

Trabajos de Investigación

EL COBALTO COMO MICROELEMENTO ESENCIAL PARA LA REPRODUCCION ANIMAL Y SU RELACION CON LA VITAMINA B₁₂

Werner G. Jaffé

Instituto Nacional de Nutrición

En años anteriores, y durante estudios experimentales sobre el valor alimenticio de las dietas típicamente venezolanas (1), hicimos observaciones que se podían interpretar únicamente mediante la postulación de un nuevo factor vitamínico existente en extractos de hígado (2). Era la primera observación de esta índole hecha con ratas. Por medio de extracciones y fraccionamiento logramos purificar el factor en cuestión considerablemente (3), el cual fué obtenido en forma cristalina poco tiempo después y simultáneamente por dos grupos de investigadores, uno en los EE. UU. del Norte (4), otro en Inglaterra (5), y llamado Vitamina B₁₂. Se pudo luego demostrar que el nuevo factor del hígado era idéntico o muy parecido al factor antipernicioso (6) y quizás al "Animal Protein Factor", el cual es esencial para el crecimiento normal de pollos (7) y, como nosotros habíamos demostrado, de ratas.

En un trabajo posterior encontramos signos evidentes, mediante la comparación del efecto de materias naturales sobre el crecimiento y la reproducción de ratas, ratones y bacilos lácteos, de la existencia de más de un factor además de las vitaminas conocidas (8). Desgraciadamente, nuestros experimentos se dificultaron considerablemente por la falta de vitamina B₁₂ pura, un material que ya estaba en esta época a la disposición de la

(*) Trabajo recibido el 30 de abril de 1951. Fué presentado ante el V Congreso Sudamericano de Química, celebrado en Lima en marzo de 1951.

mayoría de los investigadores extranjeros y que facilita mucho el estudio de factores adicionales.

La vitamina B₁₂ no se ha encontrado hasta ahora en ningún material vegetal en concentración apreciable, con excepción de algunos hongos y otros microorganismos. Las fuentes conocidas más ricas son: el hígado, la leche y sus derivados, huevos, carne de res y varios microorganismos como, por ejemplo: *streptomyces griseus* (9). Se ha postulado que en los rumiantes la vitamina B₁₂ se sintetiza en el tracto gastro-intestinal por acción de la flora bacteriana y que las demás especies la obtienen por los alimentos de origen animal (8). En vista de que en parte de la población de Venezuela hay un consumo muy escaso de alimentos de origen animal (10), el problema de la vitamina B₁₂ tiene un interés muy especial entre nosotros, razón por la cual continuamos los estudios antes mencionados. Nos interesó especialmente el problema si el fracaso en la reproducción y lactancia de ratones y ratas, observado en animales alimentados con una dieta deficiente en vitamina B₁₂, se debía realmente a la falta de este factor o si había otro nutriente esencial y con acción sobre la facultad reproductiva. No se ha podido comprobar que existe en humanos una relación entre el consumo de alimentos de origen animal, que son las fuentes de la vitamina B₁₂, y la tasa de natalidad; más bien los grupos sociales inferiores son generalmente los más prolíficos, aunque consumen menos alimentos animales.

En los experimentos anteriores (8) habíamos constatado que una dieta a base de harina de soya y maíz, adicionada con todos los factores vitamínicos y minerales considerados como esenciales, con excepción de la vitamina B₁₂, no era adecuada para la reproducción normal de ratas o ratones. Los animales crecieron lentamente, sin otros signos aparentes de deficiencias alimenticias. Pero, al unir las hembras deficientes, se observó un porcentaje elevado de ratas estériles, con una mortalidad alta entre las crías, mientras que en ratones las madres se morían en la época de lactancia y la prole también demostró un alto porcentaje de mortalidad. En vista de la aparente contradicción entre estas observaciones experimentales y la procreación humana en condiciones alimenticias desfavorables en lo que respecta al consumo de productos ricos en vitamina B₁₂, emprendimos experimentos de larga duración y prolongados por varias genera-

ciones de animales experimentales para comparar la reproducción en condiciones alimenticias parecidas. Estas experiencias se han prolongado por más de tres años y se ha usado más de mil animales, entre ratones y ratas. Las cuestiones que tratamos de responder por medio de estos experimentos son las siguientes:

- 1) ¿Es la vitamina B₁₂ necesaria para la reproducción y lactancia normal?
- 2) ¿Hay otros factores desconocidos esenciales para la reproducción y la lactancia?
- 3) ¿Es posible reproducir animales omnívoros de necesidades alimenticias similares a las humanas por varias generaciones con dietas de origen puramente vegetal?

Estas preguntas tienen interés tanto para la nutrología humana y la ganadería como para la ciencia nutrológica en general.

Parte experimental.—Los experimentos se hicieron con ratones y ratas blancas criadas en nuestro laboratorio y alimentadas anteriormente con una ración comercial de "Ratarina", la cual contiene harina de pescado y otros materiales de origen animal. Todos los animales se tuvieron en jaulas con piso de tela metálica, para evitar la coprofagia. Los animales se mantenían en jaulas comunes hasta que las hembras salieron preñadas. Entonces se separaron y se tenían en jaulas solitarias. Las crías se redujeron a seis y se pesaron cada cinco días. A los veintiocho días de edad se separaron de la madre. Hemos obtenido diez generaciones de ratones y seis de ratas con las dietas experimentales en el curso de dos años y ocho meses.

Las dietas básicas usadas estaban compuestas de harina de soya desgrasada y maíz molido o harina de ajonjolí y maíz molido, respectivamente. Se agregaron además los siguientes suplementos: 5% de aceite de ajonjolí adicionado con 0,2% de aceite de percomorfum como fuente de vitaminas A y D, y 0,2% de aceite de gérmenes de trigo como fuente de vitamina E, 2% de mezcla de sales N^o 2, inclusive 0,1% de CoCl₂ y 1% de una solución de las vitaminas del complejo B, con la única excepción de la vitamina B₁₂ (8). Estas dos dietas se denominaron: N^o I la de harina de soya, y N^o III la de harina de ajonjolí. Ambas raciones son de origen puramente vegetal y se analizaron por su contenido de vitamina B₁₂ mediante los métodos microbiológicos usando el *Lactobacillus leichmannii* y *Lactobacillus lac-*

tus Dornier, encontrándose un contenido aparente de vitamina B₁₂ de aprox. 0,5 ug. en 100 gr. de dieta (11), lo que se puede considerar el 10% de la concentración considerada como necesaria para asegurar un crecimiento óptimo en los animales estudiados al respecto. Por consecuencia, las dietas basales se mostraron muy deficientes en vitamina B₁₂ y adecuadas para el estudio de este factor, por tener todos los factores alimenticios para ratas y ratones esenciales conocidos, con la única excepción de la vitamina B₁₂.

Resultados.—La reproducción de ratones mantenidos en las dietas descritas era buena por 10 generaciones consecutivas. Se observaron pocas muertes; el número de animales destetados por número de crías nacidas era prácticamente igual al observado en las series de control alimentados con una dieta comercial bien balanceada y rica en proteínas de origen animal. En la primera generación experimental, el crecimiento de las crías era normal, mientras que en las generaciones subsiguientes era muy lento. Mientras que a la edad del destete el peso normal es de 15 gr. por animal, más o menos, de la segunda generación en adelante no llega a más de 10-11 gramos.

Además del crecimiento sub-normal, el único signo de una deficiencia encontrado en estos animales era una hiperplasia de los riñones, resultando éstos con un peso alto en relación al peso corporal. Mediante la inyección de una sola dosis de vitamina B₁₂ pura se podía estimular el crecimiento de los animales a una tasa más o menos normal, lo que comprueba que el mal crecimiento se debe realmente a la falta de dicha vitamina. Sobre este particular estudio hemos publicado un informe preliminar (11).

En ratas también logramos una reproducción por seis generaciones consecutivas con las dietas mencionadas. La mortalidad de las crías era mayor que entre los controles y el crecimiento más lento. Llegaron a un peso de 40 gramos aproximadamente a la edad de 4 semanas, comparado con 70 de los controles. Sin embargo, estos ensayos demuestran claramente que, al igual que los ratones, también las ratas pueden vivir y reproducirse durante muchas generaciones no consumiendo sino productos vegetales con un mínimo contenido de vitamina B₁₂.

Estos resultados satisfactorios no están de acuerdo con otras observaciones obtenidas en experimentos anteriores, en los cua-

les resultó un fracaso la reproducción de ratones alimentados con dietas similares a las usadas en el presente trabajo. La única diferencia era la de que no se había agregado cloruro de cobalto, como se hizo durante el estudio actual. En la tabla N^o 1 se presenta una comparación entre los resultados de los dos estudios sobre la reproducción con dietas vegetales.

Como la única diferencia entre las dietas usadas en el estudio anterior y el presente era que la primera no tenía un suplemento de cobalto y la segunda sí, se emprendió una serie de experimentos para estudiar la importancia de dicho metal para la reproducción animal. Después de haber iniciado este estudio, se supo que la molécula de la vitamina B₁₂ contiene cobalto como parte integral. También se sabe desde hace algunos años que los rumiantes, que por su alimentación vegetal no consumen sino trazas de vitamina B₁₂, necesitan cobalto y que en su ausencia se presenta un síndrome de deficiencia. Como las heces de rumiantes son una buena fuente de vitamina B₁₂, y como de ellos se han aislado cepas de bacterias capaces de sintetizar la vitamina B₁₂ en presencia de cobalto, es muy probable que el papel de dicho metal es el de facilitar la síntesis intestinal de la mencionada vitamina en los rumiantes.

Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún indicio de que dicho metal desempeñe un papel similar en otros animales. Para estudiar este problema se emprendió una serie de experimentos. Un grupo de animales, tanto ratones como ratas, se mantenían con la misma dieta básica de soya y maíz, pero sin agregar cobalto en el suplemento mineral. Las crías nacidas de hembras alimentadas con esta dieta mostraron una mortalidad muy superior a la de los controles, mientras que en ratones 4 animales llegaron a la edad del destete por cada cría nacida, en el grupo que recibió la dieta sin suplemento de cobalto no eran sino 2,7. En ratas las cifras correspondientes eran 2,5 y 1, respectivamente. La inyección intraperitoneal de 200 mg. de cobalto en los ratones antes de parir no tenía ningún efecto sobre la sobrevivencia de la cría, mientras que en otras series encontramos que al agregar al agua que consumen los animales 10 partes por millón de cobalto, la reproducción vuelve al nivel normal. Esto indica que el cobalto es de importancia alimenticia no únicamente para los rumiantes, sino también para otros animales en caso de que consuman dietas pobres en vitamina B₁₂.

Es muy probable que su acción consista en estimular la síntesis por la microflora intestinal de la vitamina B₁₂, ya que en el caso contrario no sería explicable el que las sales de cobalto no tengan acción si se inyectan, sino únicamente por la vía oral. También esta observación puede explicar, por lo menos parcialmente, porque en diferentes laboratorios los resultados con dietas pobres en vitamina B₁₂ han sido distintos. Nunca se tomó en cuenta la cantidad de cobalto que contenían las dietas experimentales y ciertamente ella puede influir mucho en los resultados de dichos experimentos.

TABLA Nº 1

COMPARACION DE LA REPRODUCCION DE RATONES Y RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DE SOYA Y MAIZ, BAJA EN VITAMINA B₁₂, OBSERVADA EN UN ESTUDIO ANTERIOR (*) Y EN EL PRESENTE

<u>Número de animales</u>	<u>Número de crías</u>	<u>Crías muertas</u>	<u>Número de animales destetados/ por crías nacidas</u>	<u>Peso promedio a la edad del destete, en gramos</u>
A. Ratones:				
Estudio anterior: 13	9	4	1,0	6,1
Estudio presente: <u> </u>	17	1	4,7	11,5
B. Ratas:				
Estudio anterior: 13	7	5	1,0	38,0
Estudio presente: <u> </u>	11	6	2,5	45,0

(*) Los datos referentes al estudio anterior se publicaron en: Zeitschrift für Vitamin-Hormon-u. Fermentforsch. 2, 493 (1949).

TABLA Nº 2

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LA REPRODUCCION DE ANIMALES ALIMENTADOS CON DIETAS BAJAS EN VITAMINA B₁₂

Dieta	Número de crías	Crías muertas	Número de animales destetados/ crías nacidas	Peso promedio a la edad del destete
A. Ratones:				
Básica de soya con cobalto . . .	17	1	4,7	11,5
Básica de soya sin cobalto . . .	27	9	2,7	10,5
Básica de soya sin cobalto; cobalto inyectado	21	5	3,0	11,4
Básica de soya sin cobalto; cobalto en el agua de bebida .	23	3	4,7	11,4
B. Ratas:				
Básica de soya con cobalto . . .	11	6	2,5	45
Básica de soya sin cobalto . . .	15	10	1,0	35
Básica de soya sin cobalto; cobalto en el agua de bebida .	20	8	4,3	64

Otro experimento se hizo sobre la influencia de la cantidad de proteína en las dietas deficientes en vitamina B₁₂ en la reproducción de los animales. 25% de la harina de maíz se reemplazó por caseína purificada y extraída, aumentando así el porcentaje de proteínas de 24% a 40%. Las hembras preñadas se trataron de manera idéntica como en los ensayos anteriores, poniéndolas en jaulas separadas y observando el desarrollo de las crías. La mortalidad de estas últimas era muy superior a la observada en los experimentos con las dietas básicas. En los ensayos con ratones únicamente 0,3 animales por cada cría nacida sobrevivieron la época de lactancia, mientras en los controles eran 4. En ratas las cifras correspondientes eran 0,5 y 2,5. También el peso de las crías a la edad de 28 días era muy inferior, comparado con los controles. La inyección de una sola dosis de únicamente 3 ug. de vitamina B₁₂ en ratonas preñadas contrarrestó

completamente el efecto nocivo de la extra-proteína en las dietas bajas en dicha vitamina.

Esta observación comprueba la existencia de una estrecha relación entre el metabolismo de las proteínas y la vitamina B₁₂, observación que fué comprobada por otros autores por métodos muy diferentes. También puede dar un indicio de por qué en seres humanos que consumen dietas muy pobres en productos animales y, por lo tanto, bajas en vitamina B₁₂, no se encuentran necesariamente signos evidentes de deficiencia de dicha vitamina; estas mismas dietas son siempre relativamente pobres en proteínas y, por lo tanto, las necesidades en la vitamina B₁₂ son reducidas en estos casos.

TABLA Nº 3

**INFLUENCIA DE LA PROTEINA DIETETICA SOBRE LA
REPRODUCCION DE ANIMALES ALIMENTADOS CON
DIETAS BAJAS EN VITAMINA B₁₂**

Dieta	Número de crías	Crías muertas	Número de animales destetados/ crías nacidas	Peso promedio a la edad del destete
A. Ratones:				
Básica de soya (24% proteína) .	17	1	4,7	11,5
Soya y caseína (40% proteína) .	15	13	0,2	8,6
igual, 3 ug. de vit. B ₁₂ inyect. .	7	1	3,5	10,6
Básica de ajonjolí (24% proteína) .	13	0	5,3	13,5
Ajonjolí y caseína (40% proteína) .	12	7	1,0	6,3
igual, 3 ug. de vit. B ₁₂ inyect. .	7	2	4,0	13,0
B. Ratas:				
Básica de soya (24% proteína) .	11	6	2,5	45
Soya y caseína (40% proteína) .	7	6	0,5	35
Básica de ajonjolí (24% proteína) .	7	1	4,0	39
Ajonjolí y caseína (40% proteína) .	11	4	2,8	35

Discusión.—Los resultados de los experimentos descritos demuestran que es posible lograr la reproducción de ratones y ratas por muchas generaciones seguidas con una alimentación puramente vegetariana y muy deficiente en vitamina B₁₂. Bajo estas condiciones, los animales crecen muy lentamente y llegan a ser fértiles a una edad mayor que los controles. Entre otros signos de deficiencia encontramos una hiperplasia de los riñones en los ratones (11), pero no observamos anemia. Estos resultados demuestran que, bajo las condiciones experimentales usadas, una fuente dietética adecuada de vitamina B₁₂ no es vital. Si se cambia la composición de la dieta, se obtienen resultados menos favorables. Un aumento de la cantidad de proteína en las dietas experimentales resultó un fracaso de la reproducción. Aparentemente, la vitamina B₁₂ tiene una relación con el metabolismo proteico de modo que para poder metabolizar una cantidad excesiva de proteínas los animales requieren un suplemento de esta vitamina. Eso se comprobó mediante la inyección de vitamina B₁₂ en animales alimentados con dietas ricas en proteína. En este caso se observó una reproducción normal.

La relación biológica entre la vitamina B₁₂ y el cobalto se puede comprobar por los resultados de los ensayos en que las dietas experimentales no fueron suplementadas con el mencionado metal. La mayor mortalidad entre las crías que se observó en estos casos demostró que, bajo estas condiciones, las dietas ya no eran adecuadas. Es muy probable que haya síntesis intestinal de vitamina B₁₂ estimulada por la presencia de sales de Co e insuficiente en su ausencia. Este concepto está de acuerdo con las observaciones de que el Co estimula la síntesis de B₁₂ por varios microorganismos y que existen bacterias fecales capaces de sintetizar dicha vitamina (12).

Estos conceptos pueden explicar, si es permitido aplicarlos al hombre, por qué en humanos que viven con dietas muy pobres en productos animales y, por lo tanto, en vitamina B₁₂, no se encuentran generalmente disturbios graves causados por esta deficiencia. Tales dietas son también relativamente pobres en proteínas y, por esta razón, las necesidades en vitamina B₁₂ serán bajas.

Un interés especial debe darse al cobalto dietético, metal hasta ahora considerado como no esencial para el hombre. Probablemente no es esencial si se consumen cantidades suficientes

de vitamina B₁₂, que en sí misma contiene cobalto. Pero posiblemente el contenido en cobalto de las dietas puede tener una influencia sobre las personas que consumen una alimentación pobre en dicha vitamina.

La acción del cobalto dietético, tal como es explicado aquí, probablemente no tiene relación con su conocida acción de producir policitemia, porque ésta se produce con dosis mucho más grandes que el efecto dietético y se observa en animales normales, no deficientes en vitamina B₁₂. Además, el modo de acción en este caso es muy distinto, tratándose, según Guzmán-Barrón, de una acción sobre grupos sulfhídricos tisulares (13), mientras que la acción dietética es probablemente indirecta a través de la estimulación de la síntesis bacteriana de la vitamina B₁₂.

De paso sea mencionado que los animales mantenidos con dietas deficientes en vitamina B₁₂ no se hicieron anémicos. Este aspecto será el tema de una futura comunicación.

RESUMEN

La vitamina B₁₂ se encuentra en los alimentos de origen animal y en ciertos productos microbianos, mientras que las dietas vegetarianas contienen únicamente cantidades mínimas. En el presente trabajo se da cuenta de los resultados de ensayos con más de 1.000 animales y en experiencias realizadas por espacio de tres años de duración sobre la reproducción de ratones (lauchas) y ratas blancas alimentadas con dietas puramente vegetales y deficientes en vitamina B₁₂. Los animales se alimentaron con dichas dietas por varias generaciones seguidas y se observó una reproducción satisfactoria, aunque el desarrollo de las crías era muy lento.

Cuando se omitió el suplemento de CoCl₂ de las dietas se observó un aumento en la mortalidad de las crías. La inyección de CoCl₂ en las madres no tuvo efecto, mientras que la adición de una sal de cobalto a la bebida tenía un efecto beneficioso, resultando una reducción en la mortalidad de los cachorros.

Un aumento en el contenido proteico de las dietas de 24% a 40% produjo una mortalidad de cerca del 100% de las crías. Una sola dosis de vitamina B₁₂ pura inyectada en la madre an-

tes de dar a luz era suficiente para lograr la supervivencia de las crías.

Los resultados se interpretan en el sentido de que bajo condiciones normales animales omnívoros se pueden reproducir satisfactoriamente con dietas muy pobres en vitamina B₁₂. El aumento del contenido proteico en la alimentación aumenta considerablemente la necesidad de los animales por dicha vitamina.

El cobalto, que por cierto existe en la molécula de la vitamina B₁₂, estimula su síntesis por la microflora intestinal; por lo tanto, tiene acción bajo las condiciones experimentales usadas únicamente por la vía bucal. Esta acción del cobalto sobre la reproducción es muy distinta de la acción que ejerce sobre el sistema hemopoyético. La deficiencia dietética de la vitamina B₁₂ del tipo producido en los experimentos presentados no produce anemia.

SUMMARY

Vitamin B₁₂ is found in the foods of animal origin and in certain microbial products while the vegetarian diets contain only minimum quantities. In the present work results are presented of trials with more than 1000 animals and of experiences realized over a space of three years concerning the reproduction of white mice and white rats fed with purely vegetable diets deficient in Vitamin B₁₂. The animals were fed with said diets for various succeeding generations and a satisfactory reproduction was observed, even though the development of the litters was very slow.

If the supplement of CoCl₂ is omitted from the diets, an increase in the mortality of the litters is observed. The injection of CoCl₂ to the mother was without effect, while the addition of this cobalt salt to the drinking water had a beneficial effect, resulting in a reduction in the mortality of the litters.

An increase in the protein content of the diets from 24 to 40% resulted in the mortality of nearly 100% of the litters. One single dose of pure Vitamin B₁₂ injected in the mother before giving birth was sufficient to maintain the survival of the litters.

The results are interpreted to mean that under normal conditions omnivorous animals can be reproduced satisfactorily with diets very poor in Vitamin B₁₂.

The increase of the protein content in the diet increases considerably the need of the animals for said vitamin. Cobalt which exists in the molecule of Vitamin B₁₂ probably stimulates its intestinal synthesis. This may be concluded from the fact, that injections of cobalt salts were ineffective under the experimental conditions used. The described activity of cobalt is probably different from its effect to produce policitaemia. The lack of Vitamin B₁₂ in the diets did not produce anaemia in the experimental animals.

ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin B₁₂ wird hauptsächlich in tierischen und einzelnen mikrobiologischen Produkten gefunden, jedoch nur in äusserst geringer Menge in Produkten pflanzlicher Herkunft. In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche an Mäusen und Ratten berichtet, die während verschiedener Generationen (3 Jahre) auf rein pflanzlicher Kost von bekanntem und sehr geringem Gehalt an Vitamin B₁₂ gehalten wurden. Die Fortpflanzung war zufriedenstellend, obwohl das Wachstum der Jungen sehr langsam war.

Wenn in der Zusammenstellung der Rationen das Supplement an Cobalt weggelassen wurde, zeigte sich eine erhebliche Zunahme in der Sterblichkeit der Jungen. Die Injection von CoCl₂ in die Muttertiere war ohne Wirkung, während ein Zusatz dieses Salzes zum Futter oder zum Trinkwasser die Mortalität auf das normale Mass zurückbrachte.

Wenn der Gehalt an Eiweiss in den Diäten von 24 auf 40% erhöht wurde durch Zulage von extrahiertem Kasein, wurden fast keine überlebenden Junge erhalten; eine einzige Injektion von reinem Vitamin B₁₂ in das Muttertier vor dem Werfen, bewirkte eine normale Überlebensrate.

Die Ergebnisse werden in dem Sinne ausgelegt, dass unter normalen Bedingungen omnivore Tiere sich fortpflanzen können ohne eine wesentliche Quelle für Vitamin B₁₂ in der Nahrung zu haben. Eine Erhöhung des Eiweissgehaltes der Kost erhöht den Bedarf an Vitamin B₁₂ erheblich.

Cobalt, das im Molekül von Vitamin B₁₂ vorhanden ist, scheint die intestinale Synthese dieses Faktors anzuregen, da-

her ist es nur per os nicht injiziert wirksam unter den gegebenen Versuchs-Bedingungen. Diese Cobalt - wirkung ist wahrscheinlich verschieden von der bekannten Wirkung Policitämie zu erzeugen. Der reine B₁₂ Mangel, wie er in der vorliegenden Arbeit erzeugt wurde, hat keine Anämie zur Folge.

BIBLIOGRAFIA

- (1) W. G. Jaffé. — Rev. San. Asist. Soc., Caracas, 8, 1.107 (1944).
- (2) W. G. Jaffé. — J. Biol. Chem. 165, 387 (1946).
- (3) W. G. Jaffé y C. A. Elvehjem. — J. Biol. Chem. 169, 287 (1947).
- (4) E. L. Rickes et al. Science 107, 396 (1948).
- (5) E. L. Smith. — Nature 161, 638 (1948).
- (6) R. West. — Science 107, 398 (1948).
- (7) W. H. Ott et al. — J. Biol. Chem. 174, 398 (1948).
- (8) W. G. Jaffé. — Zeitschr. Vitamin-Hormon-Fermentforsch. 2, 494 (1949).
- (9) E. L. Rickes et al. — Science 108, 634 (1948).
- (10) J. M. Bengoa. — XII Conf. San. Panamer., Cuaderno Amarillo Nº 8 (1946).
- (11) W. G. Jaffé. — Arch. Biochem. 27, 464 (1950).
- (12) G. Hendlin y M. L. Ruger. — Science 111, 541 (1950).
- (13) A. Guzmán Barrón. — Trabajos presentados al 4º Congreso Suramericano de Química, Santiago de Chile, 1948, vol. I, pág. 213.