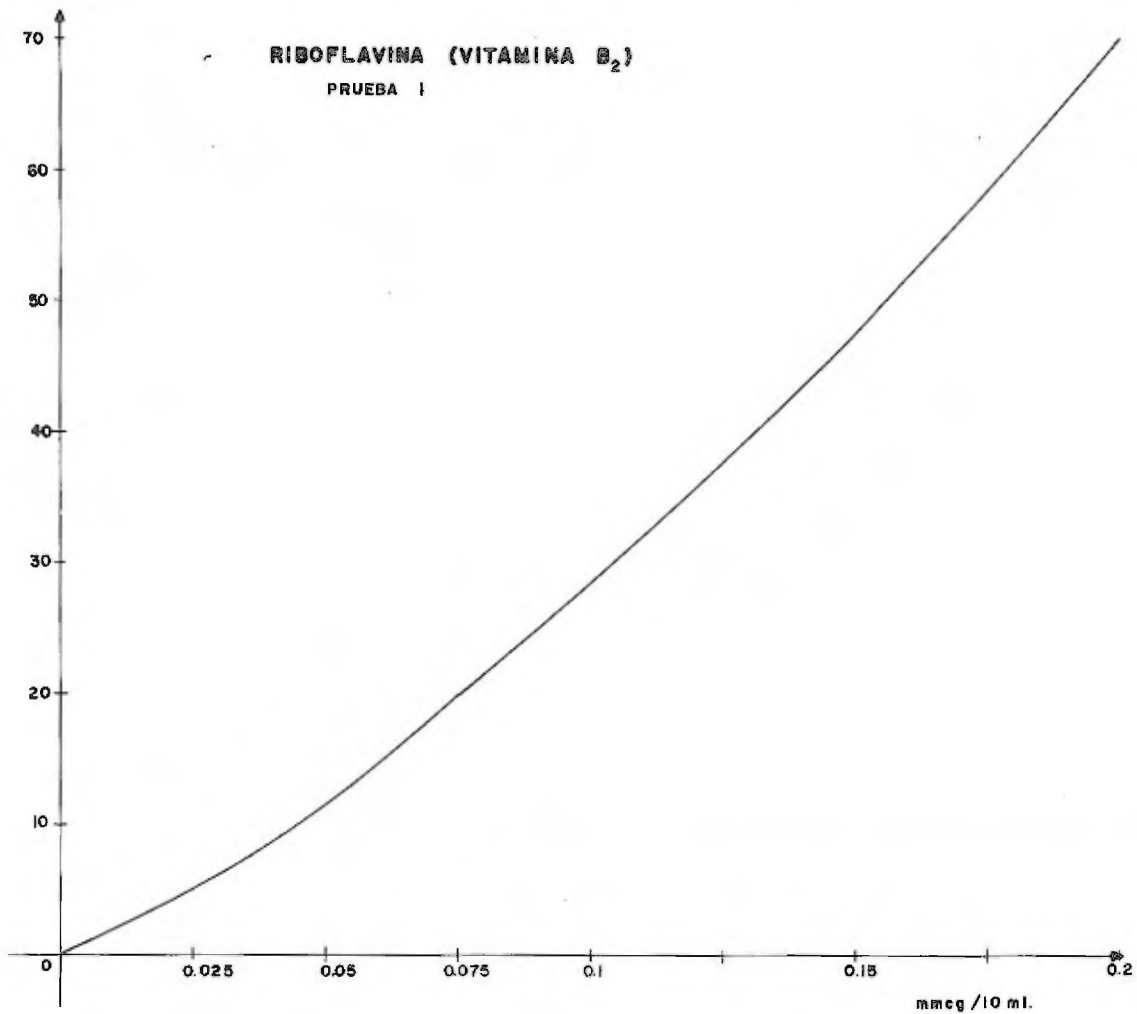
No. tubo	Conc. B <sub>2</sub> (mmcg/10 ml)	Solución A (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BB <sub>2</sub> AM (ml.)	Lecturas U, Klett	Medio PDA líq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml)	Cantidad en 10 ml. de PDA - líq. esté- ril en -- mmcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre- nadante - en mmcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.025	0.25	4.75	5.0	5				
3	0.05	0.5	4.5	5.0	10				
4	0.075	0.75	4.25	5.0	20				
5	0.1	1.0	4.0	5.0	35				
6	0.15	1.5	3.5	5.0	45				
7	0.2	2.0	3.0	5.0	70				
8	0.3	3.0	2.0	5.0	110				
9			4.0	5.0	20*	1.0		0.15	
10			4.0	5.0	70*		1.0		0.4

\* nota: al tomar la lectura se diluyó 1:1

*L-7 1:1*

RESULTADO: 0.025 mmcg. de Vitamina B<sub>2</sub>/ml. de problema.

U. Klett.



mmcg / 10 ml.

Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina).

Prueba II

No. tubo	Conc. B <sub>2</sub> (mmcg/10 ml)	Solución A (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BB <sub>2</sub> AM (ml.)	Lecturas U. Klett	Medio PDA líq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml)	Cantidad en 10 ml. de PDA - líq. esté- ril en -- mmcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre- nadante - en mmcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.025	0.25	4.75	5.0	5				
3	0.05	0.5	4.5	5.0	10				
4	0.075	0.75	4.25	5.0	30				
5	0.1	1.0	4.0	5.0	40				
6	0.15	1.5	3.5	5.0	50				
7	0.2	2.0	3.0	5.0	70				
8	0.3	3.0	2.0	5.0	90				
9			4.0	5.0	40	1.0		0.1	
10			4.0	5.0	40*		1.0		0.2

\* nota: al tomarse la lectura se diluyó 1:1

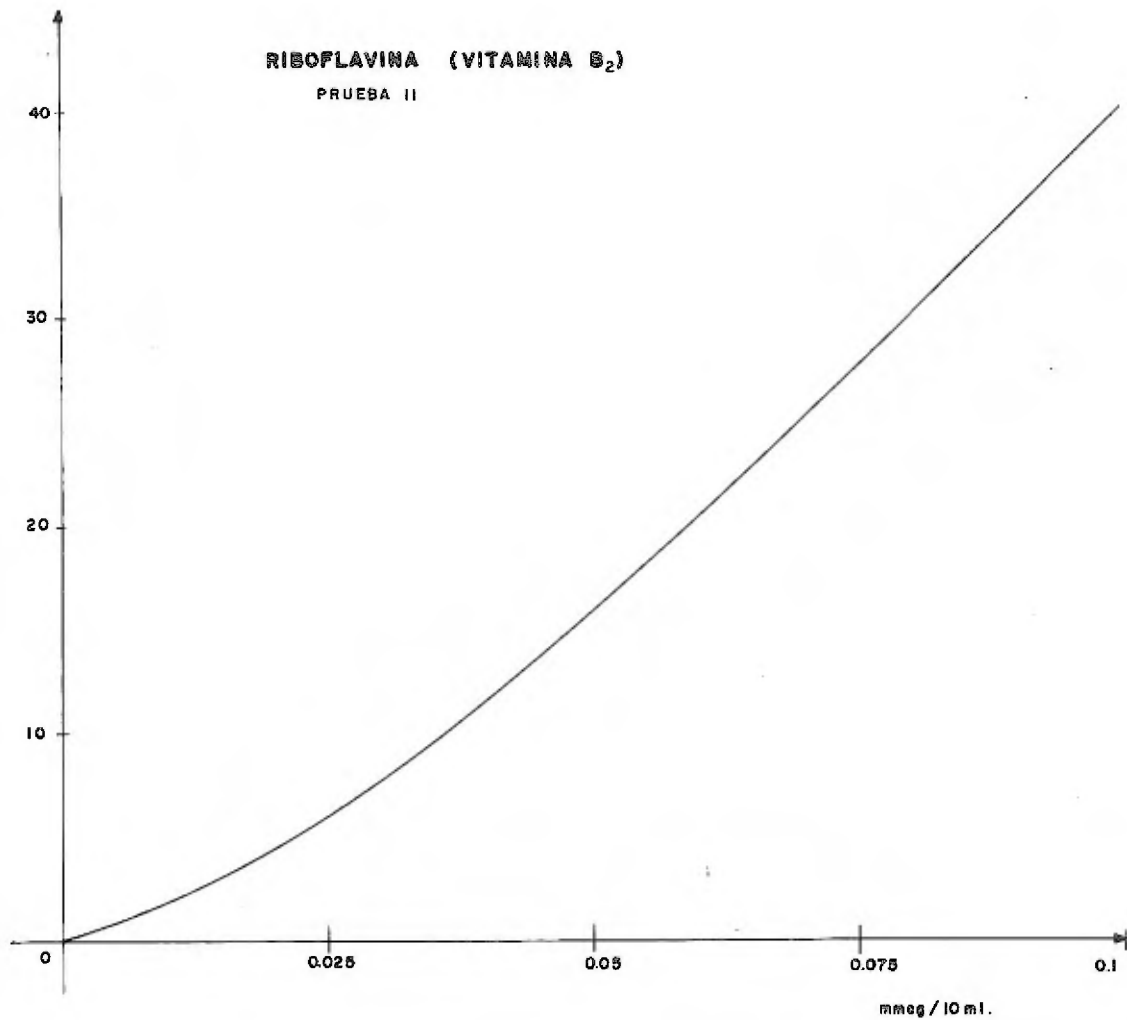
↳ 1:2

RESULTADO: 0.01 mmcg. de Vitamina B<sub>2</sub>/ml. de problema.

U. Klott.

# RIBOFLAVINA (VITAMINA B<sub>2</sub>)

PRUEBA II



Biotina (Vitamina H)

Prueba I

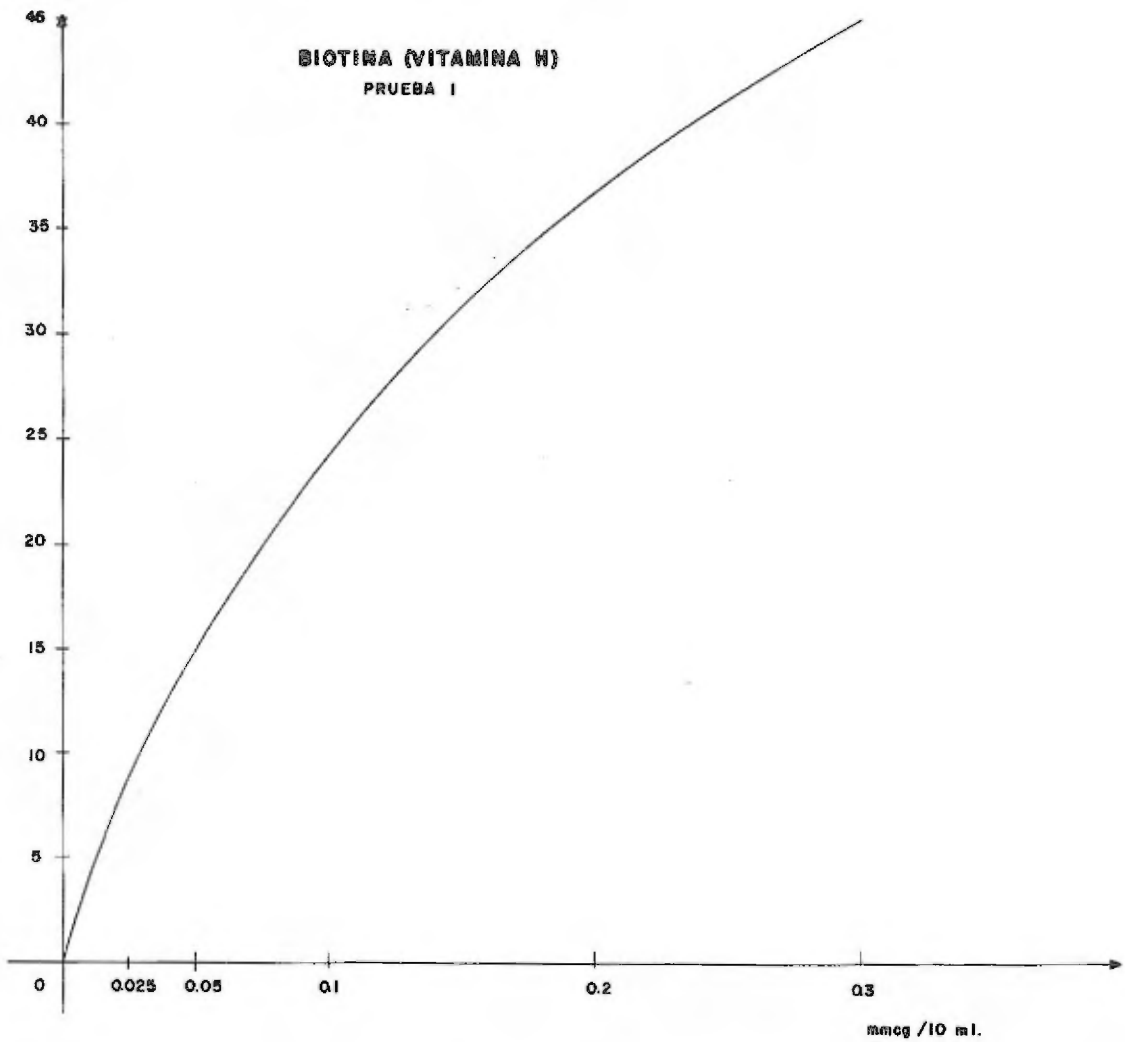
No. tubo	Conc. Biotina (mmcg/10 ml)	Solución C (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BBAM (ml.)	Lecturas U. Klett	Medio PDA líq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml.)	Cantidad en 10 ml. de PDA - líq. esté- ril en -- mmcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre- nadante - en mmcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.025	0.25	4.75	5.0	10				
3	0.05	0.5	4.5	5.0	15				
4	0.1	1.0	4.0	5.0	30				
5	0.2	2.0	3.0	5.0	35				
6	0.3	3.0	2.0	5.0	45				
7	0.4	4.0	1.0	5.0	47				
8	0.5	5.0	0.0	5.0	50				
9	1.0	0.5 sol. B	4.5	5.0	50				
10			4.0	5.0	15	1.0		0.05	
11			4.0	5.0	40		1.0		0.24

RESULTADO: 0.019 mmcg de Biotina/ml. de problema.



U. Klett.

**BIOTINA (VITAMINA H)**  
**PRUEBA I**



mmcg / 10 ml.

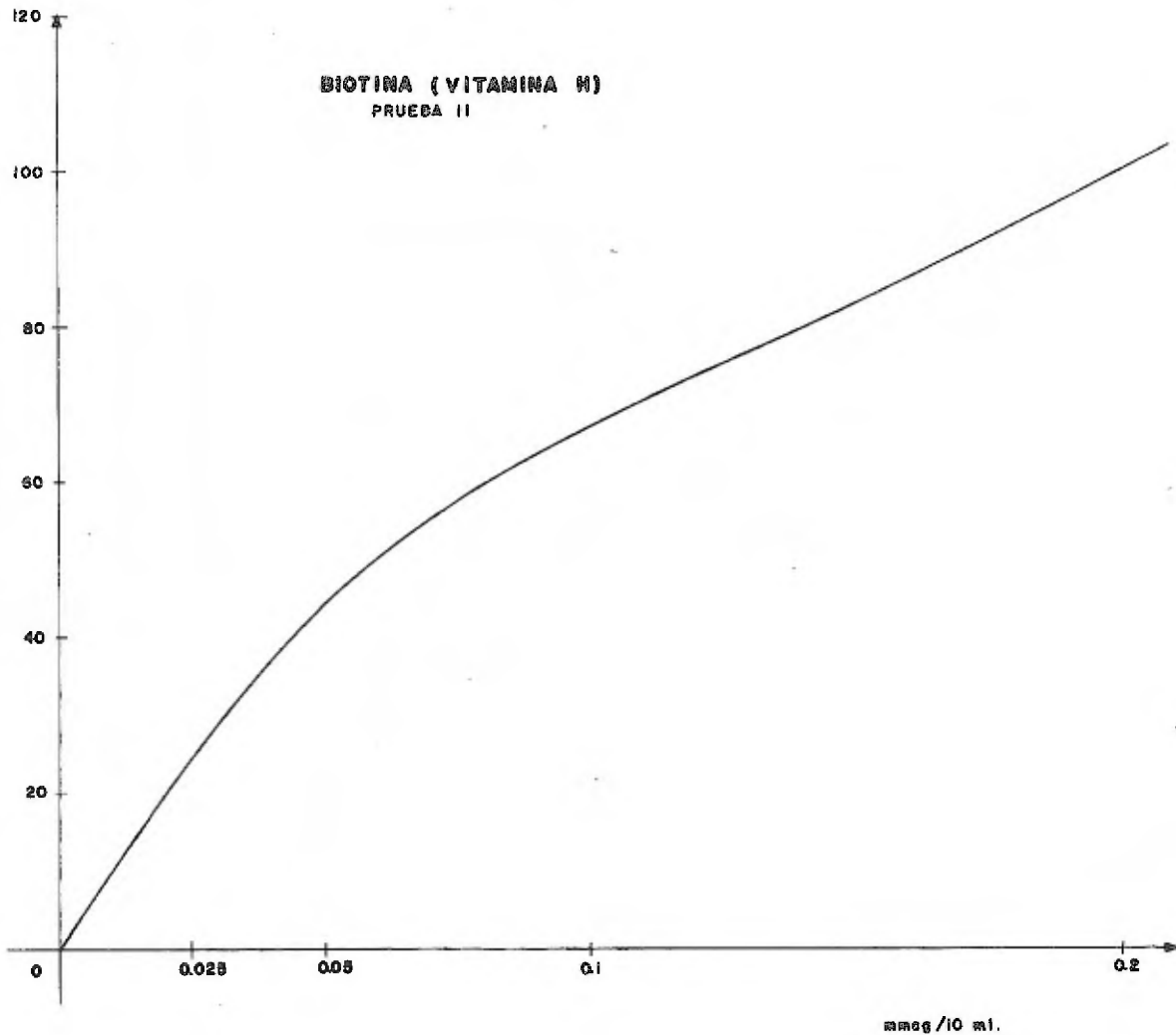
Biotina (Vitamina H)

Prueba II

No. tubo	Conc. Biotina (mmcg/10 ml)	Solución C (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BBAM (ml.)	Lecturas U. Klett	Medio PDA líq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml.)	Cantidad en 10 ml. de PDA - Líqu. esté- ril en -- mmcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre- nadante - en mmcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.025	0.25	4.75	5.0	22				
3	0.05	0.5	4.5	5.0	45				
4	0.1	1.0	4.0	5.0	65				
5	0.2	2.0	3.0	5.0	105				
6	0.3	3.0	2.0	5.0	120				
7	0.4	4.0	1.0	5.0	125				
8	0.5	5.0	0.0	5.0	130				
9	1.0	0.5 sol. B	4.5	5.0	130				
10			4.0	5.0	45	1.0		0.05	
11			4.0	5.0	72		1.0		0.12

RESULTADO: 0.007 mmcg. de Biotina/ml. de problema.

U. Klett.



**BIOTINA (VITAMINA H)**  
PRUEBA II

mg/10 ml.

Acido Nicotínico (Niacina)

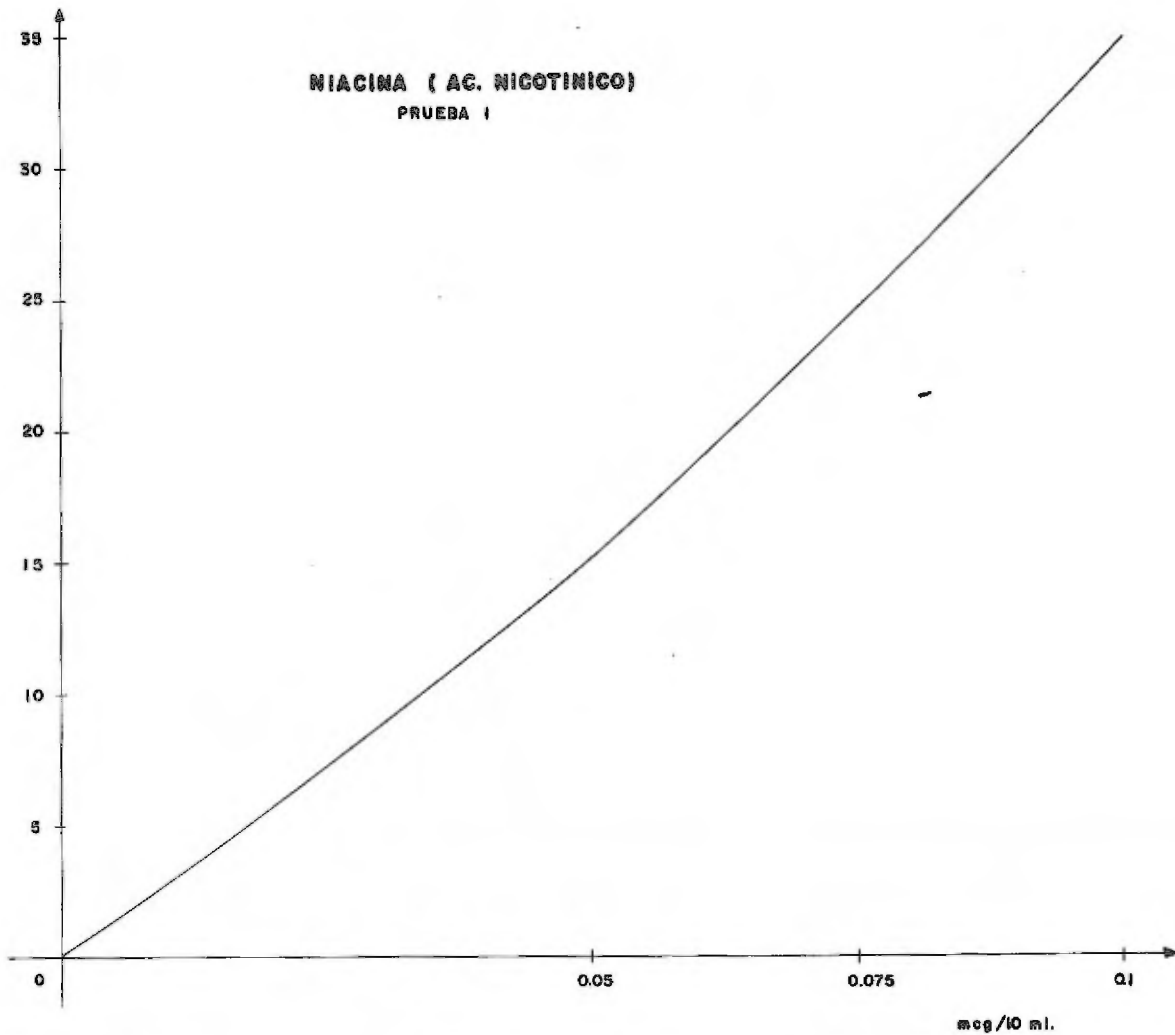
Prueba I

No. tubo	Conc. A.N. (mcg./10 ml.)	Solución A (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BN AM (ml.)	Lecturas U. Klett	Medio PDA líq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml)	Cantidad en 10 ml. de PDA - líq. esté- ril en -- mcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre- nadante - en mcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.05	0.5	4.5	5.0	15				
3	0.1	1.0	4.0	5.0	35				
4	0.2	2.0	3.0	5.0	40				
5	0.3	3.0	2.0	5.0	45				
6	0.4	4.0	1.0	5.0	50				
7	0.5	5.0	0.0	5.0	52				
8			4.0	5.0	25*	1.0		0.3	
9			4.0	5.0	35*		1.0		0.4

\* nota: al tomarse la lectura se diluyó 1:4

RESULTADO: 0.01 mcg. de Niacina/ml. de problema.

U. Klett



mcg/10 ml.

Acido Nicotínico (Niacina)

Prueba II

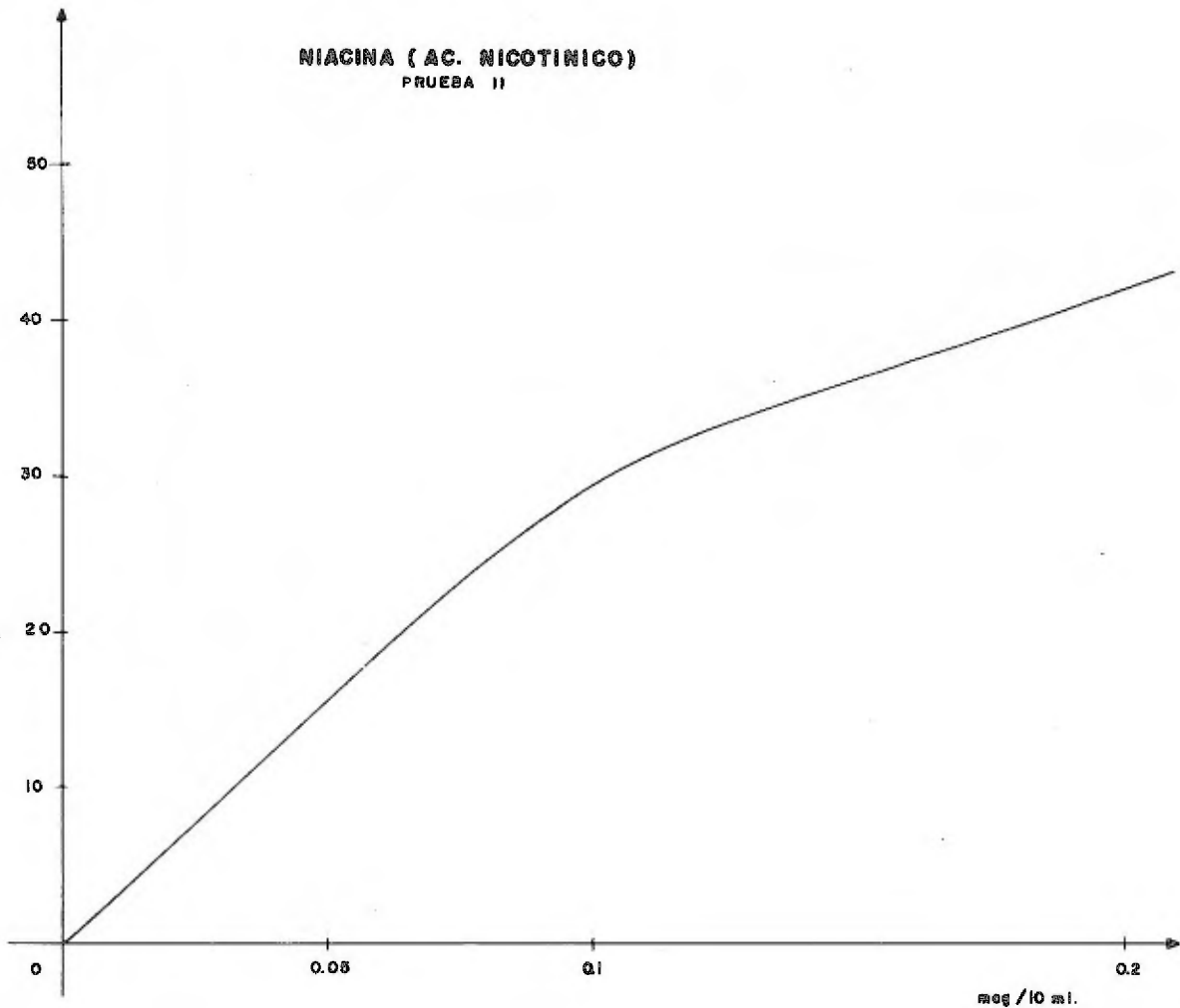
No. tubo	Conc. A.N. (mcg./10 ml.)	Solución A (ml.)	Agua dest. (ml.)	Medio BN AM (ml.)	Lecturas U. Klett	Medio PDA líq. (ml.)	Sobrenadante problema (ml)	Cantidad en 10 ml. de PDA - líq. esté- ril en -- mcg.	Cantidad en 10 ml. de sobre- nadante - en mcg.
1	0.0	0.0	5.0	5.0	0				
2	0.05	0.5	4.5	5.0	15				
3	0.1	1.0	4.0	5.0	30				
4	0.2	2.0	3.0	5.0	42				
5	0.3	3.0	2.0	5.0	55				
6	0.4	4.0	1.0	5.0	57				
7	0.5	5.0	0.0	5.0	60				
8			4.0	5.0	30*	1.0		0.4	
9			4.0	5.0	35*		1.0		0.56

\* nota: al tomarse la lectura se diluyó 1:4

RESULTADO: 0.016 mcg. de Niacina/ml. de problema.

U. Klett

**NIACINA (AC. NICOTINICO)**  
PRUEBA II



RESULTADOS.



Tabla No. 1 .- Contenido promedio de Vitaminas en el líquido sobrenadante del cultivo de Ustilago zeae.

VITAMINA	Cantidad en 100 ml. de sobrenadante en mmcg.	Cantidad en 100 ml. del medio PDA líquido estéril en mmcg.	Cantidad producida en 100 ml. de sobrenadante en mmcg.
Vitamina B <sub>12</sub> (Cianocobalamina)	0.5	0.34	0.16
Vitamina B <sub>2</sub> (Riboflavina)	3.0	1.2	1.8
Biotina (Vitamina H)	1.8	0.5	1.3
Acido Nicotínico (Niacina)	4.8 mcg.	3.5 mcg.	1.3 mcg.

DISCUSION.

Los datos obtenidos, como ya se indicó en el capítulo de resultados ( tabla # 1 ), corresponden al líquido sobrenadante del cultivo del hongo y es obvio que las hifas contendrán más vitaminas que han permanecido en el interior de las hifas, esporas y basidios, pero estas cifras nos indican que la cantidad de ellas no llena los requerimientos nutritivos diarios en la dieta del individuo, más aun tomando en cuenta la forma en que se ingiere el hongo (tacos y quesadillas), no es en la suficiente cantidad.

La autenticidad del origen mexicano de este hongo nos motivó a efectuar este tipo de estudio, el cual no resultó del todo satisfactorio al compararse el contenido de algunas de sus vitaminas con otros alimentos mexicanos, ricos en ellas según puede observarse en la tabla # II.

Tabla # II.

Algunos Alimentos Mexicanos de alto contenido en Vitaminas.

<u>Nombre vulgar</u>	<u>Nombre científico</u>	<u>Riboflavina mg%</u>
Chile pasilla seco	Capsicum annun L.	1.39
Jumiles	Pentatomidae	1.28
Charales frescos	Atherinidae	0.56
Huahuzontle	Chenopodium	0.43

<u>Nombre vulgar</u>	<u>Nombre científico</u>	<u>Niacina mg%</u>
Chile chipotle seco	Capsicum annun L.	19.20
Charales secos	Atherinidae	6.00

Jumiles	Pentatomidae	3.76
Acociles	Cambarus moctezumae	3.68
Maíz cacahuazintle	Zea mayz L	3.13

Las cifras reportadas por diversos investigadores (Blook, 1953; Humfeld, 1949; Litchfield, 1964; Cravioto, 1951), que se encuentran señaladas en la tabla # 3, nos indican el contenido de vitaminas en el micelio de algunos hongos comerciales internacionalmente conocidos, y las del Ustilago zea (mexicano), y nos permiten comparar el valor nutritivo de estos hongos. Observamos que el U. Zea tiene valores más bajos de Riboflavina y Niacina en cuanto a los otros hongos. En cuanto al contenido vitamínico de hongos comestibles cultivados en el laboratorio, la literatura indica que existen muy pocas investigaciones sobre este tema; incluyéndose entre ellas a la vitamina B<sub>12</sub>.

Tabla III

Comparación del contenido de Vitaminas en el micelio de algunos hongos comerciales.

Hongo	Riboflavina (mg/100g)	Biotina (mg/100g)	Acido Nicotínico (mg/100g)
Morchella hostensis	1.31	0.015	12.4
M. esculenta	2.46	0.075	8.20
Agaricus blazei	3.4	-----	14.6
A. campestris (comercial)	5.2	-----	58.0

A. campestris (variedad blanca)	4.7	-----	19.0
A. campestris (variedad café)	9.0	-----	29.0
Ustilago zeae	0.26	-----	0.69
U. zeae (cultivo laboratorio)	1.8 mmcg/100 ml. sobre- nadante.	1.3 mmcg/100 ml. sobre- nadante.	1.3 mcg/100 ml. sobrenadante.

---

Para juzgar la calidad de los alimentos mexicanos se necesita - conocer en detalle su composición, lo cual nos puede decir mucho acerca de su valor nutritivo; además, es necesario complementar estos trabajos con la experimentación biológica para catalogarlos con exactitud y ha de tomarse en cuenta también otros factores, como son la forma y cantidad en que se ingieren, su frecuencia en el consumo, ya sea por - la facilidad o dificultad de obtenerlos o por los hábitos alimenticios de - la población, y además, el número de individuos que los utiliza. En el caso particular del Huitlacoche, las personas que lo consumen no es -- precisamente la clase media, sino más bién personas acomodadas que - lo requieren en platillos refinados, y muy poco los campesinos que ven parasitados sus cultivos de maíz con este hongo, ya que más que consumiirlo prefieren venderlo al mercado; pero debido a la carencia de higiene en el manejo de este hongo, muchas personas prefieren no consumiirlo. Con respecto a la frecuencia, sabemos que en el mercado sólo - se encuentra durante cierta temporada y según la abundancia o escasez del hongo es el precio, encontrandose que la mazorca infestada la ven-

den desde \$1.50 hasta \$3.00 , o quienes la venden por kilogramo hasta \$8.00 .

## CONCLUSIONES

La presente investigación nos ha proporcionado datos que indican que no es recomendable el cultivo de Ustilago zeae in vitro ya que por diversas causas, el hongo no constituye una fuente alimenticia complementaria en la nutrición humana.



## BIBLIOGRAFIA

1. - Alexopoulos, C.J. Introductory Mycology, Second Edition, John - Wiley and Sons, Inc. N.Y. 1962.
2. - AOAC. Ninth Edition. Editorial Board. Washington. 1960.
3. - Blook, S.S. et al. "Mushroom Mycelium. Experiments with Submerged Culture". Journal of Agric. Food Chem. Vol. I, pag. -- 890 (1963).
4. - Conn, E.E., Stumpf, P.K. Bioquímica Fundamental. 2a. Edi--- ción. Editorial Limusa-Wiley S.A. México. 1967.
5. - Cook, E.F. y Martin, E.W. Farmacia Práctica de Regminton. - 10a. edición del inglés. Unión Litográfica Editorial Hispano Ame- ricana. México. 1965.
6. - Cravioto O.R., Massieu, H.G., Guzmán G.J. y Calvo de la To- rre J. "Composición de Alimentos Mexicanos". CIENCIA, Revis- ta Hispano-Americana de Ciencias Puras y Aplicadas. Vol. XI. - 5-6 (1951).
7. - Cravioto O.R., "Valor nutritivo de los Alimentos Mexicanos". -- CIENCIA, Revista Hispano-Americana de Ciencias Puras y Apli- cadas. Vol. XI, 1-2 (1951).
8. - Difco Manual of dehydrated culture media and reagents for micro- biological and clinical laboratory procedures. Ninth Edition. Dif- co Laboratories, Incorporated, Detroit, Michigan (1971).
9. - del Rio, E.C. "Nicotinic Acid". Encyclopedia of Chemical Tech- nology. Vol. 21, Second Edition. John Wiley and Sons, Inc. N.Y. 1970.
10. - Enciclopedia Universal Ilustrada Europeo Americana. Tomo 66. -

Espasa-Calpe S.A. Editores. Madrid, Barcelona. 1929.

- 11.- Fisher G.W. and Hirschton E. The Ustilaginales or "Smuts" of Washington. Bulletin No. 459. State College of Washington. Washington. 1945.
- 12.- Goodwin, T.W. Biosynthesis of Vitamins and related compounds. Academic Press. London. N.Y. 1963.
- 13.- Hunfeld H. and Sugihara J. F. "Mushroom Mycelium Production by Submerged Propagation". Food Technology. Vol. 3 Pag. 355.- (1949).
- 14.- Jacobs Morris B. The Chemistry and Technology of Food and Food products. 2a. Edition. Edited by Morris B. Jacobs. Interscience Publishers, Inc. N.Y. 1951.
- 15.- Litchfield J.H. "Nutrient Content of Morel Mushroom Mycelium: B-Vitamin Composition". Journal of Food Science". Vol. 29, Pag. 690 (1964).
- 16.- Mahler, H.R. and Cordes E. H. Biological Chemistry. A. Harper International Edition, N.Y. 1967.
- 17.- Prescott, S.C. y Dunn, C.G. Microbiología Industrial. 3a. Edición. Ediciones Aguilar S.A. México. 1962.
- 18.- Sherman, H.C. Chemistry of Food and Nutrition. 8a. Edition. The MacMillan Co. N.Y. 1945.
- 19.- Staunton, W.E., Fodd, W.R., Mason, H.S., Van Bruggen, J. T. Bioquímica Médica. 4a. Edición. Editorial Interamericana, S.A. México. 1969.
- 20.- Stecher G. Paul et al. The Merck Index. 8a. Edition, Merck and

Co., Inc. Rahway, N.J. 1968

- 21.- Wagner A.M., Folkers, K. Vitamins and coenzymes. Interscience Publishers, N.Y., London. 1964.