



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

13

**ANALISIS COMPARATIVO DE VITAMINA B<sub>12</sub> COMO  
MATERIA PRIMA POR METODO  
ESPECTROFOTOMETRICO Y MICROBIOLOGICO**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**Q U I M I C O**  
**P R E S E N T A**  
**LILIA M. HUIZAR CONTRERAS**

**1978**



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.

Universidad Nacional Autónoma de México  
 CLAS TESIS 1978  
 AÑO M. C. 1978  
 FECHA \_\_\_\_\_  
 PROC. 227



ANALISIS COMPARATIVO DE VITAMINA B  
 12  
 MATERIA PRIMA POR METODO  
 ESPECTROFOTOMETRICO Y MICROBIOLOGICO



T E S I S  
 QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
 Q U I M I C O  
 P R E S E N T A  
 LILIA M. MUÑOZ FORTINERAS

1978

Presidente: Prof. Natalia Salcedo Olivarrieta  
Vocal : Prof. Guadalupe Vélez Pratt  
Jurado Secretario: Prof. Dea Coronado Perdomo  
1er. Suplente Prof. Alfredo Echegaray Alemán  
2o. Suplente Prof. Jorge Soto Soria.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorios Cyanamid de  
México S.A. de C.V.



Sustentante Lilia M. Huizar Contreras.

Asesor Q. Natalia Salcedo Olivarrieta.



A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A LA PROFESORA

NATALIA SALCEDO.

## C O N T E N I D O

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	3
A. Historia	3
B. Fórmula	5
C. Propiedades	8
D. Métodos de obtención	9
E. Acción fisiológica	15
F. Fuentes y requerimientos	19
G. Deficiencias	21
III. METODOS	23
A. Método espectrofotométrico	24
B. Método microbiológico	26
IV. RESULTADOS	38
ESTUDIO ESTADISTICO	42
V. CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46

## I. INTRODUCCION

① Las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios para el crecimiento y la conservación normal de la vida animal incluyendo al hombre, ya que intervienen en la transformación de la energía y en la regulación del metabolismo.

Actualmente debido a la importancia de estos compuestos, la mayoría se producen por síntesis orgánica, lo que permite obtenerlos en forma pura, a menor costo y en mayor cantidad.

Dentro de estos compuestos, la vitamina B<sub>12</sub>, desde su descubrimiento en 1948, se ha constituido en una de las de mayor interés por el papel tan importante que juega en las funciones vitales de los seres vivos.

La industria farmacéutica le ha prestado un gran interés y ha sido incluida en un gran número de productos farmacéuticos. Debido a la importancia de este compuesto, en esta industria se ha hecho relevante su análisis.

Los primeros métodos de análisis de vitaminas se hicieron empleando métodos biológicos. Los físicos, químicos y microbiológicos han sido desarrollados posteriormente.

Actualmente los métodos biológicos sólo son utili

zados cuando se requiere determinar la facilidad de absorción o liberación de las vitaminas presentes en preparaciones farmacéuticas.

Por lo anterior se seleccionó esta vitamina para su estudio por dos métodos, espectrofotométrico y microbiológico, ya que los dos son los de mayor uso en la Industria Farmacéutica.

Así pues, este pequeño estudio sirva dentro de la Industria Farmacéutica, para poder tener una mayor confiabilidad en los análisis de vitamina B<sub>12</sub> por estos métodos.

## II. GENERALIDADES

### A. Historia.

② / La historia de la vitamina B<sub>12</sub> resulta interesan-  
te, ya que su descubrimiento, aislamiento, determinación -  
de la estructura y modo de acción han constituido temas de  
gran interés. (10)

En 1926 Menot y Murphy (10) demostraron que la -  
anemia perniciosa podía ser combatida por la administra---  
ción del hígado completo y durante los veinte años siguien-  
tes se realizaron muchos trabajos encaminados a la obten--  
ción del principio activo en forma pura, sin embargo no se  
obtuvieron resultados importantes. Ello se debió en parte-  
a las cantidades extremadamente pequeñas de hígado de don-  
de se partía, la única fuente entonces conocida. El descu-  
brimiento de un método de ensayo biológico del factor anti  
pernicioso con Lactobacillus lactis dió a los investigado-  
res un criterio para la determinación de la potencia le --  
los concentrados y con ello se hizo posible la evolución -  
más rápida para lograr el aislamiento del principio activo.

En 1948 Folkers y colaboradores (11), en los Es-  
tados Unidos anunciaron el aislamiento de esta vitamina en

forma cristalina a partir del hígado y su obtención por medio de fermentaciones. Un poco después en Inglaterra, --- Smith (11) y colaboradores informaron haber aislado el mismo producto. //

Esto trajo por consecuencia la disponibilidad de la vitamina tanto en forma de concentrados activos como de compuestos puros para fines terapéuticos y en un solo año se encontraba ya a disposición en el mercado. (11)

Aclarar la estructura de este compuesto resultó un problema extramadamente difícil, que se resolvió en --- 1957 mediante una combinación de métodos químicos y de --- cirstalografía de rayos X. (10)

B. Fórmula.

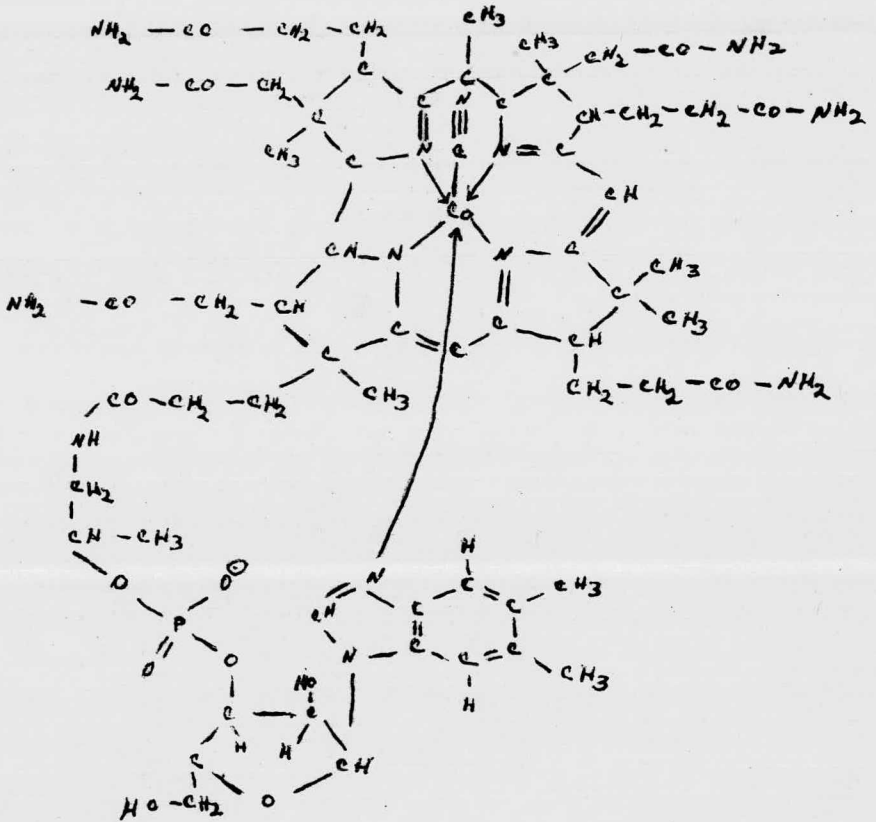
③ / La fórmula estructural de la vitamina B<sub>12</sub> fué determinada por Hodgkin y colaboradores (10), por lo que le fué concedido el premio Nobel de Química en 1964, (Esquema 1).

Esta vitamina tiene la estructura más complicada de todas las vitaminas conocidas. Tiene una fórmula empírica de C<sub>63</sub> H<sub>88</sub> N<sub>14</sub> O<sub>14</sub> P Co, con un peso molecular de 1355.38. Posee dos componentes característicos, el primero es una estructura semejante a la de un nucleótido excepcional en cuanto a que contiene como base el 5,6 dimetilbenzimidazol en enlace  $\alpha$  glucosídico con la D-ribosa en lugar del enlace  $\beta$  presente en la mayor parte de los nucleótidos; contiene un grupo fosfato en la posición 3 enlazado mediante el D-1-amino-2-propanol al segundo componente que es la parte más característica de la molécula, que es el núcleo de la corrina, ya que se parece a las porfirinas por contener cuatro anillos pirrólicos, pero en la cual dos de los pirroles se encuentran unidos directamente a través de puentes meténicos. Coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno internos del anillo de corrina se encuentra un átomo de cobalto del que se sabe desde hace tiempo que es un metal cuyas trazas son esenciales para el crecimiento.

En la forma que se aisla habitualmente, la 6a posición de coordinación del átomo de cobalto se halla ocupada por el cianuro, pero ello es derivado del proceso de aislamiento, este compuesto recibe el nombre de "cianocobalamina" (10). Es posible también substituir el grupo cianuro -- por un grupo hidroxilo formando la hidroxicobalamina o bien por un grupo nitro para formar la nitrocobalamina.

El nombre sistemático de la vitamina B<sub>12</sub> aprobado por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (I.U.P.A.C.) es cianuro de alfa (5,6 dimetilbenzimidazoil cobamida) (2).



Vitamina B<sub>12</sub>

Fórmula estructural de la vitamina B<sub>12</sub> o cianocobalamina.

### C. Propiedades.

La cianocobalamina es un compuesto cristalino de color rojo (debido al complejo de cobalto porfirínico) o polvo cristalino soluble en agua (1:8), alcohol y fenol; insoluble en acetona, cloroformo y éter. En forma anhidra es muy higroscópico y expuesto al aire absorbe hasta 12% de humedad. (16)

Los cristales funden a una temperatura mayor de  $300^{\circ}\text{C}$  pero se oscurecen a  $210\text{-}220^{\circ}\text{C}$  aproximadamente. Su actividad óptica en solución acuosa es  $[\alpha]_{23}^{20} = -59^{\circ}$   
 $\pm 9$   $[\alpha]_{6438}^{20} = -110^{\circ} \pm 10$ . (11). Las soluciones acuosas de la cianocobalamina presentan los siguientes máximos de absorción a  $278 \text{ m}\mu E_{1\text{cm}}^{1\%} = 115$ ,  $361 \text{ m}\mu E_{1\text{cm}}^{1\%} = 207$   $548 \text{ m}\mu E_{1\text{cm}}^{1\%} = 63$  que son prácticamente independientes del pH(15)

La estabilidad óptima de la vitamina  $B_{12}$  en solución acuosa es a pH 4.5- 5.0; no ocurre pérdida significativa a las temperaturas ordinarias durante períodos de dos años o más. Sin embargo a temperaturas elevadas y a un pH mayor de 9 su descomposición es más rápida. Su actividad es destruida por los metales pesados y los agentes oxidantes o reductores fuertes.

#### D. Métodos de Obtención.

La síntesis química no ha logrado llevarse a cabo a escala industrial, debido a su elevado costo y se limita a la porción de fosfato ribasol de la molécula de cobalamina, además el compuesto obtenido es idéntico al producto de degradación de la vitamina B<sub>12</sub>, pero no se sabe si se trata del fosfato 2' o del 3'.

De esta forma la producción industrial de la vitamina B<sub>12</sub> se realiza casi exclusivamente por métodos microbiológicos. Generalmente es obtenida por fermentación primaria, pero en algunos casos es obtenida de caldos de cultivo usados principalmente para la producción de antibióticos. Esto último constituye una medida económica, puesto que la máxima producción del antibiótico y la máxima de la cobalamina generalmente no ocurren bajo las mismas condiciones de fermentación.

Otras fuentes de obtención son las aguas negras, ya que se ha patentado un proceso para la extracción de esta vitamina y se han obtenido concentrados hasta de 86 mg/Kg.

Los microorganismos que se han reportado en la producción comercial son: Streptomyces griseus, Streptomyces olivaceus y Streptomyces aureofaciens; las bacterias -

Bacillus megaterium, Propionibacterium freudenreichii y -- una fermentación con Proteus sp. y ciertas cepas de Pseudomonas aeruginosa y ovalis.

Las fermentaciones para producir vitamina B<sub>12</sub> se llevan a cabo generalmente por un cultivo sumergido en un medio aerado y agitado. El tiempo de fermentación es regularmente de 3-5 días.

La siguiente descripción está basada en un proceso para la producción de cobalamina por Streptomyces olivaceus, el cual fué desarrollado por los "Fermentation Division of the Northern Regional Research Laboratories". Debe ser usado el cultivo puro puesto que la contaminación da invariablemente rendimientos muy bajos. Todo el equipo debe estar estéril y las transferencias deben ser llevadas a cabo esépticamente.

El medio de cultivo para estos organismos consiste en una fuente de carbohidratos, material proteínico, -- una fuente de cobalto y otras sales. Un medio típico es el siguiente:

Productos de destilería	4.0 %
Glucosa	0.5 %
Carbonato de calcio	0.5 %
Cloruro de cobalto hidratado	1.5-10 ppm.

(pH ajustado a 7 con NaOH).

El abastecimiento de cobalto es esencial para obtener máximos rendimientos de cobalamina aunque no necesariamente para el crecimiento del microorganismo.

En algunos casos se adiciona cianuro al medio para ayudar en la conversión de otras cobalaminas a la vitamina B<sub>12</sub>.

El medio puede ser esterilizado directamente en el fermentador o en forma continua, cuando el fermentador está siendo cargado, mezclando el medio directamente con vapor vivo.

Durante la esterilización se introduce vapor por todas las entradas, y las vías para la inoculación se mantienen con sello de vapor para asegurar la esterilización del fermentador.

Los cultivos puros de los organismos usados se mantienen en gelosa inclinada y se hacen crecer primero en 100 - 250 ml de medio líquido y por agitación y después de 2 a 3 inoculaciones en cantidades cada vez crecientes de medio para obtener el volumen necesario de inóculo. Es satisfactoria la inoculación de los fermentadores con un 5 % del volumen del medio.

Durante la fermentación, la temperatura se mantiene alrededor de 27°C. Dentro de ciertos límites la velocidad de crecimiento del cultivo, pero no el rendimiento final de cobalamina, depende de la velocidad de agitación y aereación. Una aereación demasiado rápida provoca espuma excesiva y la velocidad óptima es de unos 0.5 volúmenes de aire/vol. de medio por minuto. El aire es esterilizado por el paso a través de columnas de carbón activado. La espuma es un serio problema, particularmente al principio y final de la fermentación. Este inconveniente se subsana por la adición de agentes antiespumantes, como el aceite de semilla de soya, aceite de maíz, manteca de cerdo o silicones. En algunos casos se agrega un antiespumante cuando se prepara el medio.

Durante las primeras 24 horas de la fermentación, el pH desciende algunas décimas de unidad, la concentración de azúcar disminuye radicalmente y la mezcla llega a ser muy espesa como resultado del crecimiento del micelio y también de la formación de materiales viscosos como polisacáridos. La concentración de cobalamina en el caldo de fermentación surge muy lentamente, alrededor de las 20 horas y después mucho más rápidamente. Después de 2 -4 días, cuando los nutrientes disponibles son consumidos, empieza la lisis del micelio; el pH se eleva alrededor de 8 y la masa casi se --

disgrega. Poco o nada de cobalamina se forma después de que la lisis empieza. La masa entonces se estabiliza por la reducción del pH a 5 con  $H_2SO_4$  y la adición de pequeñas cantidades de un reductor como el sulfito de sodio. Los rendimientos de cobalamina oscilan generalmente entre 1-2 mg/l en el caldo de cultivo final.

Durante la mayor parte del período de fermentación, casi toda la cobalamina está presente en el micelio, pero al final una considerable porción está en solución. Ca lentando la mezcla a ebullición, a un pH de 5 o menos, se libera cuantitativamente la cobalamina del micelio.

Los aspectos esenciales de la producción de cobalamina por fermentaciones bacterianas son similares a los Streptomyces, aunque hay algunas diferencias en el medio, condiciones, tiempo, etc., para lograr rendimientos óptimos.

Para preparar concentrados de baja potencia de vitamina  $B_{12}$  para uso como suplemento alimenticio, generalmente lo único que se necesita es evaporar a sequedad el caldo final. Estos caldos finales contienen alrededor del 3% de sólidos y primero se evaporan al vacío a un contenido de sólidos del 15 - 20%; los jarabes resultantes se secan en tambores o espreas. Las diferencias en condiciones durante este proceso no afectan la potencia del producto excepto la -

evaporación del caldo a temperatura por arriba de  $82^{\circ}\text{C}$ . -- Las concentraciones obtenidas por esta vía de fermentación suplementada con cobalto, son de 22 - 66 mg/kg.

Los procesos usados comercialmente para la extracción de la vitamina  $\text{B}_{12}$  no ha sido descritos en detalle y la mayor parte de la información publicada se encuentra en patentes.

Sin embargo, una de las primeras etapas de esta parte del proceso consiste en tratar el caldo filtrado con cianuro, el cual convierte todas las cobalaminas en cianocobalaminas; aunque esta etapa puede efectuarse después de haber alcanzado una cierta concentración. La cianocobalamina posteriormente se adsorbe de la solución; varias sustancias pueden ser empleadas con este fin (carbón, tierra de batán, bentonita y resinas intercambiadoras de iones). La elución del adsorbente va generalmente acompañada por el uso de una solución acuosa de sustancias que van desde sales orgánicas hasta ácido clorhídrico.

Otra etapa de purificación aplicable a concentrados acuosos consiste en la disolución de una sal de zinc en una solución ligeramente ácida y elevando el pH para precipitar el  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ , el cual extrae muchas impurezas. La cromatografía sobre alúmina y la cristalización metanol---



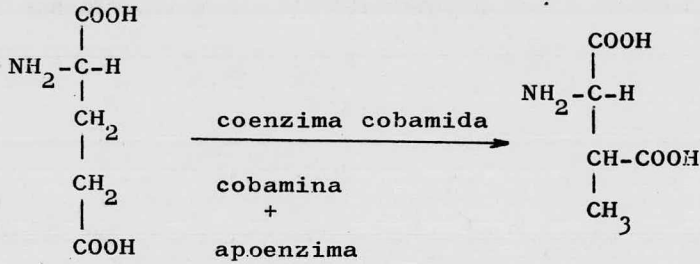
acetona o acetona-agua, generalmente completan el proceso.

Finalmente la producción comercial de adenosilco<sub>12</sub>balamina (coenzima B<sub>12</sub>) ha sido reportada recientemente en una patente italiana según la cual Nocardia rugosa se cultiva en un medio líquido nutritivo esterilizado. La adenosilcobalamina se purifica centrifugando el micelio y extrayendo con un disolvente las impurezas. Este nuevo procedimiento microbiológico es de una alta eficiencia de producción de coenzima pura y estable a la luz. (8,12).

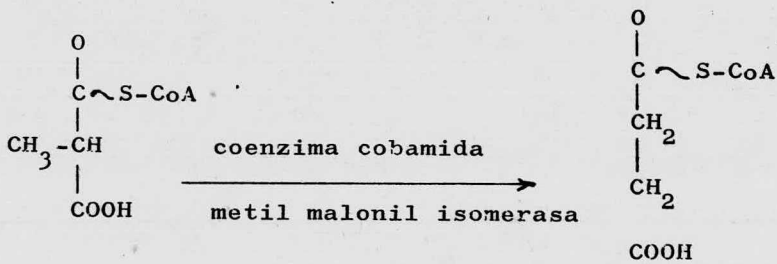
### Acción fisiológica.

Las investigaciones resultantes indican que la -  
cianocobalamina se absorbe en el ileón y depende de la pre  
sencia del ácido clorhídrico y de un componente normal del  
jugo gástrico que ha sido denominado "factor intrínseco" -  
por Castle. El factor intrínseco es constituyente de la mu  
coproteína gástrica, se encuentra en el cardíax y en el --  
fondo del estómago pero no en el píloro.

La ausencia y desequilibrio en la proporción vi-  
tamina B<sub>12</sub>/ factor intrínseco impide la absorción de la vi  
tamina. Sin embargo, si se administra por vía intramuscu--  
lar, la vitamina es efectiva aún sin la presencia del fac-  
tor intrínseco; aparentemente la única función del factor-  
intrínseco es permitir la absorción de la vitamina B<sub>12</sub> en-  
el intestino sólo cuando existe en cantidades muy pequeñas,  
como las que contienen los alimentos naturales. Por lo tan  
to, resulta aparente que tanto la vitamina B<sub>12</sub> como el fac  
tor intrínseco constituyen el factor antianemia perniciosa  
descrito por Castle (9,10). Se ha demostrado que las coba-  
midas catalizan la conversión enzimática en sistemas bacte  
rianos del glutamato a  $\beta$ -metil aspartato (fig. 2). En -  
los tejidos animales cataliza la reacción de la isomerasa-  
en la cual la metilmalonil - coenzima A se convierte en --  
succinil-coenzima A. (fig. 3).

Figura 2

Ac. glutámico

Ac.  $\beta$  metil aspárticoConversión del ac. glutámico en ac.  $\beta$  metil aspárticoFigura 3.

Metil malonil CoA

Succinil CoA

Acción de la metil malonil isomerasa.

Las funciones de las coenzimas descritas anteriormente no explican el papel de la vitamina en la hematopoyesis, sin embargo, estos hallazgos apoyan la idea de que esta vitamina interviene de una manera fundamental en procesos metabólicos que no quedan limitados al tejido hematopoyético. La prueba más importante de este papel metabólico de la vitamina en su conexión con la neogenesis de los grupos metilo o como cofactor en las reacciones de transmetilación como sucede en la biosíntesis de la metionina. También se cree que la vitamina B<sub>12</sub> interviene en la reducción de un carbono en el grupo de la tiamina, lo que constituye una reducción específica del ácido fórmico a formaldehído, preparatoria para la síntesis de metilos. Otros experimentos han sugerido que la vitamina interviene en la síntesis de los ácidos nucleicos.

Así pues la vitamina B<sub>12</sub> en sí misma no posee actividad como coenzima, pero su derivado 5-desoxiadenosilo es la forma coenzimática activa. El grupo 5-desoxiadenosilo se halla unido al cobalto de la vitamina solamente a través de su grupo metileno que sustituye al grupo cianuro de la cianocobalamina, (3,4,6).

#### F. Fuentes y requerimientos.

El contenido de vitamina B<sub>12</sub> en los alimentos es muy bajo. Las fuentes de la misma en la dieta son predominantes en los alimentos de origen animal, siendo los más ricos el hígado y los riñones, los cuales contienen de 40 a 50 mcg por cada 100 gramos. La carne, leche, huevo y queso contienen de 1 a 5 mcg por cada 100 g. Siendo el contenido de esta vitamina en plantas superiores casi nulo. Esta vitamina es normalmente estable en el cocinado, pero un calentamiento excesivo de la carne y productos similares puede causar su destrucción.

Casi seguramente la única fuente de obtención natural de vitamina B<sub>12</sub> es la síntesis microbiana.

No hay pruebas que indiquen que tal biosíntesis puede efectuarse en tejidos de plantas y animales superiores. La actividad de los microorganismos para sintetizar la vitamina la comparten las bacterias intestinales; un buen ejemplo de ello es la flora microbiana del rumen de los rumiantes.

No ha sido todavía establecido con certeza el requerimiento diario de vitamina B<sub>12</sub> en humanos. Una dosis correspondiente a 1 mcg por día puede cumplir el requerimiento para adultos normales, así un consumo mínimo en la

dieta diaria de 0.6 a 1.2 mcg es adecuado para mantener la salud y la hemopoyesis normal en sujetos normales. Este requerimiento lo aporta la dieta mixta.

Las recomendaciones del consejo de alimentos y -  
nutrición varían de 0.3 mcg para infantes a 0.4 mcg en mu-  
jeres embarazadas. (2,6,10,17)

### G. Deficiencias.

Ya se ha mencionado que en el hombre la deficiencia de la vitamina B<sub>12</sub>, tiene relación con la anemia perniciosa. Castle y otros, hace años, sugirieron que en la anemia perniciosa hay carencia de un factor intrínseco (factor estomacal) y un factor extrínseco (factor alimenticio). Se sabe que los dos factores reaccionan para formar algo necesario para la maduración de los glóbulos rojos. Se ha establecido actualmente que el factor extrínseco de Castle es la vitamina B<sub>12</sub>. El factor intrínseco ocurre normalmente en el jugo gástrico. La anemia perniciosa se debe a la falta de factor intrínseco, pues la vitamina no se absorbe en su ausencia. (2)

La anemia perniciosa se caracteriza por una hematópoyesis ineficaz, anemia macrocítica, leucopenia y degeneración neurológica progresiva.

En estados de carencia de la vitamina B<sub>12</sub> antes del desarrollo de la anemia, pueden presentarse las lesiones del sistema nervioso, la demanda del tejido hematopoyético excede a la de cualquier otra función clínicamente reconocida. La macrocitosis es, por lo tanto, el indicador más sensible de una deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>.

La falta de esta vitamina puede también ocurrir -

en personas infestadas por Diphyllobothrium en insuficiencia pancreática crónica, diverticulosis en yeyuno y otros-síndromes de mala absorción. (10)



III. M E T O D O S

## Material

Matraces volumétricos de 1000 ml.  
Matraces volumétricos de 10 ml.  
Matraces volumétricos de 100 ml.  
Matraces volumétricos de 250 ml.  
Matraces redondo fondo plano de 500 ml.  
Erlenmeyer de 50 ml.  
Erlenmeyer de 250 ml.  
Pipetas graduadas de 25 ml.  
Pipetas volumétricas de 10 ml.  
Pipetas volumétricas de 3 ml.  
Pipetas volumétricas de 1.0 ml.  
Tubos de ensayo de 12 x 200 mm.  
Gradillas para tubo de ensayo (30 lugares).  
Espectrofotómetro Beckman DB.  
Lumetrón Modelo 401.

Se utilizaron muestras de vitamina B<sub>12</sub> con pureza grado farmacéutico y de 3 concentraciones diferentes, siendo éstas las siguientes:

1. Cianocobalamina 100 %.
2. Cianocobalamina al 1.0 %.
3. Cianocobalamina al 0.1 %.

Estas muestras se sometieron a análisis por ambos métodos.

Las muestras provienen de Productos Químicos y de Simbotik S. A. de diferentes lotes y fecha de fabricación.

El almacenamiento de las muestras se hizo bajo -- condiciones de temperatura y humedad ambiente, en frascos -- de vidrio transparente y cerrados.

Debido a que la cianocobalamina es muy higrocópica, las determinaciones se realizaron sobre muestras previamente secadas a  $105^{\circ}\text{C}$  por tres horas y mantenidas en desecador hasta antes del análisis.

Los métodos por los cuales se analizó cada una de las muestras se exponen a continuación.

#### A. Método espectrofotométrico.

La vitamina B<sub>12</sub> o cianocobalamina presenta en el espectro absorciones a 360, 380 y 550 nm. De éstas, la absorción a 360 nm. es la utilizada para la determinación espectrofotométrica por ser la de mayor amplitud y así la más característica de todas ellas. (14,15)

Preparación de las muestras.

Cianocobalamina 100 %. Se pesan exactamente 30 mg se pasa a un matraz volumétrico de 1000 ml, se disuelve y -

afora con agua destilada. Teniendo así la concentración de 30 mcg/ml.

Cianocobalamina al 1.0 %.

Se pesa exactamente 1 g de la muestra que equivale a 10 mg de vitamina B<sub>12</sub>, la que se lleva a 100 ml con agua destilada, se toman 3 ml de esta dilución y se llevan a un aforo de 10 ml, también con agua destilada, esta dilución contiene 30 mcg. por mililitro.

Cianocobalamina al 0.1 %.

Se pesa un gramo de la muestra equivalente a 1 mg de cianocobalamina se afora a 10 ml con agua destilada, se toma alícuota de 3 ml y nuevamente se afora a un volumen de 10 ml, teniendo así la concentración de 30 mcg/ml.

Con esta concentración en las muestras de 30 mcg/ml se determinan las absorbancias en un espectrofotómetro de 360 nm contra un estándar utilizando agua como blanco.

Cálculos.

$\frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia estándar}} \times 100 = \% \text{ de la muestra.}$

## B. Método microbiológico.

Los métodos microbiológicos han sido ampliamente utilizados en la determinación de las vitaminas del grupo-B. Debido principalmente a su gran sensibilidad. (17)

El método microbiológico está basado en el crecimiento de Lactobacillus leichmannii que en presencia de la cianocobalamina y en medio específico se reproduce en forma proporcional, causando una turbiedad que se mide fotométricamente en porciento de transmitancia. La determinación debe efectuarse paralelamente con una solución de referencia en la cual, una vez obtenida sus lecturas, se graficarán en papel logaritmico con los valores de por ciento de transmitancia y sus respectivas concentraciones.

Lactobacillus leichmannii, Ochromonas malhamensis y Euglena gracilis, son microorganismos que necesitan para su crecimiento de la presencia de la vitamina B<sub>12</sub>. En el presente trabajo se utilizó Lactobacillus leichmannii por ser el que recomienda la Farmacopea de los Estados Unidos, de donde se obtuvo el método. (16)

Lactobacillus leichmannii llamado así por Henenberg en honor del bacteriólogo alemán German Leichmannii.- Pertenece a la familia Lactobacillacea, al género Lactobacillus. Bacilos con terminales redondas, de 0.6 por 2.0 -

4.0 m. Se encuentran solos o en cadenas cortas, inmóviles, colonias normalmente rugosas, no pigmentadas. Producen ácido láctico D(-), son homofermentativos, no acidifican la leche, pero fermentan la lactosa en medios apropiados. Las paredes celulares contienen ácido glucerol teicoico, peptidogluconas del tipo de L-lisina y D-aspartato y grupos serológico no determinados. Requiere para su nutrición de vitamina B<sub>12</sub>, pantotenato de calcio, niacina y ácido fólico. No crecen a 15°C, presentan ligero crecimiento a 45°C y el mayor crecimiento es de 35 a 45°C. Se aísla de levadura comprimida y mosto de cereales. (2,4)

#### Método.

#### Medios de cultivo.

##### Medio basal.

1. L-Cistina	0.1 g.
2. L-Triptófano	0.05 g.
3. Acido Clorhídrico 1 N.	10.0 ml.
4. Solución adenina, guanina, uracilo	5.0 ml.
5. Solución xantina	5.0 ml.
6. Solución vitamínica. 1.	10.0 ml.
7. Solución vitamínica. 2.	10.0 ml.
8. Solución salina A.	5.0 ml.
9. Solución salina B.	5.0 ml.
10 Solución de asparragina	5.0 ml.

11. Solución ácida de caseína hidrolizada	25.0 ml.
12. Glucosa anhidra	10.0 ml.
13. Acetato de sodio anhidro	5.0 ml.
14. Acido ascórbico	1.0 ml.
15. Solución de polisorbato 80	5.0 ml.

Se adiciona cada uno de los componentes en el orden de la lista, se disuelve cuidadosamente la cistina y -- triptófano en el ácido clorhídrico y después se adicionan -- las siguientes sustancias para obtener una solución. Se -- adicionan 100 ml de agua, se mezcla y se agrega luego la -- glucosa, acetato de sodio y el ácido ascórbico. Filtrar si -- es necesario. Se agrega la solución de polisorbato 80 y se -- ajusta el pH entre 5.5 - 6.0 con hidróxido de sodio 1 N. Se -- afora a 250 ml con agua destilada.

#### 4. Solución adenina, guanina, uracilo.

Se disuelven 200 mg de sulfato de adenina, clor-- hidrato de guanina y uracilo en 10 ml de ácido caliente --- (HCl 1:3) se enfría y se lleva a 200 ml con agua destilada. Se deja reposar en refrigeración cubriendo con tolueno.

#### 5. Solución de xantina.

Se suspenden 0.2 g de xantina en 30 o 40 ml de a-- gua, se calienta a unos 70°C, se adicionan 6.0 ml de amoní-- co al 10 %, se agita para disolver, se enfría y se afora a

200 ml con agua destilada. Se deja reposar en el refrigerador cubriendo con tolueno.

6. Solución vitamínica 1.

Se disuelven 10 g de riboflavina, 10 g de clorhidrato tiamina 0.1 g de biotina, 20 mg de ácido nicotínico-en ácido acético.

7. Solución vitamínica 2.

Se disuelven 20 mg de ácido p-amino benzoico, 10 mg de pantotenato de calcio, 40 mg de clorhidrato de piridoxina, 40 mg de clorhidrato de piridoxal, 8 mg de diclorhidrato de piridoxamina y se adicionan 2.0 mg de ácido fólico en alcohol diluido y desnaturalizado (1:4), aforar a 400 ml. Proteger de la luz y guardar en el refrigerador.

8. Solución salina A.

Se disuelven en agua 10 g de fosfato monopotásico y 10 g de fosfato de potasio dibásico, se llevan a 200 ml con agua destilada, se adicionan dos gotas de HCl. Se enfría y se refrigera cubriendo con tolueno.

9. Solución salina B.

Se disuelven 4.0 g de sulfato de magnesio, 0.2 g de cloruro de sodio, 0.2 g de sulfato ferroso y 0.2 g de sulfato de manganeso en agua, aforando a 200 ml. Se agregan 2 gotas de HCl. guardar en el refrigerador cubriendo con tolueno.

10. Solución de asparragina.

Se disuelven 20 g de asparragina en agua y se llevan a 200 ml, se deja reposar en el refrigerador cubriendo con tolueno.

11. Hidrolizado ácido de caseína.

Se mezclan 100 g de caseína exenta de vitaminas -- con 500 ml de ácido clorhídrico (1:2) y se refluja de 8 a 12 horas. Se agita el ácido por destilación hasta obtener una pasta. Se redissuelve la pasta con agua hasta un pH de  $3.5 \pm 0.1$  con hidróxido de sodio y se lleva a un litro con agua destilada. Se adicionan 20 g de carbón activado y se agita por una hora. Se filtra la solución si se enturbia durante el reposo.

15. Polisorbato 80.

Se disuelven 20 g de polisorbato 80 en alcohol, se llevan a 200 ml con el mismo alcohol.

Medio de suspensión del microorganismo.

Se disuelven 0.75 g de levadura, 0.75 g de peptona, 1.0 de glucosa anhidra, 0.2 g de fosfato monopotásico - en 60 o 70 ml de agua, se agregan 10 ml. de jugo de tomate y 1.0 ml. de solución de sorbato 80. Se ajusta el pH de la solución a 6.8 con hidróxido de sodio 1 N y se agrega agua a tener 100 ml. Se coloca el medio en porciones de 10 ml. -



en tubos con tapón y se esteriliza en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos lo más rápidamente posible.

Jugo de tomate.

Se centrifuga el jugo de tomate comercial tanto como sea posible a fin de remover la pulpa, o bien se filtra hasta que el líquido obtenido sea claro y de color pajá.

Medio de suspensión.

Se diluye cuidadosamente un volumen de medio basal con otro igual de agua estéril.

Medio para el inóculo.

A 100 ml. de medio basal se le adicionan 1.0 - 1.5 g de agar. Se calienta la mezcla con agitación hasta que el agar se disuelva, se colocan alrededor de 10 ml del medio en tubos de ensayo, se tapan y se esterilizan en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  15 minutos. Se dejan enfriar los tubos en posición inclinada. Se inoculan tres o más tubos para transferir el cultivo puro de Lactobacillus leichmannii (antes de usarse para valoración se resiembrá diez veces en dos semanas). Se incuban de 6 a 24 horas a una temperatura de 30 a  $40^{\circ}\text{C}$  y finalmente se guardan en el refrigerador. Se preparan frascos de cultivo por lo menos tres veces por semana y no se usan inóculos de más de cuatro días de prepa-

rados. La actividad del microorganismo se puede incrementar resemebrando dos veces el cultivo en el punto donde se define la turbiedad en el líquido inoculado que puede ser obtenido después de tres o cuatro horas.

#### Preparación del inóculo.

Se transfiere el cultivo de Lactobacillus leichmannii a un tubo con 10 ml de medio de cultivo. Se incuba por 6 o 24 horas entre  $30$  o  $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ .

En condiciones asépticas se centrifuga el cultivo y se decanta el líquido sobrenadante, el cultivo se resuspende en 10 ml de medio estéril y se ajusta la transmitancia de 0.5 a 0.75. Se ajusta a 100 % de transmitancia con medio sin cultivo. (16)

#### Calibración del aparato.

El colorímetro se calibra con un medio preparado al mismo tiempo que el utilizado para la prueba, e incubando igualmente, sólo que sin haber sido inoculado, para llevar la transmitancia a 100 %.

#### Método seguido.

Se pulveriza la muestra perfectamente y en el caso de las cianocobalaminas de 1.0 y 0.1 % se extrae la vitamina con mezcla extractiva preparada según se menciona a -- continuación y con el peso de muestra adecuado para cada ca

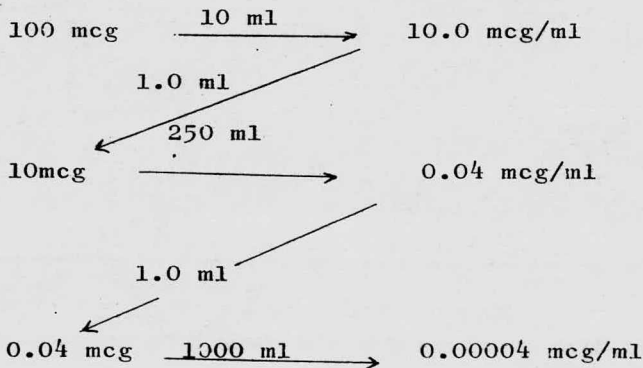
so.

Mezcla extractiva.

Fosfato disódico anhidro	12.9 g.
Acido cítrico	11.0 g.
Bisulfito de sodio	10.0 g.
Agua. (aforar y disolver)	1.0 l

Peso de muestras. Tanto en el estándar como en -- las muestras se llega a una dilución final de  $0.00004$  mcg/ml.

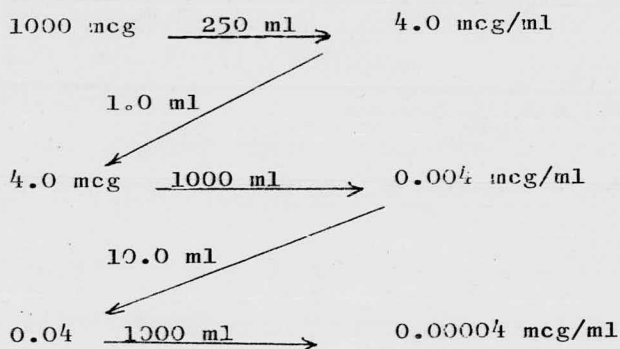
Estándar. En el caso del estándar se pesaron 14.8 mg que corresponden a 100 mcg, de acuerdo a la concentra--- ción especificada en la etiqueta, efectuándose las siguien--- tes diluciones:



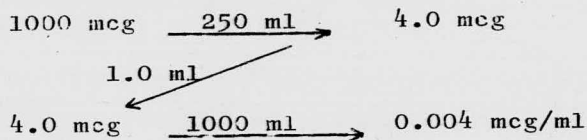
La primera dilución se efectuó con etanol al 25%, las siguientes con agua destilada.

Cianocobalamina 1.0 %.

Peso de muestra 100 mg = 1000 mcg.

Cianocobalamina 0.1 %

Peso de muestra 1.0 g = 1000 mcg



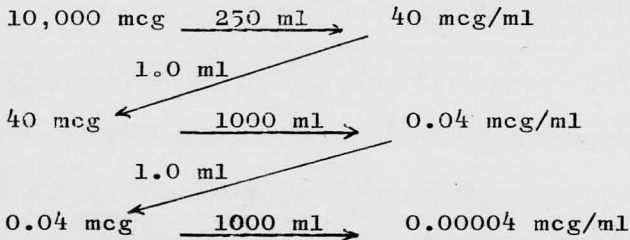
Se toman 10 ml de la concentración de 0.004 mcg/ml lo que da un total de 0.04 mcg  $\xrightarrow{1000 \text{ ml}}$  0.00004 mcg/ml.

En estas dos muestras la extracción se efectúa en la primera dilución, colocando la muestra y 25 ml de mezcla extractiva, agitando mecánicamente por 15 minutos y finalmente llevando al aforo con agua destilada al igual que el resto de las diluciones.

Cianocobalamina 100 %.

En este caso se pesan 10 mg los cuales se disuelven en etanol al 25% y el resto de las diluciones con agua destilada, de acuerdo a lo siguiente:

Peso de muestra 10 mg = 10,000 mcg.



Con estas diluciones se procede a montar las ---- pruebas preparadas a 10 diferentes concentraciones en el caso del estándar y 5 en el caso del problema. Todas las concentraciones se montaron por duplicado para una mayor confiabilidad. Los estándares se montaron de acuerdo al cuadro número 1, y las muestras de acuerdo al cuadro número 2

Cuadro Núm. 1

## SISTEMA PARA ESTANDAR

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ml. estd.	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0	3.0	3.5	4.0	4.5
ml. agua	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5
ml. medio	5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
conc/tubo mmcg	0	.02	.04	.06	.08	.10	.12	.14	.16	.18

Cuadro Núm. 2.

## SISTEMA PARA PROBLEMAS

Tubo	1	2	3	4	5
ml. probl	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0
ml. agua	4.0	3.0	2.5	2.0	1.0
ml. medio	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
conc/tubo mmcg.	0.04	0.08	0.10	0.12	0.16 (teórica).

Todos los tubos preparados así se esterilizan a - 121°C en autoclave 5 minutos. Una vez que los tubos se han enfriado se inoculan asépticamente y se incuban (incluyendo blancos que se preparan con 5 ml de medio y 5 ml de agua) a una temperatura de 37°C por espacio de 6 a 24 horas, según el crecimiento.

Se leé la transmitancia de cada uno de los tubos para efectuar una gráfica en papel logarítmico usando porcentaje de transmitancia y concentraciones, en el caso del estándar.

Con la gráfica del estándar se obtienen las concentraciones reales de los problemas que al ser divididas entre las concentraciones teóricas y multiplicadas por 100 nos dan la pureza en por ciento de cada una de las materias primas.

R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos de las muestras analizadas por cada uno de los métodos mencionados se presentan a continuación en las tablas 3, 4 y 5.

Como la realización de los análisis fueron hechas en un laboratorio farmacéutico, se diferencian por número de nota de entrada.



CUADRO NUM. 3

Resultados obtenidos en cianocobalamina 100%.

Núm. de nota	M E T O D O S	
	Microbiológico	Espectrofotométrico
26094	98.45 %	99.40 %
27877	97.35 %	96.45 %
28141	99.71 %	98.24 %
29590	97.36 %	96.80 %
30209	98.25 %	98.28 %
30286	98.39 %	96.96 %
30671	95.10 %	93.33 %
30971	96.24 %	92.66 %
31347 ,	94.41 %	95.03 %
32199	98.52 %	100.33 %



CUADRO NUM. 4

Resultados obtenidos en cianocobalamina 1.0%

M E T O D O S

Núm. de Nota	Microbiológico	Espectrofotométrico
26291	100.00 %	101.36 %
26508	101.75 %	101.28 %
28113	100.00 %	100.96 %
29511	100.00 %	102.25 %
29998	100.17 %	101.98 %
30324	106.25 %	102.36 %
30407	107.50 %	103.26 %
31412	101.50 %	101.42 %
32244	105.12 %	104.82 %

CUADRO NUM. 5

Resultados obtenidos en cianocobalamina 0.1%

M E T O D O S

Núm. de nota	Microbiológico	Espectrofotométrico
29702	100.00 %	101.25 %
29869	100.00 %	100.72 %
30316	107.50 %	103.42 %
31633	104.00 %	103.26 %
32004	100.38 %	102.51 %

ESTUDIO ESTADISTICO

Para tener una mejor interpretación de los resultados, se efectuó un estudio estadístico sobre los datos obtenidos por ambos métodos.

El análisis de varianza es de dos variables de -- clasificación de medidas respectivas, es decir, se busca la diferencia entre las variables. Una variable fué el método--seguido, es decir, espectrofotométrico o microbiológico. La otra es la concentración de las muestras, si están al 100%, 1.0%, o al 0.1%.

Se partió de la hipótesis de que no hay diferen--cia significativa entre el método espectrofotométrico y el microbiológico.

Las siguientes tablas dan a conocer los resulta--dos del análisis de varianza.

Observando estas tablas se notará que el valor de  $F$  obtenido en tablas para un nivel de significación de 5% - es de  $F_{95} (1.5) = 6.61$ . Siendo la razón de  $F$  de 0.0002477, - por lo que no es significativa para un nivel de 5%, aceptando la hipótesis de no existir diferencia alguna entre los - dos métodos. (7)

TABLA NUMERO 1

	Total del % M E T O D O Microbiológico	Total del % S Espectrofotométrico	Suma de los Totales filas
Muestra 100 %	973.78	968.38	1942.16
Muestra 1.0 %	922.29	919.69	1841.98
Muestra 0.1 %	511.88	511.16	1023.04
Sumas totales columnas	2407.95	2399.23	4807.13

TABLA NUMERO 2

	SUMA DE CUADRADOS.	gl	CUADRADO MEDIO	RAZON F.
Medios	12.6	1	12.6	$F = \frac{12.6}{50850.44} = 0.0002477$
Dentro de grupos	254252.2	5	50850.44	$F_{.95} (1.5) = 6.61$
Total	254264.8	6		

## V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la valoración de la vitamina B<sub>12</sub> y de que en su estudio estadístico se observa que no hay diferencia entre los dos métodos, se infieren las siguientes observaciones.

Los resultados de los dos métodos son reproducibles. La variación entre ellos es poco representativa. En ambos métodos es necesaria la presencia de aparatos de precisión ya que se requiere de un espectrofotómetro y de un colorímetro. En los dos se necesita efectuar el análisis refiriendo a una cianocobalamina estándar.

La única diferencia en ellos para análisis de vitamina B<sub>12</sub> como materia prima es el tiempo requerido para llevarlo a cabo, ya que la diferencia entre uno y otro es de dos días, que es significativo en la obtención de un resultado. Lo más conveniente para el análisis de esta vitamina es utilizar ambos métodos y sólo cuando se requieran resultados inmediatos se haría uso exclusivo del método espectrofotométrico.

Con la utilización de los dos métodos serán los resultados altamente confiables.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Berg, T. M. et al.  
Comparative Studies on the Microbiological Vitamin B<sub>12</sub>.  
Assay at two Laboratories.  
Applied and Environmental Microbiology.  
31, 459 (1976)
- 2.- Goth, A.  
Tratado de Farmacología. 5a. ed.  
Editorial Interamericana.  
México (1976)
- 3.- Burton, T. Benjamin.  
Human Nutrition. 3a. ed.  
MacGraw Hill Book Company  
New York (1976)
- 4.- Bichanan, R. R., Gibbon, N. E.  
Gram Positive, Asporogenous, Rod-Shaped Bacteria.  
Bergey's Manual of Determinativa Bacteriology.  
Williams & Wilkins Company. 8a. ed.  
Baltimore (1974).
- 5.- Collins, C.H.  
Progress in Microbiological Techniques  
Butterworths.  
London (1969).
- 6.- Conn, E., Stumpf P.K.  
Bioquímica Fundamental. 2a. ed.  
Editorial Limusa Wiley.  
México (1969)
- 7.- Dixon, J. W., Massey, J. F.  
Introducción al Análisis Estadístico.  
McGraw-Hill.  
México (1970).
- 8.- Fruton, S. J., Simmonds, S.  
General Biochemistry. 2a. ed.  
Wiley International Edition.  
London (1963).



- 9.- Harper, A. H.  
Manual de Química Fisiológica.  
El Manual Moderno.  
México (1971).
- 10.- Lehninger, L. A.  
Bioquímica.  
Editorial Omega.  
Barcelona (1972).
- 11.- Kirk, R. E., Othmer, D. F.  
Enciclopedia Tecnológica Química.  
U.T.H.E.A.  
México (1965).
- 12.- Martínez, C. J. L.  
Vitaminas y Coenzimas. Su importancia en el metabolismo  
y su derivación en la industria farmacéutica.  
Biosíntesis y mecanismos de acción. (tesis)  
México (1975)
- 13.- Rainbow, C. And Rose, A. H.  
Biochemistry of Industrial Microorganisms.  
Academic Press. Inc.  
London and New York. (1963).
- 14.- Serrel, W. H., Harris, J., Robert, S.  
The Vitamins, vol. I.  
Academic Press. Inc. Publishers.  
New York. (1954).i
- 15.- Strohcker, R., Henning, M. H.  
Análisis de Vitaminas.  
Editorial Paz Montalvo.  
Madrid (1967).
- 16.- United States Pharmacopeia. 19a. ed.  
Mck Printing Company.  
Easton, Pa. (1975).
- 17.- West, E. S., Todd W. R., Mason, H. S.  
Bioquímica Médica. 4a. ed.  
Editorial Interamericana.  
México (1969).