

1
24
UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

**FACULTAD DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

universidad
femenina
de
mexico


**ESTUDIO COMPARATIVO DE METODO MICRO-
BIOLOGICO Y METODO QUIMICO, PARA LA
VALORACION DE VITAMINA B-12, EN PREPARA-
CIONES FARMACEUTICAS.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A**

ELENA VERGARA CALZONCIN

MEXICO, D. F.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	pág.
OBJETIVO	1
INTRODUCCION	3
GENERALIDADES	
I.- FORMULA ESTRUCTURAL Y ORIGEN DE LA VITAMINA B-12.	8
II.- TERMINOLOGIA DE LA VITAMINA B-12.	12
III.- ACCION FARMACOLOGICA DE LA VITAMINA B-12.	14
IV.- MECANISMO DE ACCION DE LA VITAMINA B-12.	17
V.- ABSORCION, DESTINO Y EXCRECION DE LA VITAMINA B-12.	
a) Absorción	21
b) Distribución y destino.	22
c) Excreción.	24
VI.- INTOXICACION CON VITAMINA B-12.	25
PARTE EXPERIMENTAL	
INTRODUCCION	26
I.- METODOS A PROBAR:	
1.- Método Químico.	28
2.- Método Microbiológico: Método "De Placa" o de Difusión en Agar.	29

3.- Método Microbiológico: Por Turbidimetría	29
--	----

II.- METODOLOGIA A SEGUIR:

1.- DETERMINACION DE LA CONFIABILIDAD DE LOS TRES METODOS:	
a) Método Químico.	31
b) Método Microbiológico: Método "De Placa" o de Difusión en Agar.	33
c) Método Microbiológico: Por Turbidimetría.	35

2.- APLICACION DE CADA UNO DE LOS METODOS EN DIFERENTES FORMAS FARMACEUTICAS.	
a) Método Químico.	38
b) Método Microbiológico: Método "De Placa" o de Difusión en Agar.	43
c) Método Microbiológico: Por Turbidimetría.	45

III.- FORMAS FARMACEUTICAS SELECCIONADAS.	48
IV.- INTERPRETACION DE RESULTADOS.	50
V.- RESULTADOS.	66
VI.- CONCLUSIONES.	68
VII.- BIBLIOGRAFIA.	77

OBJETIVO

En la actualidad existe una gran producción de preparados polivitamínicos, en donde uno de los componentes que los constituyen es la vitamina B-12 en sus diferentes formas (cianocobalamina, hidroxocobalamina y acuocobalamina), la cual se encuentra en mínimas concentraciones; por consiguiente, el objetivo que se persigue en la elaboración de esta tesis, es encontrar el método idóneo que nos indique en forma específica cuál es el contenido de esta vitamina en un preparado polivitamínico.

En muchos laboratorios, este tipo de valoraciones es un problema que aún no ha sido resuelto, por lo que en el presente trabajo, trataremos de determinar cuál método es el más adecuado. Los métodos a elección son: Método Químico, Método Microbiológico de Difusión en Agar conocido también como Método Cilindro-Placa, y Método Microbiológico por Turbidimetría; en donde después de saber los resultados de las diferentes determinaciones, se podrá establecer una comparación entre ellos, y así saber cuál es el método más preciso, exacto, económico y fácil de elaborar; y que por lo consiguiente los

diferentes Laboratorios de Control Analítico lo puedan aplicar.

INTRODUCCION

La historia^f de la vitamina B-12 (cianocobalamina) está llena de investigaciones muy diversas, realizadas en los campos de las enfermedades humanas por carencia de esta vitamina, la nutrición animal y la microbiología, pero estas investigaciones convergieron finalmente en la identificación de la vitamina esencial para el metabolismo celular. La historia comienza con la descripción de Addison, en 1849 y 1855, de lo que sus contemporáneos reconocían como anemia perniciosa y que él señaló de modo correcto como "algún trastorno de los órganos de la digestión y de la asimilación".

El descubrimiento^f (1926) de la acción terapéutica del hígado en la anemia perniciosa, que le valió a Minot el premio Nobel, fué seguido por la demostración de Castle (1927) de que el jugo gástrico humano normal contenía un "factor intrínseco" que, combinado con un "factor extrínseco" contenido en las proteínas animales, promueve la absorción del "principio antianemia perniciosa". Al aislarse la vitamina B-12, veinte años después, Berk y colaboradores (1948) demostraron que esta vitamina era a la vez "factor extrínseco" y "principio antianemia perniciosa".

Se encontró^f que los extractos de hígado más purificados usados por Wills consistían en una solución pura de vitamina B-12 y que el "factor de Wills" era el ácido fólico, obtenido de hígado en proceso de purificación. Sin embargo, este conocimiento se adquirió sólo de manera gradual después de la purificación del ácido pteroil glutámico en 1943 por Stokstad, su cristalización en el extracto hepático por Pfiffner y colaboradores (1943), - su síntesis por Angier y colaboradores en 1945, quienes también determinaron su estructura (1946), y el aislamiento en 1948 de la vitamina B-12 cristalina a partir de los concentrados hepáticos por Rickes y colaboradores en el grupo de Folkers en Estados Unidos de Norteamérica, y casi simultáneamente por Smith y Parker en Inglaterra. Los investigadores norteamericanos encontraron una gran ayuda en una prueba microbiológica basada en el descubrimiento de Shorb de que el *Lactobacillus lactis* necesitaba un factor de crecimiento (factor LLD), - que más tarde se demostró que era la vitamina B-12 -el factor proteico necesario para el crecimiento y funcionamiento adecuado de los animales alimentados con una dieta totalmente vegetal- que existía en los extractos hepáticos en cantidades cuya potencia era semejante en el tratamiento de la anemia perniciosa. Basándose^g en la

eficiencia de la administración de hígado fresco por vía oral en el tratamiento de la anemia perniciosa, se hicieron trabajos para aislar el factor o principio antianémico responsable de dicha acción, resultando ser la vitamina B-12 o cianocobalamina, del grupo de las cobalaminas.

El hecho¹ de que el principio antianémico presente en el hígado es un factor de crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus* y que ambas actividades son semejantes, dió lugar a un método de valoración biológica sencillo y práctico, que permitió llegar al aislamiento de un compuesto cristalino denominado vitamina B-12, a partir de extractos de hígado, substancia que se reveló como la más activa contra la anemia perniciosa. El contenido en el hígado de dicha vitamina B-12, que forma parte del complejo B de vitaminas hidrosolubles, es muy escaso y actualmente aquella se extrae especialmente de cultivos de *Streptomyces griseus*, el mismo microorganismo productor de la estreptomycinina, constituyendo el producto comercial de vitamina B-12 un residuo de la fabricación de aquel antibiótico.

Ahora bien,² se sabe que la vitamina B-12 corresponde a una serie de substancias denominadas cobalaminas, que poseen cobalto en su molécula aproximadamente en prop

porción de 4%. A su vez, las cobalaminas derivan de una sustancia fundamental, la cobamida, que consta de un núcleo central denominado corrina con 4 anillos pirrólicos con cadenas laterales amídicas y que contiene el cobalto trivalente; el mismo está unido a través de una cadena de aminopropanol y fosfato a la D-ribosa. Para formar la vitamina B-12, la cobamida se une al dimetilbenzimidazol dando lugar a las cobalaminas. La vitamina B-12 o propiamente dicho, la cianocobalamina (Cytamen) posee un grupo cianuro unido al cobalto, mientras que la vitamina B-12a -semisintética- es la hidroxocobalamina (Neo-Cytamen), que a diferencia de la anterior, ésta posee un grupo hidroxilo en vez de cianuro; ambas poseen la misma actividad hematopoyética.

La molécula¹ de la vitamina B-12 se asemeja en cierto modo a la de la hemoglobina -estructura de porfirina-, pero en vez de poseer hierro tiene cobalto en el interior de la misma; como puede observarse dicho metal está unido por 4 enlaces covalentes coordinados a tres nitrógenos pirrólicos y al dimetilbenzimidazol y por dos enlaces con un nitrógeno pirrólico y al grupo cianuro o hidroxilo, quedando una carga positiva iónica neutralizada por la carga negativa del oxígeno del grupo fosfato. Las vitaminas B-12 son termostables, sobre todo la cianocobalamina, y resisten las temperaturas habituales del autoclave.

La cianocobalamina y la hidroxocobalamina son sustancias puras cristalinas, por lo que no existe unidad-internacional, aunque se cuenta con un preparado patrón internacional; el resultado de la valoración se indica en microgramos.

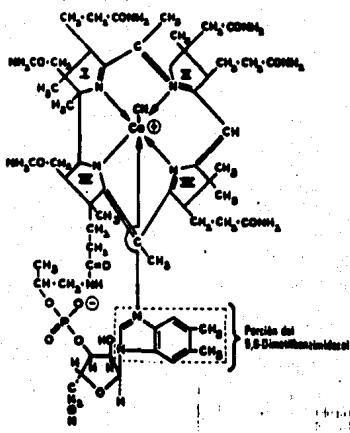
Las citadas sustancias se valoran actualmente por métodos fisicoquímicos y microbiológicos.

- 1) EL METODO FISICOQUIMICO se basa en la medición de la absorbancia en la zona visible en un espectrofotómetro adecuado. La vitamina B-12 es intensamente roja y presenta máximos a una longitud de onda de 361 nm; es un método muy exacto para la droga pura y es el oficial para la F.N.A., U.S.P., Ph.I. y Ph.F.
- 2) EL METODO MICROBIOLOGICO, también oficial para la U.S.P., se basa en el crecimiento que provoca la vitamina B-12 del *Lactobacillus leichmannii*, que se mide por turbidimetría en comparación con el crecimiento que presenta un preparado estándar internacional de cianocobalamina, expresándose el resultado en microgramos de la misma. Este procedimiento puede ser empleado en preparados impuros de vitamina B-12 o de mezclas de vitamina B-12 con otros preparados multivitamínicos-.

GENERALIDADES

I.- FORMULA ESTRUCTURAL Y ORIGEN DE LA VITAMINA B-12.

La fórmula estructural^s, aclarada por Hodgkin y colaboradores, trabajo por el cual se concedió a Dorothy M. Hodgkin el premio Nobel de química en 1964, se muestra en la siguiente figura:



Las dos partes principales de la molécula son el grupo planar (núcleo de corrina), y un "nucleótido" que

se encuentra en un plano casi en ángulo recto con el núcleo corrínico y enlazado con él mediante el D-1-amino-2-propanol, que está esterificado en el "nucleótido" y unido por enlace amídico con el núcleo de corrina. El "nucleótido" está constituido por el 5,6-dimetil-benzimidazol básico unido a la ribosa por un enlace alfa-glucosídico, distinto del enlace beta de los ácidos nucleicos. Un segundo puente entre las dos partes principales de la molécula es el enlace coordinado del átomo de cobalto con uno de los átomos del nitrógeno del benzimidazol. El grupo aniónico en el enlace coordinado con el átomo de cobalto es el cianuro. (El cianuro existía en la vitamina B-12 aislado originalmente porque provenía de las columnas de carbón activo usadas en el aislamiento y reemplazaba al grupo aniónico 5'-desoxiadenosilo que existe normalmente en el hígado, del que se aisló la vitamina.). Este grupo³ cianuro puede ser reemplazado sin pérdida de actividad biológica por otros substituyentes diversos: Un grupo hidroxilo dando hidroxocobalamina; y una substitución con 5'-desoxiadenosilo formando coenzima B-12 (o cobamida) que se encuentra en las más altas concentraciones de las 3 cobamidas.

En el organismo⁴, las vitaminas B-12 -cianocobalamina e hidroxocobalamina- se transforman en 5'-desoxiadenosilcobalamina denominada coenzima B-12 -unión de la deca

riadenosina con el cobalto-, y en metilcobalamina, también una coenzima B-12; estas dos coenzimas se encuentran en la sangre y en el hígado.

La fuente última de la vitamina B-12 es la síntesis por los microorganismos y sólo se encuentra en los alimentos de origen animal. El hígado, los riñones y las ostras tienen el contenido más alto; el músculo, el pescado y algunos quesos contienen cantidades moderadas. No existe en los productos vegetales excepto cuando contienen bacterias simbióticas (como en el caso de las leguminosas). La vitamina B-12 de las fuentes alimentarias está usualmente unida a las proteínas y péptidos que son removidos antes de la recombinación de la vitamina B-12 con el factor intrínseco en el intestino antes de la absorción. La vitamina B-12, que existe comercialmente se prepara por fermentación usando *Streptomyces griseus*.

La cianocobalamina cristaliza en nódulos o prismas de color rojo oscuro; el color se debe al complejo cobalto porfirínico. El cobalto enlazado es más covalente que iónico. La cianocobalamina absorbe agua; el producto oficial de la U.S.P., contiene de 10 a 12% de humedad absorbida. Su actividad es destruida por los metales pesados y los agentes oxidantes o reductores poderosos, pero no es afectada por la acción de la esterilización en autoclave en período corto a 121°C. Es soluble 1:80

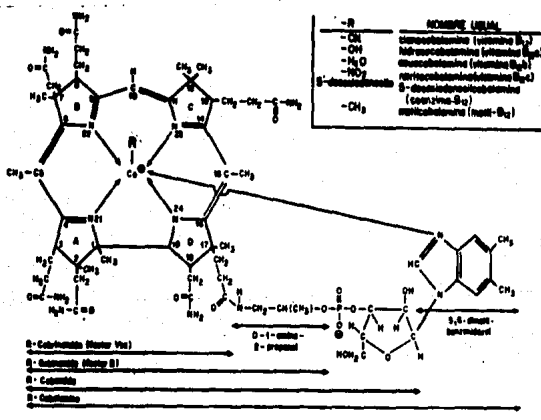
en agua y es estable en solución. Las soluciones acuosas son neutras. Su estabilidad máxima está en pH de - 4.5 a 5.

La coenzima B-12 difiere de la cianocobalamina en que, en vez del grupo aniónico CN unido al cobalto, el que se encuentra ligado es la 5'-desoxiadenosina (sin el OH del carbono 5 de la ribosa). Las coenzimas de la vitamina B-12 son muy inestables a la luz. La coenzima, B-12, en contacto con el oxígeno y expuesta a la luz, experimenta fotólisis con formación de acuocobalamina. El cianuro de potasio convierte la coenzima B-12 en cianocobalamina.

II.- TERMINOLOGIA DE LA VITAMINA B-12

Los nombres permitidos (semisistemáticos) son más o menos incómodos y se emplean más que los nombres sistemáticos aprobados para emplearse en el campo de la vitamina B-12 por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica, de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

La nomenclatura del campo de la vitamina B-12 se indica en la siguiente figura:



Omitiendo el No. 20, se ha hecho que el sistema de numeración del núcleo corrinico corresponda con el núcleo porfirinico. El núcleo corrinico está situado en el plano de la hoja. Por encima de este plano está el grupo R; el resto de la molécula está por debajo.

El nombre sistemático de la vitamina B-12 es cianuro de alfa-(5,6-dimetilbencimidazolil)cobamida. El término permitido cobalamina se usa para designar la molécula de vitamina B-12 menos el grupo cianuro, y es prefijado por el nombre del grupo aniónico R unido al cobalto.

La coenzima B-12 es solamente una de las coenzimas de la vitamina B-12. Los términos coenzima B-12 y coenzima de la vitamina B-12 no son intercambiables, pues el primero se refiere exclusivamente a la 5'-desoxiadenosilcobalamina (coenzima DBC) y el segundo se aplica a cualquiera de las formas coenzimáticas.

Hay una familia entera de cobalaminas naturales y semisintéticas, según el grupo que reemplace al CN. La vitamina B-12b es acuocobalamina, pues la molécula CN ha sido substituida por agua; la vitamina B-12a (hidroxocobalamina) es la forma anhidra de la vitamina B-12b. Ambas se convierten en vitamina B-12 por tratamiento con cianuro. Otras cobalaminas son la dicianocobalamina, la tiocianatocobalamina, la clorocobalamina, y la sulfitocobalamina.

III.- ACCION FARMACOLOGICA DE LA VITAMINA B-12.

La vitamina B-12 posee una acción marcadamente benéfica, en las anemias macrocíticas o megaloblásticas - debidas a deficiencia de vitamina B-12, en especial en la anemia perniciosa, y no actuando en otra clase de anemias.

La intensidad de los efectos hemáticos depende de la dosis de vitamina B-12 utilizada y también de la gravedad de la anemia; con dosis óptimas, la altura del pico reticulocitario y la velocidad de aumento de eritrocitos son inversamente proporcionales al número inicial de los mismos, siendo tanto mayores cuando más grave es la anemia.

FACTOR EXTRINSECO Y FACTOR INTRINSECO. Se demostró que al administrar por medio de sonda gástrica, el contenido gástrico de una persona normal que había ingerido carne, a un paciente afectado de anemia perniciosa, era capaz de actuar sobre la eritropoyesis en forma similar a la administración de hígado; como lo mismo sucedía cuando el alimento era incubado in vitro con jugo gástrico humano, se postuló entonces la existencia de un factor extrínseco en los alimentos y un factor intrínseco del ju

go gástrico, que unidos originan el principio antianémico activo. El factor extrínseco existe especialmente, - como lo demuestran los experimentos de incubación, en - la carne (músculo), vísceras, huevo, y se ha visto que es idéntico a la vitamina B-12. El factor intrínseco existe en el jugo gástrico normal y no en los enfermos con anemia perniciosa; los experimentos de incubación también demuestran que no es ácido clorhídrico ni ninguna de las enzimas gástricas conocidas, y que se forma especialmente en las zonas fúndica y cardíaca de la mucosa gástrica. Su naturaleza química no ha sido exactamente determinada, pero se sabe que se trata de una glucoproteína, de peso molecular de alrededor de 70 000. El factor intrínseco actúa facilitando la absorción de la vitamina B-12 en el tracto gastrointestinal, formando un complejo químico con ella.

MODO DE ACCION. La vitamina B-12 (cobalamina) actúa en las anemias macrocíticas aportando el principio antianémico o hematínico necesario para una hemotopoyesis normal. Tal como sucede para el caso del hierro, la vitamina B-12 no es un estimulante de la eritropoyesis, como lo demuestra el hecho de no actuar en otra clase de anemias, como las microcíticas y las normocíticas; por el contrario, se ha comprobado que en la anemia perniciosa,

la médula ósea hiperplásica, por acción de la vitamina-B-12, vuelve a su estado normal. En este caso favorece la maduración de las células primitivas de la médula ósea y las hace seguir la serie normal, normoblástica, de dicho desarrollo; también constituye un factor necesario para un trofismo conveniente del sistema nervioso y células epiteliales.

IV.- MECANISMO DE ACCION DE LA VITAMINA B-12.

En las anemias¹ megaloblásticas, existe un trastorno del metabolismo del ácido desoxirribonucleico, necesario para una correcta hematopoyesis -y crecimiento de las - células epiteliales-; ahora bien, dicho defecto en la - síntesis de este ácido existe tanto en las anemias pro- ducidas por deficiencia de vitamina B-12 como en las de- bidas a la deficiencia de ácido fólico y por otra parte, este último es capaz de convertir una médula ósea megaloblástica, en normoblástica, en los casos de anemia per- niciosa y otras anemias megaloblásticas, pero no es ca- paz de mejorar las lesiones neurológicas de la primera, pudiendo por el contrario agravarlas. Existe por lo tan- to, una interrelación entre vitamina B-12 y folato en - sus acciones sobre la médula ósea.

De acuerdo con Herbert, la vitamina B-12 no actúa directamente sobre la médula ósea sino a través del áci- do fólico, en el sentido de que una deficiencia de la - primera lleva a un trastorno del metabolismo del segundo, que es la causa de la anemia megaloblástica.

Para entender bien las relaciones entre vitamina - B-12 y el folato, es necesario citar los procesos meta-

bólicos en que la vitamina B-12 interviene, por intermedio de sus coenzimas. Dos son los procesos, uno correspondiente al metabolismo proteico -aminoácidos- y el segundo al metabolismo lípido -ácidos grasos-.

El primero se refiere a la transformación de la homocisteína en metionina producida por la enzima metiltransferasa siendo la coenzima correspondiente la metilcobalamina; en esta reacción, esta última cede un grupo metilo, pero el mismo procede del metiltetrahidrofolato. Ahora bien, como la metionina existe en los alimentos y cualquier dieta la contiene en cantidades adecuadas, esta reacción no tiene como finalidad principal sintetizar dicho aminoácido sino regenerar continuamente el tetrahidrofolato, substancia indispensable para la síntesis de las purinas y pirimidinas, partes esenciales del ácido desoxirribonucleico.

El segundo proceso metabólico en que interviene la vitamina B-12 es la transformación (isomerización) de la metilmalonilcoenzima A en succinilcoenzima A producido por la enzima metilmalonilcoenzima A-mutasa, con intervención de la coenzima de la vitamina B-12 o desoxidocobalamina; en esta reacción no interviene ningún derivado del ácido fólico. La importancia de esta reacción reside en que normalmente, la metilmalonilcoenzima A procede de la propionilcoenzima A que es el metabolito-

principal de la degradación de los ácidos grasos con número impar de carbonos -los que tienen número par dan lugar a la acetilcoenzima A-; la formación de la succinilcoenzima A con intervención de la vitamina B-12 hace posible la metabolización de los citados ácidos grasos a través del ciclo tricarboxílico de Krebs, ya sea a su oxidación final o bien en la síntesis de ácidos grasos.

La deficiencia de la vitamina B-12, al no usarse el grupo metilo del metiltetrahidrofolato, impide la formación del tetrahidrofolato a partir del primero que se acumula en el organismo -ya que la reacción que transforma el metilenotetrahidrofolato en metiltetrahidrofolato es irreversible y este último se sigue formando- y queda "atrapado". Al haber deficiencia de tetrahidrofolato en estos casos de deficiencia de vitamina B-12 -al igual que en la carencia primitiva de folato-, no se forman los derivados del ácido fólico indispensables para la síntesis de las purinas y pirimidinas, y por lo tanto del ácido-desoxirribonucleico, necesario para una correcta eritropoyesis y desarrollo de las células epiteliales. Esta hipótesis se basa en que:

- a) El metilfolato se acumula en la sangre y en los tejidos cuando existe deficiencia de vitamina B-12.
- b) El metilfolato es incapaz de mejorar la síntesis del

ácido desoxirribonucleico en la médula ósea humana - en los casos de deficiencia de vitamina B-12, y en cambio sí lo hace el ácido fólico.

- c) Si se inyecta metiltetrahidrofolato radiactivo en pacientes con deficiencia de vitamina B-12, desaparece muy lentamente, lo que se corrige por la administración de vitamina B-12.

V.- ABSORCION, DESTINO Y EXCRECION DE LA VITAMINA B-12.

a) ABSORCION.

La cianocobalamina⁴ y la hidroxocobalamina se absorben fácilmente cuando se administran por vía intramuscular y subcutánea, y cuando se suministran en esta forma en personas normales o afectadas de anemia perniciosa, la concentración sanguínea se eleva llegando al máximo en 4 a 5 horas y declinando en el transcurso de 72 horas. Con la hidroxocobalamina se obtienen niveles sanguíneos mucho más altos y sostenidos que con la cianocobalamina, lo que se debe a una absorción más lenta que la primera de esas substancias, lo cual obedece a una combinación más estable de la misma con las proteínas del organismo.

Cuando se administra por vía oral, la absorción de la cianocobalamina e hidroxocobalamina se produce solamente en los individuos normales; ya que para que ella ocurra en el intestino, es necesaria la presencia del factor intrínseco gástrico que, al combinarse con la vitamina B-12 permite su absorción, que se realiza principalmente a nivel de íleon y en pequeño grado en el yeyuno y el colon.

Dicha absorción intestinal se realiza en varias etapas:

- a) Combinación entre la cobalamina y el factor intrínseco (glucoproteína) formando un complejo.
- b) Unión de dicho complejo a un "receptor" de la membrana celular del epitelio intestinal.
- c) Desdoblamiento del complejo y liberación de la vitamina B-12 con entrada de la misma en la célula epitelial ilial.
- d) Pasaje de la vitamina B-12 a la sangre.

Las cobalaminas se absorben también por otras mucosas como la nasal o por vía inhalatoria (aerosoles), pero no son vías prácticamente convenientes.

b) DISTRIBUCION Y DESTINO.

Una vez absorbida, la vitamina B-12 pasa al plasma sanguíneo, y su nivel, normalmente se encuentra entre 20 a 100 nanogramos (ng) por 100 ml, siendo mucho menor en la anemia perniciosa (deficiencia de vitamina B-12)- en la que presenta cifras entre 1 a 10 nanogramos por 100 ml, se logra elevar llegando a valores normales en este último caso, cuando se administra dicha vitamina en dosis convenientes. En el plasma se encuentra en su mayor parte combinada con las globulinas, alfa 1-globuli

na o transcobalamina I y sobre todo con la beta-globulina o transcobalamina II.

La transcobalamina II es la que sirve especialmente como transportadora de la vitamina B-12 a los tejidos y desaparece rápidamente de la sangre después de la absorción de la misma, mientras que la transcobalamina I continúa circulando y sirve de depósito para dicha vitamina. En el plasma sanguíneo se encuentra especialmente - la metilcobalamina (coenzima de la vitamina B-12), en menor cantidad de hidroxocobalamina, la desoxiadenosilcobalamina (coenzima B-12), y en cantidades aún menores la cianocobalamina. Cuando se administra vitamina B-12 con los alimentos o por vía intramuscular, o por vía subcutánea, la cianocobalamina es la que se encuentra en mayores cantidades en la sangre, que la hidroxocobalamina.

Las cobalaminas se almacenan en diversos órganos - viscerales, pero especialmente en el hígado, del 60 a un 90%, lo que explica la actividad de los preparados hepáticos en la anemia perniciosa; en el hígado, en el epitelio intestinal y demás órganos, las cobalaminas, tanto la cianocobalamina como la hidroxocobalamina se transforman en las coenzimas metilcobalamina y 5'-desoxiadenosilcobalamina. La vitamina B-12 (cianocobalamina o hidroxocobalamina) y coenzimas pasan, desde luego, a la médula

la ósea donde se utilizan para regular la eritropoyesis. La acumulación hepática es mayor y más prolongada con la hidroxocobalamina que con la cianocobalamina, y en todos los casos en el hígado existe sobre todo coenzima B-12, hidroxocobalamina y algo de metilcobalamina.

c) EXCRECION.

La vitamina B-12¹ se excreta principalmente por el riñón en forma libre, ocurriendo la máxima eliminación dentro de 24 horas, de haber sido administrada la vitamina B-12, sólo una parte de la dosis recibida es excretada, debido al almacenamiento en el organismo. La fracción excretada está en relación con la dosis administrada, siendo de un 10 a 25% con 50 µg de cianocobalamina suministrada por vía intramuscular y de 80 a 89% con 1 000 µg, la eliminación se efectúa en 72 horas; si se suministra esta última dosis y por la misma vía, hidroxocobalamina, la excreción urinaria en 72 horas es de 54 a 63%. Los experimentos efectuados con los métodos de eliminación o excreción, demuestran que la vitamina B-12 se excreta en la bilis y se vuelve a absorber en el intestino -circulación enterohepática-.

El almacenamiento de la vitamina B-12 permite el mantenimiento de pacientes de anemia perniciosa con una inyección administrada cada 4 a 6 meses.

VI.- INTOXICACION CON VITAMINA B-12.

La cianocobalamina y la hidroxocobalamina carecen de toxicidad y no se ha descrito la hipervitaminosis - B-12 ni reacciones adversas con su uso. Por lo tanto, - debido a su relativo bajo costo y a la ausencia de efectos tóxicos, es extensamente usada como placebo y como "tónico". Esta práctica se debe deplorar. La administración se debe concretar a los casos de deficiencia comprobada y, puesto que la terapéutica de restitución usualmente se requiere para toda la vida, se debe hacer una investigación completa del caso, para prescribirla solamente cuando sea necesario.

PARTE EXPERIMENTAL

INTRODUCCION

La concentración de la vitamina B-12 contenida en un preparado polivitamínico, puede ser valorada por medio de diferentes métodos como lo son los métodos fisicoquímicos y los microbiológicos.

La valoración de la vitamina B-12 por medio de métodos fisicoquímicos, presenta mucha dificultad, ya que esta vitamina se encuentra en concentraciones muy bajas, en comparación con otras vitaminas que la acompañan, para la formación de un determinado preparado polivitamínico. Esta valoración puede llevarse a cabo sin dificultad cuando se obtienen concentraciones adecuadas de vitamina B-12; la valoración puede lograrse por medio de extracciones para concentrar la vitamina B-12, la cual después se purifica y se procede a determinar su absorbancia a una determinada longitud de onda.

Otras formas para valorar la vitamina B-12 son por fluorometría, químicamente, por dilución del isótopo con vitamina B-12 marcada con cobalto radiactivo (^{57}Co , ^{58}Co , o ^{60}Co), por microbiología (determinando la capacidad-

para fomentar el crecimiento de diversos gérmenes dependientes de la vitamina B-12), por determinación de la capacidad para promover el crecimiento de ratas o pollos o, clínicamente, administrándola a pacientes que sufren deficiencia de esta vitamina.

El ensayo U.S.P. de la cianocobalamina (vitamina B-12) es espectrofotométrico. Los extractos de hígado para inyectables, suprimidos de la U.S.P. en 1960, se analizan de vitamina B-12 por medio de un método microbiológico.

Por lo tanto, de acuerdo con el objetivo de esta tesis, fué necesario establecer un plan de trabajo, de tal manera que al final se pueda determinar cuál de los métodos estudiados, es el más exacto, preciso, fácil de elaborar y económico, para que pueda ser aplicado con algunas variantes en cualquier Laboratorio de Control Analítico.

I.- METODOS A COMPROBAR

1) METODO QUIMICO.

Este método se basa en la purificación de la vitamina B-12, por medio de una resina de intercambio iónico-Amberlita IRP 64-, (la vitamina B-12 ha sido previamente extraída y llevada a una concentración adecuada). Este tipo de resina tiene la propiedad de separar la vitamina B-12 de los demás componentes, fijándose en la superficie de la resina, la cual se manifiesta con una coloración roja característico de la vitamina B-12. La vitamina B-12, es eluida con un disolvente ideal, y es llevada a un volumen conocido, en forma cuantitativa, para después determinar su máximo de absorción a una determinada longitud de onda, en el espectrofotómetro. Teniendo como referencia el máximo de absorción de la vitamina B-12 Patrón de Referencia, a la misma longitud de onda en que se determina la muestra, se podrá interpretar el resultado obtenido.

2) METODO MICROBIOLOGICO: METODO "DE PLACA" O DE DIFUSION EN AGAR.

Este método se basa en la actividad microbiológica producida por un microorganismo de prueba -*Escherichia coli* (ATCC 9637)-, ante la presencia de vitamina B-12 contenida en un determinado preparado polivitamínico. Esta actividad después de un período de incubación del microorganismo de prueba, en un medio de cultivo determinado se manifiesta por la aparición de zonas de crecimiento alrededor de los cilindros metálicos, que contienen vitamina B-12 de la muestra por valorar en determinada concentración, al mismo tiempo, se hace la prueba con soluciones estándar de concentración conocida. Las zonas de crecimiento se miden y los valores obtenidos se aplican a los diferentes cálculos, para obtener así la concentración exacta de vitamina B-12 que contiene el preparado polivitamínico a valorar.

3) METODO MICROBIOLOGICO: POR TURBIDIMETRIA.

Este método se basa en la capacidad para fomentar la proliferación del microorganismo de prueba -*Escherichia*

coli (ATCC 9637)-, dependiente de la vitamina B-12, en un medio de cultivo líquido determinado, lo cual se manifiesta por medio de la turbidez producida después de la incubación del microorganismo. La turbidez producida es directamente proporcional a la concentración de vitamina B-12 existentes en el tubo. Cada tubo contiene diferentes concentraciones de estándar Patrón de Referencia de vitamina B-12 y de la muestra que contiene vitamina B-12, ya inoculados e incubados, se medirá la turbidez producida por el microorganismo, en por ciento de transmitancia, a una determinada longitud de onda, y los resultados obtenidos se interpretan mediante gráficas y ecuaciones, obteniéndose así el contenido exacto de vitamina B-12, que se encuentra presente en el preparado polivitáminico, a analizar.

II.- METODOLOGIA A SEGUIR

1.- DETERMINACION DE LA CONFIABILIDAD DE LOS TRES METODOS:

a) METODO QUIMICO.

Para determinar la confiabilidad del método, se efectuaron 10 valoraciones a la vitamina B-12 Patrón de Referencia U.S.P., siguiendo el procedimiento que indica este método. A los resultados obtenidos se les calculó la Desviación Estándar, para poder determinar, cuál es el coeficiente de error que puede existir al aplicarse este método, y conocer el grado de confiabilidad en el análisis de vitamina B-12 de un determinado preparado - polivitamínico.

DESVIACION ESTANDAR

$\% (X_1)$	$(X_1 - \bar{X})$	$(X_1 - \bar{X})^2$
98.5	- 0.820	0.672
98.5	- 0.820	0.672
99.0	- 0.320	0.102
99.6	0.280	0.078
100.0	0.680	0.462
99.0	- 0.320	0.102
99.8	0.480	0.230
100.0	0.680	0.462
98.9	- 0.420	0.176
99.9	0.580	0.336

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} = \frac{993.2}{10} = 99.32$$

$$\bar{X} = 99.32$$

$$\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n} = \frac{3.292}{10} = 0.329$$

$$\sigma = \sqrt{0.329} = 0.573$$

$$\sigma = 0.573$$

COEFICIENTE DE ERROR

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0.573}{3.162} = 0.181$$

$$e = 0.181$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} t \quad \text{en donde } t \text{ para } t \text{ de distribución}$$

y para 9 grados de libertad y a
un 97.5% = 2.262 .

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{(0.573)(2.262)}{\sqrt{10}} = \bar{X} \pm \frac{1.296}{3.162} = \bar{X} \pm 0.409$$

$$V_r = \bar{X} \pm 0.409 = 99.32 \pm 0.409$$

$$Vr = 99.32 + 0.409 = 99.7\%$$

$$Vr = 99.32 - 0.409 = 98.9\%$$

Límite de confiabilidad superior = 99.7%

Límite de confiabilidad inferior = 98.9%

b) METODO MICROBIOLOGICO: METODO "DE PLACA" O DE DIFUSION
EN AGAR.

Al igual que en el método químico, para determinar la confiabilidad de este método, se efectuaron 10 valgraciones sobre la vitamina B-12 Patrón de Referencia - U.S.P., siguiendo el procedimiento que indica este método. A los resultados obtenidos se les calculó la Desviación Estándar, para obtener con ello el coeficiente de error, y los límites de confiabilidad del método.

DESVIACION ESTANDAR

$\% (x_1)$	$(x_1 - \bar{X})$	$(x_1 - \bar{X})^2$
99.7	0.89	0.792
99.2	0.39	0.152
99.0	0.19	0.036
100.0	1.19	1.416
100.0	1.19	1.416
100.0	1.19	1.416
99.0	0.19	0.036
96.2	- 2.61	6.812
98.5	- 0.31	0.096
96.5	- 2.31	5.336

$$\bar{X} = \frac{\sum x_1}{n} = \frac{988.1}{10} = 98.81$$

$$\bar{X} = 98.81$$

$$\frac{\sum (x_1 - \bar{X})^2}{n} = \frac{17.508}{10} = 1.750$$

$$s = \sqrt{1.750} = 1.322$$

$$s = 1.322$$

COEFICIENTE DE ERROR

$$e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{1.322}{\sqrt{10}} = 0.418$$

$$e = 0.418$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} t$$

en donde t de distribución y para 9 grados de libertad y a un 97.5% = 2.262.

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{(1.322)(2.262)}{\sqrt{10}} = \bar{X} \pm \frac{2.990}{3.162} = \bar{X} \pm 0.945$$

$$V_r = \bar{X} \pm 0.945 = 98.81 \pm 0.945$$

$$V_r = 98.81 + 0.945 = 99.7\%$$

$$V_r = 98.81 - 0.945 = 97.8\%$$

Límite de confiabilidad superior = 99.7%

Límite de confiabilidad inferior = 97.8%

c) METODO MICROBIOLÓGICO: POR TURBIDIMETRIA.

Igualmente que en los dos métodos anteriores, para determinar la confiabilidad de este método, se efectuaron 10 valoraciones sobre la vitamina B-12 Patrón de R_g

ferencia U.S.P., siguiendo el procedimiento que indica este método (USP XIX). A los resultados obtenidos se les calculó la Desviación Estándar, para obtener con ello el coeficiente de error y los límites de confiabilidad del método.

DESVIACION ESTANDAR

$\% (X_1)$	$(X_1 - \bar{X})$	$(X_1 - \bar{X})^2$
95.1	2.76	7.617
90.0	- 2.34	5.475
86.9	- 5.44	29.593
97.0	4.66	21.715
95.5	3.16	9.985
93.0	0.66	0.435
89.9	- 2.44	5.953
89.0	- 3.34	11.155
97.0	4.66	21.715
90.0	- 2.34	5.475

$$\bar{X} = \frac{\sum X_1}{n} = \frac{923.4}{10} = 92.34$$

$$\bar{X} = 92.34$$

$$\frac{\sum (X_1 - \bar{X})^2}{n} = \frac{119.118}{10} = 11.911$$

$$S = \sqrt{11.911} = 3.451$$

$$S = 3.451$$

COEFICIENTE DE ERROR

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{3.451}{3.162} = 1.091$$

$$e = 1.091$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{\sigma t}{\sqrt{n}} \quad \text{en donde } t \text{ de distribución}$$

y para 9 grados de libertad y a
un 97.5% = 2.262 .

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{(3.451)(2.262)}{\sqrt{10}} = \bar{X} \pm \frac{2.806}{3.162} = \bar{X} \pm 2.468$$

$$Vr = \bar{X} \pm 2.468 = 92.34 \pm 2.468$$

$$Vr = 92.34 + 2.468 = 94.8\%$$

$$Vr = 92.34 - 2.468 = 89.8\%$$

Límite de confiabilidad superior = 94.8%

Límite de confiabilidad inferior = 89.8%

2.- APLICACION DE CADA UNO DE LOS METODOS, EN DIFERENTES FORMAS FARMACEUTICAS.

a) METODO QUIMICO:

Este método³ ha sido elaborado por P.I. Van Mellen, en donde trata de evitar el manejo de mucho material complicado, que anteriormente se utilizaba para la valoración de la vitamina B-12.

El método consiste en convertir la hidroxocobalamina o la acuocobalamina, que contenga el preparado polivitamínico, en cianocobalamina con la adición de una solución al 5% de cianuro de potasio, y ajustando el pH a 4.5, con la adición de una solución al 10% de ácido cítrico. Esto se hace con el fin de obtener exclusivamente cianocobalamina, y no otros compuestos que puedan encontrarse con ella, los cuales pueden interferir en su valoración, dándonos resultados falsos.

Después se procede a extraer la cianocobalamina de los demás compuestos que la acompañan, mediante la adición de una mezcla de p-clorofenol al 50% en tetracloruro de carbono, efectuándose 3 extracciones de 10 ml cada una. La fase p-clorofenólica se transfiere a otro embudo de separación, en donde se le adicionan 10 ml de tetra-

cloruro de carbono y 20 ml de 1-butanol, efectuándose después dos extracciones vigorosas de 5 ml cada una, - con agua destilada. La fase acuosa es la que contiene la vitamina B-12 recién extraída, ésta se manifiesta - por una coloración rosa o roja.

La solución acuosa se transfiere a una columna de vidrio que contiene una resina de intercambio iónico, - Amberlita MB 64-. Esta resina tiene la propiedad de establecer un intercambio iónico con la molécula de cianocobalamina, sin que otras moléculas -que hayan sido- arrastradas en la extracción junto con la cianocobalamina- interfieran, y la primera quede fija en la superficie de la columna, manifestándose en forma de una banda de color rosa o roja.

Muchas impurezas u otras sustancias presentes son separadas de la cianocobalamina por medio de las siguientes eluciones:

- 1) Con 10 ml de buffer pH 4 .
- 2) Con dos porciones de 10 ml cada una, de ácido clorhídrico 0.1 N .
- 3) Con 50 a 100 ml de acetona al 85%.
- 4) Con 10 ml de ácido clorhídrico 0.1 N .
- 5) Con 10 ml de una mezcla dioxano-ácido clorhídrico (dioxano al 60% en ácido clorhídrico 1 N), o con 10 de tetrahidrofurano-ácido clorhídrico (tetrahidrofurano

al 60% en ácido clorhídrico).

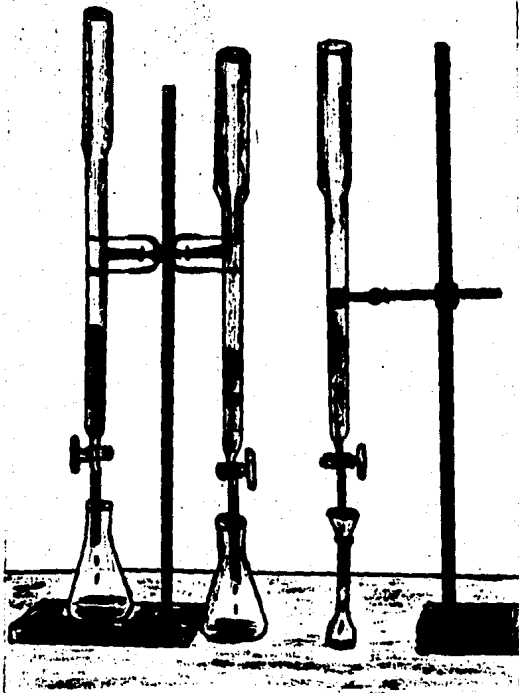
La adición de alguna de estas 2 mezclas se efectuará, siempre y cuando la columna para cromatografía sólo presente una banda de color rosa, roja o café. La mezcla dioxano-ácido clorhídrico se aplicará cuando la vitamina B-12 (cianocobalamina), haya sido extraída de cualquier forma farmacéutica multivitamínica; y la mezcla tetrahidrofurano-ácido clorhídrico se aplicará cuando dicha vitamina haya sido extraída de algún alimento natural o procesado; en el primer caso de extracción la banda será de color rosa o roja, y en el segundo caso la banda será de color café.

Posteriormente se recolecta el eluato colorido en un recipiente adecuado, se diluye cuantitativamente, hasta obtener la concentración final deseada. La solución colorida se lleva al espectrofotómetro, para medir la intensidad de absorción de luz, a una longitud de onda de 361 nm. Por último se interpretan los resultados, comparando con la absorbancia que presenta una solución estándar Patrón de Referencia de cianocobalamina de una concentración conocida. Se calculan los microgramos por mililitro, tableta, cápsula o gragea de cianocobalamina que contenga el preparado polivitamínico analizado.

Este método no sólo se emplea para valorar cianocobalamina contenida en los diferentes preparados polivita

mínicos, sino que también se puede valorar en productos alimenticios procesados y naturales.

En la figura siguiente se muestra la forma que se observa, la purificación de la cianocobalamina por medio de la columna de resina de intercambio iónico -Amberlita IRP 64-; al igual que se apreciará cuando se hace la elución de la banda colorida y la recolección del eluato colorido en un recipiente adecuado, para después hacerla dilución correspondiente.



Purificación de cianocobalamina a través de la resina de intercambio iónico -Amberlita IRP 64-. La cianocobalamina ha sido extraída del preparado polivitamínico, por medio del método de P.I.-Van Melle. La columna izquierda presenta cuando la cianocobalamina se ha fijado en la superficie de la columna de resina; la del centro presenta la elución de la banda colorida, característica de la presencia de cianocobalamina; y la columna de la derecha presenta la recolección del eluato colorido en el recipiente adecuado, para después diluir cuantitativamente y obtener la concentración de cianocobalamina deseada.

b) METODO MICROBIOLOGICO: METODO "DE PLACA" O DE DIFUSION EN AGAR:

Este método se basa en el principio de que algunas bacterias requieren de la vitamina B-12 para su desarrollo, ya que esta vitamina actúa como enzima o como coenzima en su actividad catalítica.

Este método consiste en extraer la cianocobalamina contenida en un determinado preparado polivitamínico, - por medio de una solución acuosa extractora de metabisulfito de sodio, la cual esta compuesta de fosfato disódico, ácido cítrico, metabisulfito de sodio, y agua destilada. Preparándose esta solución el día en que se elabora la valoración de cianocobalamina. De esta mezcla se tomarán aproximadamente 25 ml por cada gramo o mililitro de muestra, y se procederá a extraer en autoclave por - 10 minutos a 121° . Con esto se obtiene una concentración conocida de cianocobalamina.

Se requiere obtener la actividad óptima del microorganismo de prueba -*Escherichia coli* (ATCC 9637), lográndose esto mediante constantes resiembras del microorganismo en un medio de cultivo de agar de soya tripticaseína. Este medio de cultivo sólido, permite apreciar el desarrollo del microorganismo de prueba, en forma abundante y satisfactoria.

Del microorganismo de prueba, previamente activado, se hace una suspensión con solución isotónica estéril, la cual debe tener un 10% de transmitancia a una longitud de onda de 650 nm. Con esta suspensión se inocula el medio de cultivo de prueba (agar), en una proporción de 2 g/100 ml de medio de cultivo de prueba. Después de llenar las cajas petri (previamente esterilizadas), se deja solidificar el medio inoculado. Se colocan los cilindros metálicos en número de 6 por cada caja, a intervalos de 60° en un diámetro de 5.6 mm. Se llenan los cilindros metálicos con las soluciones de cianocobalamina problema y estándar, y se incuban a 37° por 24 Hr.

El medio de cultivo de prueba, es un medio sólido-elaborado a base de agar nutritivo, el cual no es selectivo para el desarrollo del microorganismo de prueba, - esto permitirá apreciar en forma clara el crecimiento del microorganismo de prueba, siempre y cuando exista la presencia de cianocobalamina. La solución de cianocobalamina obtenida del preparado polivitamínico, y la solución de cianocobalamina estándar Patrón de Referencia, permitirán el desarrollo del microorganismo de prueba, - el cual se puede observar por la formación de zonas de crecimiento alrededor de los cilindros metálicos que contienen las respectivas soluciones de cianocobalamina, en

concentraciones conocidas tanto del estándar como del problema.

Las zonas de crecimiento se miden y con los valores obtenidos se hacen los cálculos convenientes, para obtener la concentración exacta de cianocobalamina que contiene el preparado polivitamínico analizado, expresando el resultado en microgramos por mililitro, tableta, cápsula o gragea de cianocobalamina.

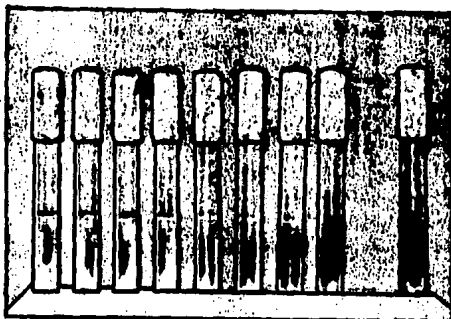
c) METODO MICROBIOLÓGICO: POR TURBIDIMETRIA:

El fundamento de este método es el mismo que el del anterior, lo único que lo diferencia es el medio de cultivo, que en este caso es líquido (caldo), y el material con el que se trabaja, siendo en este caso tubos de ensayo.

Tanto el microorganismo de prueba como la extracción de la cianocobalamina de la muestra, y la preparación del estándar, se realizan de igual manera que en el método anterior.

La actividad del microorganismo de prueba, sobre la cianocobalamina, se manifiesta por medio de una turbidez, la cual es proporcional a la concentración de cianocobalamina presente en cada dilución, como puede apreciarse

en la siguiente figura:



La reproducción del microorganismo de prueba -*Escherichia coli*- dependerá de la concentración de cianocobalamina estándar Patrón de Referencia, presente en cada dilución, la cual se encuentra entre 0.01 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$.

Se preparan soluciones con concentraciones diferentes de cianocobalamina estándar Patrón de Referencia, y de la muestra por valorar, se les adiciona medio de cultivo nutritivo en caldo y se inoculan con el microorganismo de prueba (previamente activado), se incuban a 37° por 24 Hr. La turbidez producida después de la incubación es medida por medio del espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm en por ciento de transmitancia. Los valores obtenidos en por ciento de transmitancia se grafican contra el logaritmo de las concentraciones.

nes de cada una de las soluciones estándar de cianocobalamina Patrón de Referencia. Esta curva estándar ayudará a encontrar la concentración de cianocobalamina que contiene la muestra; esto se logra interpolando el porcentaje de transmitancia de la muestra, en la curva estándar de cianocobalamina, y localizando el logaritmo de la concentración a que pertenece, teniéndose así la concentración de cianocobalamina que contiene la solución-utilizada en la valoración; tomando en cuenta las diluciones efectuadas, se calcula la concentración, expresando el resultado en microgramos por mililitro, tableta, cápsula o gragea de cianocobalamina, del polivitamínico analizado.

III.- FORMAS FARMACEUTICAS SELECCIONADAS

VINO MEDICINAL

Con vitamina B-12

Presentación y Fórmula:

Frasco con 228 ml.

Cada 100 ml contienen:

Vitamina B-12 (cianocobalamina)	100 µg
Folato de sodio	15 mg
Peptonato de fierro (fierro 160 mg)	1 g
Alcohol	10 ml
Vehículo c.b.p.	100 ml

POLVO

Restaurador de la flora intestinal

Presentación y Fórmula:

Caja con 6 sobres.

Cada sobre contiene:

Simbiosis de gérmenes lácticos.

Vitamina B-1	5.0 mg
Vitamina B-2	2.0 mg
Vitamina B-6	2.5 mg
Vitamina B-12	15.0 µg

Vitamina B-15	2.5 mg
Nicotinamida	25.0 mg
Pantotenato de calcio	6.0 mg
Dimetilpolisiloxano	20.0 mg
Lactosa c.b.p.	1.0 g

GRAGEAS

Polivitamínico. Anabólico

Presentación y Fórmula:

Frasco con 30 grageas.

Cada gragea contiene:

Oximetolona Syntex (2-hidroximetil-17-alfa-metil-androstan-17 beta-ol-3-ona)	2.5 mg
Vitamina A (acetato)	4,000 U.I.
Vitamina D-2	400 U.I.
Vitamina B-1	10.0 mg
Vitamina B-2	1.5 mg
Vitamina B-6	1.7 mg
Vitamina B-12	5.0 µg
Vitamina C	50.0 mg
Nicotinamida	20.0 mg
Pantotenato de calcio	5.0 mg
Acido fólico	1.7 mg
Excipiente c.b.p.	1 gragea

IV.- INTERPRETACION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la valoración de cianocobalamina en los diferentes preparados polivitamínicos empleados, para probar la efectividad de los tres métodos anteriormente mencionados son los siguientes:

a) METODO QUIMICO:

Se efectuaron cinco valoraciones de cianocobalamina en los tres preparados polivitamínicos seleccionados, a los resultados se les calculó la Desviación Estándar, para determinar el coeficiente de error y los límites de confiabilidad, al aplicar este método.

VINO MEDICINAL

$\% (x_1)$	$(x_1 - \bar{X})$	$(x_1 - \bar{X})^2$
99.5	1.56	2.433
99.0	1.06	1.123
96.6	- 1.34	1.795
98.0	0.06	0.003
96.6	- 1.34	1.795

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} = \frac{489.7}{5} = 97.94$$

$$\bar{X} = 97.94$$

$$\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{7.149}{4} = 1.787$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{1.787} = 1.336$$

$$\sigma = 1.336$$

COEFICIENTE DE ERROR:

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{1.336}{2} = 0.668$$

$$e = 0.668$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD:

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{\sigma t}{\sqrt{n-1}} \quad \text{en donde } t \text{ de distribución a 4 grados de libertad y a un } 97.5\% = 2.776 .$$

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{(1.336)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{3.208}{2} = \bar{X} \pm 1.854$$

$$V_r = \bar{X} \pm 1.854 = 97.94 \pm 1.854$$

$$Vr = 97.94 + 1.854 = 99.7\%$$

$$Vr = 97.94 - 1.854 = 96.0\%$$

Límite superior = 99.7%

Límite inferior = 96.0%

POLVO

x_i	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
86.9	0.68	0.462
86.4	0.18	0.032
86.9	0.68	0.462
84.5	- 1.72	2.958
86.4	0.18	0.032

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{431.1}{5} = 86.22$$

$$\bar{x} = 86.22$$

$$\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{3.946}{4} = 0.986$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{0.986} = 0.992$$

$$\sigma = 0.992$$

COEFICIENTE DE ERROR:

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{0.992}{2} = 0.496$$

$$e = 0.496$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD:

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{\sigma t}{\sqrt{n-1}}$$

Para t de distribución a 4 grados de libertad y a un 97.5% es = 2.776 .

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{(0.992)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{2.753}{2} = \bar{X} \pm 1.376$$

$$Vr = \bar{X} \pm 1.376 = 86.22 \pm 1.376$$

$$Vr = 86.22 + 1.376 = 87.6\%$$

$$Vr = 86.22 - 1.376 = 84.8\%$$

$$\text{Límite superior} = 87.6\%$$

Límite inferior = 84.8%

GRAGEAS

% (x _i)	(x _i - \bar{x})	(x _i - \bar{x}) ²
99.0	- 0.2	0.04
100.0	0.8	0.64
100.0	0.8	0.64
99.0	- 0.2	0.04
98.0	- 1.2	1.44

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{496}{5} = 99.2$$

$$\bar{x} = 99.2$$

$$\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{2.8}{4} = 0.7$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{0.7} = 0.836$$

$$\sigma = 0.836$$

COEFICIENTE DE ERROR

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{0.836}{2} = 0.418$$

$$e = 0.418$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} t$$

en donde t de distribución para
4 grados de libertad y a un
97.5% = 2.776 .

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{(0.836)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{2.320}{2} = \bar{X} \pm 1.16$$

$$Vr = \bar{X} \pm 1.16 = 99.2 \pm 1.16$$

$$Vr = 99.2 + 1.16 = 100.3\%$$

$$Vr = 99.2 - 1.16 = 98.04\%$$

$$\text{Limite superior} = 100.3\%$$

$$\text{Limite inferior} = 98.04\%$$

b) METODO MICROBIOLOGICO: METODO "DE PLACA" O DE DIFUSION EN AGAR:

Se efectuaron cinco valoraciones de cianocobalamina en los 3 preparados polivitamínicos seleccionados, a los resultados se les calculó la Desviación Estándar, para conocer cuál ha sido el coeficiente de error y los límites de confiabilidad de este método.

VINO MEDICINAL

$\% (X_i)$	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$
100.0	0.06	0.003
100.0	0.06	0.003
99.8	- 0.14	0.019
100.0	0.06	0.003
99.9	- 0.04	0.001

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} = \frac{499.7}{5} = 99.94$$

$$\bar{X} = 99.94$$

$$\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{0.029}{4} = 0.007$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{0.007} = 0.083$$

$$\sigma = 0.083$$

COEFICIENTE DE ERROR:

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{0.083}{2} = 0.041$$

$$e = 0.041$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD:

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{\sigma t}{\sqrt{n-1}} \quad \text{en donde } t \text{ de distribución para } 4 \text{ grados de libertad y a un } 97.5\% = 2.776 .$$

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{(0.083)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{0.230}{2} = \bar{X} \pm 0.115$$

$$Vr = \bar{X} \pm 0.115 = 99.94 \pm 0.115$$

$$Vr = 99.94 + 0.115 = 100.05\%$$

$$Vr = 99.94 - 0.115 = 99.8\%$$

$$\text{Limite superior} = 100.05\%$$

Límite inferior = 99.8%

POLVO

$\% (X_1)$	$(X_1 - \bar{X})$	$(X_1 - \bar{X})^2$
100.0	0.7	0.49
99.0	- 0.3	0.09
100.00	0.7	0.49
98.5	- 0.8	0.64
99.0	- 0.3	0.09

$$\bar{X} = \frac{\sum X_1}{n} = \frac{496.5}{5} = 99.3$$

$$\bar{X} = 99.3$$

$$\frac{\sum (X_1 - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{1.8}{4} = 0.45$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{0.45} = 0.670$$

$$\sigma = 0.670$$

COEFICIENTE DE ERROR:

$$e = \frac{V}{\sqrt{n-1}} = \frac{0.670}{2} = 0.335$$

$$e = 0.335$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD:

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{V t}{\sqrt{n-1}} \quad \text{en donde } t \text{ de distribución para 4 grados de libertad y a un } 97.5\% = 2.776 .$$

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{(0.670)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{1.859}{2} = 0.929 \pm \bar{X}$$

$$V_r = \bar{X} \pm 0.929 = 99.3 \pm 0.929$$

$$V_r = 99.3 + 0.929 = 100.2\%$$

$$V_r = 99.3 - 0.929 = 98.3\%$$

$$\text{Límite superior} = 100.2\%$$

$$\text{Límite inferior} = 98.3\%$$

GRAGEAS

$N(x_i)$	$(x_i - \bar{X})$	$(x_i - \bar{X})^2$
100.0	0.08	0.006
100.0	0.08	0.006
99.8	- 0.12	0.014
100.0	0.08	0.006
99.8	- 0.12	0.014

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{499.6}{5} = 99.92$$

$$\bar{X} = 99.92$$

$$\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{0.046}{4} = 0.011$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{0.011} = 0.104$$

$$\sigma = 0.104$$

COEFICIENTE DE ERROR:

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{0.104}{2} = 0.052$$

$$e = 0.052$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD:

$$V_r = \bar{X} \frac{t}{\sqrt{n-1}} \quad \text{Para } t \text{ de distribución a 4 grados de libertad y a un } 97.5\% = 2.776 .$$

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{(0.10\%)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{0.288}{2} = \bar{X} \pm 0.144$$

$$V_r = \bar{X} \pm 0.144 = 99.92 \pm 0.144$$

$$V_r = 99.92 + 0.144 = 100.06\%$$

$$V_r = 99.92 - 0.144 = 99.7\%$$

$$\text{Límite superior} = 100.06\%$$

$$\text{Límite inferior} = 99.7\%$$

c) METODO MICROBIOLÓGICO: POR TURBIDIMETRIA:

Se efectuaron cinco valoraciones de cianocobalamina contenida en los 3 preparados polivitamínicos seleccionados, con los resultados se calculó la Desviación Estándar, para determinar el coeficiente de error y los límites de confiabilidad, al aplicar este método.

VINO MEDICINAL

Al intentar la valoración de este preparado polivitamínico, aplicando la técnica que describe este método, se encontró que después de inocular los tubos de ensayo con diferentes diluciones del preparado, y de incubarlos, no hubo desarrollo del microorganismo de prueba y por lo tanto no hubo variabilidad de las lecturas con respecto al blanco de calibración del aparato. Se supone que esto pudo haber sucedido por el contenido de alcohol, conservadores y el pH del preparado polivitamínico, el cual al no encontrarse en las condiciones deseadas no permitió el desarrollo del microorganismo de prueba.

POLVO

$\%(x_i)$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
92.5	1.34	1.795
90.8	- 0.36	0.129
92.5	1.34	1.795
90.0	- 1.16	1.345
90.0	- 1.16	1.345

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{455.8}{5} = 91.16$$

$$\bar{x} = 91.16$$

$$\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{6.409}{4} = 1.602$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{1.602} = 1.265$$

$$\sigma = 1.265$$

COEFICIENTE DE ERROR:

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{1.265}{2} = 0.632$$

$$e = 0.632$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD:

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} t \quad \text{en donde } t \text{ de distribución para } 4 \text{ grados de libertad y a un } 97.5\% = 2.776 .$$

$$V_r = \bar{X} \pm \frac{(1.265)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{3.511}{2} = \bar{X} \pm 1.755$$

$$V_r = \bar{X} \pm 1.755 = 91.16 \pm 1.755$$

$$V_r = 91.16 + 1.755 = 92.9\%$$

$$V_r = 91.16 - 1.755 = 89.4\%$$

Límite superior = 92.9%

Límite inferior = 89.4%

GRAGEAS

$\% (X_1)$	$(X_1 - \bar{X})$	$(X_1 - \bar{X})^2$
98.5	0.76	0.577
95.8	- 1.94	3.763
98.5	0.76	0.577
97.9	0.16	0.025
98.0	0.26	0.067

$$\bar{X} = \frac{\sum X_1}{n} = \frac{488.7}{5} = 97.74$$

$$\bar{X} = 97.74$$

$$\frac{\sum (X_1 - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{5.009}{4} = 1.252$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$\sigma = \sqrt{1.252} = 1.118$$

$$\sigma = 1.118$$

COEFICIENTE DE ERROR:

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{1.118}{2} = 0.559$$

$$e = 0.559$$

LIMITES DE CONFIABILIDAD:

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{t}{\sqrt{n-1}} \quad \begin{array}{l} \text{en donde } t \text{ de distribución para} \\ \text{4 grados de libertad y a un} \\ \text{97.5\%} = 2.776 \end{array}$$

$$Vr = \bar{X} \pm \frac{(1.118)(2.776)}{\sqrt{4}} = \bar{X} \pm \frac{3.103}{2} = \bar{X} \pm 1.551$$

$$Vr = \bar{X} \pm 1.551 = 97.74 \pm 1.551$$

$$Vr = 97.74 + 1.551 = 99.3\%$$

$$Vr = 97.74 - 1.551 = 96.1\%$$

Límite superior = 99.3%

Límite inferior = 96.1%

V.- RESULTADOS

En el siguiente cuadro se hace una comparación de los resultados obtenidos en la aplicación de los tres métodos empleados, para valorar la vitamina B-12 (cianocobalamina) Patrón de Referencia, con el fin de probar la efectividad y confiabilidad de los mismos.

VITAMINA B-12 (CIANOCOBALAMINA) ESTANDAR PATRON DE REFERENCIA		
METODO QUIMICO.	METODO MICROBIOLOGICO: "DE PLACA" O DE DIFUSION EN AGAR.	METODO MICROBIOLOGICO: POR TURBIDIMETRIA.
98.5%	99.7%	95.1%
98.5%	99.2%	90.0%
99.0% $\bar{X} = 99.32\%$	99.0% $\bar{X} = 98.81\%$	86.9% $\bar{X} = 92.34\%$
99.6% $\sigma = 0.573$	100.0% $\sigma = 1.322$	97.0% $\sigma = 3.451$
100.0% $e = 0.181$	100.0% $e = 0.418$	95.5% $e = 1.091$
99.0% $Vr = \bar{X} \pm 0.409$	100.0% $Vr = \bar{X} \pm 0.945$	93.0% $Vr = \bar{X} \pm 2.468$
99.8%	99.0%	89.9%
100.0% Lim. sup. = 99.7%	96.2% Lim. sup. = 99.7%	89.0% Lim. sup. = 94.8%
98.9% Lim. inf. = 98.9%	98.5% Lim. inf. = 97.8%	97.0% Lim. inf. = 89.8%
99.9%	96.5%	90.0%

Para obtener los límites de confiabilidad, "t" de distribución para 9 grados - de libertad y a un 97.5% = 2.262 .

En el siguiente cuadro se hace una comparación de los resultados obtenidos en la aplicación de los tres métodos, sobre las tres diferentes formas farmacéuticas seleccionadas, para probar la efectividad de los mismos, en la valoración de la vitamina B-12 (cianocobalamina).

FORMAS FARMACEUTICAS			
METODO	VINO MEDICINAL	POLVO	GRAGEAS
QUIMICO.	99.5% $\bar{X}=97.94\%$ 99.0% $\sigma=1.336$ 96.6% $e=0.668$ 98.0% $Vr=\bar{X} \pm 1.854$ 96.6% $Lim. sup.=99.7\%$ $Lim. inf.=96.0\%$	86.9% $\bar{X}=86.22\%$ 86.4% $\sigma=0.992$ 86.9% $e=0.496$ 84.5% $Vr=\bar{X} \pm 1.376$ 86.4% $Lim. sup.=87.6\%$ $Lim. inf.=84.8\%$	99.0% $\bar{X}=99.2\%$ 100.0% $\sigma=0.836$ 100.0% $e=0.418$ 99.0% $Vr=\bar{X} \pm 1.16$ 98.0% $Lim. sup.=100.3\%$ $Lim. inf.=98.04\%$
MICROBIOLOGICO: "DE PLACA" O DE DIFUSION EN AGAR.	100.0% $\bar{X}=99.94\%$ 100.0% $\sigma=0.083$ 99.9% $e=0.041$ 99.8% $Vr=\bar{X} \pm 0.115$ 100.0% $Lim. sup.=100.0\%$ $Lim. inf.=99.8\%$	100.0% $\bar{X}=99.3\%$ 99.0% $\sigma=0.670$ 100.0% $e=0.335$ 98.5% $Vr=\bar{X} \pm 0.929$ 99.0% $Lim. sup.=100.2\%$ $Lim. inf.=98.3\%$	100.0% $\bar{X}=99.92\%$ 100.0% $\sigma=0.104$ 99.8% $e=0.052$ 100.0% $Vr=\bar{X} \pm 0.144$ 99.8% $Lim. sup.=100.06\%$ $Lim. inf.=99.7\%$
MICROBIOLOGICO: POR TURBIDIMETRIA.	NO SE OBTUVIERON RESULTADOS.	92.5% $\bar{X}=91.16\%$ 90.8% $\sigma=1.265$ 92.5% $e=0.632$ 90.0% $Vr=\bar{X} \pm 1.755$ 90.0% $Lim. sup.=92.9\%$ $Lim. inf.=89.4\%$	98.5% $\bar{X}=97.74\%$ 95.8% $\sigma=1.118$ 98.5% $e=0.559$ 97.9% $Vr=\bar{X} \pm 1.551$ 98.0% $Lim. sup.=99.3\%$ $Lim. inf.=96.1\%$

Para obtener los límites de confiabilidad, "t" de distribución para 4 grados de libertad y a un 97.5% = 2.776 .

VI.- CONCLUSIONES

a) METODO QUIMICO.

VENTAJAS AL APLICAR ESTE METODO:

- 1.- La técnica es de fácil aplicación.
- 2.- Se puede valorar vitamina B-12 (cianocobalamina) - con el empleo de esta técnica, en cualquier forma - farmacéutica semejante a las citadas en esta tesis, así como en preparados alimenticios tanto procesados como naturales.
- 3.- El tiempo requerido para la valoración de la vitamina B-12 (cianocobalamina), al aplicar este método, es de 8 horas aproximadamente.
- 4.- El material de vidrio utilizado en este método, es de fácil elección y substitución.

DESVENTAJAS AL APLICAR ESTE METODO:

- 1.- El reactivo de p-clorofenol, debe encontrarse en existencia, ya que es un reactivo de importación y por lo tanto difícil de encontrar. Su importancia es triba, en que es el reactivo que extrae la vitamina B-12 (cianocobalamina) del preparado polivitamínico o alimenticio que se desea valorar.

- 2.- La concentración de la vitamina B-12 (cianocobalamina), debe encontrarse en la muestra adecuada para el análisis, en una concentración no menor de 50 μg , ya que de no ser así, las lecturas en el espectrofotómetro serían erróneas, pues la concentración aceptable para ser leída debe de ser de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ a 361 nm es de 207).
- 3.- La estructura molecular de la vitamina B-12 (cianocobalamina), puede tener semejanza con otra sustancia, ocasionando que no haya una seguridad sobre si lo que se valoró fue vitamina B-12 (cianocobalamina), u otra sustancia semejante que nos dé absorbancia a la longitud de onda a la que hace la determinación.

CONCLUSION FINAL:

Basándose en los datos encontrados al elaborar esta tesis, podemos concluir que este método es preciso, exacto, reproducible y fácil de elaborar.

Al observar los resultados en las valoraciones efectuadas en el estándar de referencia, podemos deducir que en comparación con los métodos microbiológicos efectuados (cilindro placa y turbidimétrico), este método resultó con mayor efectividad, ya que los resultados fueron cercanos al real y el coeficiente de error fue más bajo

que en los otros métodos.

Al observar los resultados de las valoraciones en las formas farmacéuticas trabajadas, encontramos variación según el producto, pues en el vino medicinal y en las grageas los valores obtenidos fueron cercanos al dato teórico, en tanto que en el polvo fueron bajos. Así pues, dependiendo de la forma farmacéutica que se trabaje, y del excipiente o vehículo que presente, se tendrá mayor o menor interferencia y por lo tanto grado de efectividad.

Con respecto al coeficiente de error y al grado de confiabilidad, podemos ver que éste fue mayor en el método microbiológico por placa y menor en el método por turbidimetría, con respecto al método químico.

Es necesario hacer notar que este método deberá elegirse cuando se requiera rápidamente el resultado de la valoración de la vitamina B-12 (cianocobalamina) en un lote en proceso de elaboración, pues sólo se requieren 8 horas para el análisis. Ahora bien, si al analizar el producto terminado, se requiere saber, si el contenido de vitamina B-12 (cianocobalamina) se encuentra en la concentración adecuada, y si ésta no ha sido alterada o, substituída por otra substancia de estructura molecular

semejante a esta vitamina, entonces se empleará cualquiera de los 2 métodos microbiológicos trabajados en esta tesis; ya que el microorganismo de prueba seleccionado en estos métodos microbiológicos (cilindro - placa o por turbidimetría), es específico para la vitamina B-12 (cianocobalamina), y sólo se desarrollará en presencia de ésta.

b) METODO MICROBIOLÓGICO: METODO "DE PLACA" O DE DIFUSION EN AGAR.

VENTAJAS AL APLICAR ESTE METODO:

- 1.- La técnica es de fácil aplicación según se describe en este método.
- 2.- Se puede valorar vitamina B-12 (cianocobalamina), - en cualquier forma farmacéutica, así como en preparados vitamínicos alimenticios tanto procesados como naturales.
- 3.- La concentración de la vitamina B-12 (cianocobalamina), del preparado polivitamínico, puede encontrarse en cualquier rango de los existentes.

- 4.- La muestra del preparado polivitamínico, al efectuar las respectivas diluciones, puede tener un aspecto transparente o turbio, sin que ésto altere la valoración de la vitamina B-12 (cianocobalamina)
- 5.- El microorganismo de prueba empleado para la valoración de la vitamina B-12 (cianocobalamina), en este método, es específico; de tal manera que dicho microorganismo sólo se desarrollará en presencia de la vitamina B-12 (cianocobalamina), y no de otra substancia que tenga semejanza estructural con ésta.

DESVENTAJAS AL APLICAR ESTE METODO:

- 1.- El microorganismo de prueba debe ser utilizado después de una resiembra muy reciente.
- 2.- Los medios de cultivo, tanto para el mantenimiento del microorganismo de prueba, como el medio de cultivo de prueba, deben ser específicos.
- 3.- El tiempo requerido para la valoración de esta vitamina, es de 4 días. En este tiempo se incluye la resiembra del microorganismo de prueba, la preparación del material de vidrio, la incubación del microorganismo de prueba con la vitamina B-12 (cianocobalamina) presente, la interpretación de los resultados obtenidos.
- 4.- Si la forma farmacéutica contiene un alto grado de

alcohol, o de conservadores, es posible que disminuya el desarrollo del microorganismo de prueba (en ocasiones no hay desarrollo), y por lo tanto altere el resultado deseado de la valoración.

CONCLUSION FINAL:

Al observar los resultados de las valoraciones del estándar de referencia, encontramos que los valores obtenidos fueron cercanos al real y que los valores del coeficiente de error y del grado de confiabilidad fueron mayores que en el método químico y menores con respecto al método turbidimétrico. Estos resultados nos hacen ver que esta técnica es confiable para la valoración de vitamina B-12 (cianocobalamina).

En las formas farmacéuticas trabajadas se obtuvieron resultados muy satisfactorios y en todos los casos fueron cercanos al dato teórico; en lo que respecta al coeficiente de error y al límite de confiabilidad, fueron menores en el vino medicinal y en el polvo. En las grasas resultó menor que en el método turbidimétrico, pero mayor que en el método químico.

Por lo tanto el método resulta recomendable cuando se opte por desarrollar un análisis microbiológico, volviendo a insistir en las ventajas que presenta sobre el análisis químico en lo que respecta a las especificidades del método; de donde se deduce que este método es preciso, exacto, aplicable y reproducible.

c) METODO MICROBIOLOGICO: POR TURBIDIMETRIA.

VENTAJAS AL APLICAR ESTE METODO:

- 1.- La técnica es aplicable y reproducible según se describe en este método.
- 2.- Se puede valorar vitamina B-12 (cianocobalamina), - en cualquier forma farmacéutica, así como en productos alimenticios naturales y procesados.
- 3.- La concentración de vitamina B-12 (cianocobalamina) puede encontrarse en cualquier rango de los existentes, de un determinado preparado polivitamínico.
- 4.- El microorganismo de prueba empleado para la valoración de vitamina B-12 (cianocobalamina), en este método, es específico; de tal manera que dicho microorganismo sólo se desarrollará en presencia de vitamina B-12 (cianocobalamina), y no de otra sustancia que tenga semejanza estructural con ésta.

DESVENTAJAS AL APLICAR ESTE METODO:

- 1.- El microorganismo de prueba debe ser utilizado después de una resiembra muy reciente.
- 2.- Los medios de cultivo líquidos, tanto para el mantenimiento del microorganismo de prueba, como del medio de cultivo de prueba, deben ser específicos.
- 3.- Después de efectuar las diluciones necesarias en la

muestra, ésta puede presentar un aspecto turbio, lo cual puede afectar la lectura en el espectrofotómetro, alterando por consiguiente el resultado de la valoración.

- 4.- Si la forma farmacéutica contiene un alto grado de alcohol, de conservadores, es posible que disminuya el desarrollo del microorganismo de prueba (en ocasiones no hay desarrollo), y por lo tanto altere el resultado deseado de la valoración.
- 5.- La limpieza del material de vidrio debe ser minuciosa y los tubos de vidrio deben tener solo una medida, tanto de largo como de diámetro. Lo anterior se hace, debido a la gran sensibilidad del microorganismo de prueba aún a los mínimos indicios de actividad de vitamina B-12 (cianocobalamina), así como también a la presencia de huellas, de la mayor parte de sustancias limpiadoras.

CONCLUSION FINAL:

La técnica es aplicable y reproducible, sin embargo al observar los datos de las valoraciones del estándar de referencia, encontramos que los resultados fueron más bajos que el título real y que tanto el coeficiente de error como el grado de confiabilidad, fueron mayores que

en los otros dos métodos trabajados.

De los resultados de las valoraciones en las formas farmacéuticas trabajadas, podemos notar que en el vino medicinal no fue posible efectuar la valoración, en el polvo los resultados fueron bajos y en las grageas cercanos al teórico. El coeficiente de error resultó más alto que en los otros métodos, al igual que el grado de confiabilidad. Así pues, este método es recomendable por las ventajas que presentan los análisis microbiológicos pero resultó con menor efectividad que el método de cilindro placa, también conocido como método por difusión en agar.

Finalmente podemos concluir, que los tres métodos seleccionados para la valoración de la vitamina B-12 (cianocobalamina) son aplicables y reproducibles, y la elección de uno u otros, dependerá de la rapidez con que se requieran los resultados de la valoración de esta vitamina. Son métodos que cualquier Laboratorio de Control Analítico puede aplicar.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- (1) Harper A. Harold
MANUAL DE QUINICA FISIOLÓGICA
5/a edición
Editorial "El Manual Moderno", S.A.
México 11, D.F.
pág. 132 (1976)
- (2) Litter Manuel
FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL Y CLINICA
5/a edición.
Editorial "El Ateneo", S.A.
Argentina
págs. 1320 - 1325 (1977)
- (3) Meyers H. Frederik, Jawetz Ernest, Golfin Alan
MANUAL DE FARMACOLOGIA CLINICA
3/a edición
Editorial "El Manual Moderno", S.A.
México 11, D.F.
págs. 529 - 531 (1977)
- (4) Dixon J. Wilfrid & Massey Frand J. Jr.
INTRODUCTION TO STATISTICAL ANALYSIS
Second Edition
International Student Edition
Tosho Printing Co., LTD, Tokyo, Japan
Pág. 384 (1957)

- (5) S. Goodman Louis, Gilman Alfred
BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA
4/a edición
Editorial Interamericana, S.A.
México, D.F.
págs. 1178, 1181 - 1183 (1970)
- (6) Haque Hashmi Ul-Manzur
ASSAY OF VITAMINAS IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS
A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons
Printed in Great Britain by John Wright
págs. 242, 243 (1973)
- (7) FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS SSA
4/a edición
Editada por la S.S.A.
México, D.F.
págs. 415 - 419 (1974)
- (8) Dr. Rosenstein Emilio
DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS
23/ava edición
Editorial P.L.M.
México, D.F. (1976)
- (9) Strobeccker Rolf, M. Henning Heinz
VITAMIN ASSAY, TESTD METHODS
Printed by Pallottiner Druckerci, Limburg/Lahn
Printed in Gernay
págs. 155 - 160

(10) THE UNITED STATES PHARMACOPEIA
XIX Revision
Official from July 1 of 1975
pgs. 613 - 615



TESIS EN UN DIA

Tesis por computadora

consultas de compra
promocion gratis

Comunicacion 67 Linea 7-A

Tel. 648-28-64