

# UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



*Consideraciones Generales Sobre Vitamina B12  
y sus Controles de Calidad*



TESIS DOCTORAL

presentada por

FELIX GABRIEL RIVERA ROMERO

previa a la opción del Título de  
DOCTOR EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO DE 1971



615 328  
B0210  
1971  
F.C.C.Q.  
24.3.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

*Dr. Rafael Menjivar*

SECRETARIO:

*Dr. Miguel Angel Sáenz Varela*

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DECANO:

*Dr. Raúl Arévalo*

SECRETARIO:

*Dra. Amelia Rodríguez de Cortez*

*ASESOR DE TESIS*

*Dr. Franklin López y López*

*JURADO DE TESIS*

*Presidente - Dr. Franklin López y López*

*Primer Vocal - Dra. Lillian Aguilar de Fernández*

*Segundo Vocal - Dra. Haydée Valdez de Quijano*

*JURADOS QUE PRACTICARON LOS EXAMENES*

*PRIVADOS DE DOCTORAMIENTO*

*Primer Examen*

*Presidente - Licenciado Julio Ernesto Bolaños*  
*Primer Vocal - Dr. Carlos Montes de Oca*  
*Segundo Vocal - Dra. Estela Monterrosa de López*

*Segundo Examen*

*Presidente - Dr. Pedro Rosales*  
*Primer Vocal - Dr. Mauricio Alvarez*  
*Segundo Vocal - Dra. Lillian Uribe de Lecha*

D E D I C A T O R I A

A EL GRAN HACEDOR

A MI MADRE:

*Benilda Romero de Rivera, como  
un homenaje a su memoria; que  
siempre vivirá en mi recuerdo.*

A MI PADRE:

*Gabriel Roque Rivera, con todo  
respeto y cariño.*

A MIS HERMANOS:

*Saúl, Ernesto, Margarita e  
Irene.*

A G R A D E C I M I E N T O

A *mi Asesor y Jurado de Tesis*

A *las personas que colaboraron en la realización  
de este trabajo.*

## I N D I C E

	<i>Pág. No.</i>
I.    INTRODUCCION. . . . .	1
II.   HISTORIA . . . . .	3
III.  PROPIEDADES FISICOQUIMICAS. . . . .	4
IV.   FUENTES NATURALES DE OBTENCION. . . . .	7
V.    FUNCIONES METABOLICAS . . . . .	9
VI.   PATOGENIA Y NATURALEZA DE LA ANEMIA PERNICIOSA . . . . .	12
VII.  LA MEDULA OSEA EN LA ANEMIA PERNICIOSA Y LA ACCION DE LA CIANOCOBALAMINA SO- BRE ELLA . . . . .	19
VIII. ABSORCION, DISTRIBUCION, DESTINO Y ELI- MINACION . . . . .	20
IX.   PREPARADOS, VIAS DE ADMINISTRACION Y DOSIS . . . . .	23
X.    REACCIONES TOXICAS. . . . .	29
XI.   USO TERAPEUTICO . . . . .	30
XII.  ANALISIS . . . . .	35
XIII. BIBLIOGRAFIA. . . . .	59

## I N T R O D U C C I O N

El trabajo siguiente es una recopilación de datos sobre la vitamina  $B_{12}$ , en lo que respecta a su Historia, propiedades, usos y análisis; a fin de que personas interesadas en su estudio puedan encontrar en él, la información que les sea útil.

Desde que en el año 1913 apareció el concepto de vitamina, mucho se ha dicho sobre la importancia de estos compuestos, el papel que desempeñan en el metabolismo animal y vegetal, dónde se encuentran en mayor cantidad, etc.

Con el transcurso del tiempo muchas de estas dudas han sido aclaradas; existiendo casos que por lo reciente de su descubrimiento no ha sido posible realizar el número de investigaciones necesarias para dejar satisfechos los requerimientos científicos. Ello trae consigo un aprovechamiento menos ventajoso y a veces hasta un deshecho total de las fuentes de esas vitaminas.

A este caso pertenecen muchas de las vitaminas del complejo B, y de manera muy especial la que ha sido descubierta más recientemente, la vitamina  $B_{12}$  (Cobalamina), descubierta casi simultáneamente por Smith en Inglaterra y por Rickes y Folkers en los Estados Unidos, en el año 1948 trabajando en los principios antianémicos del hígado de res.

Estudios posteriores sobre la serie de sustancias conocidas como cobalamina y variedades de la misma, llevaron a conclusiones sobre la importancia nutricional de estos agentes y el efecto terapéutico de ellos sobre diversos tipos de anemia, algunos de los cuales eran problemas patológicos de difícil curación.



Posteriormente se comprobó la acción de éstas vitaminas sobre otras enfermedades animales y humanas y su efecto en el metabolismo de proteínas, glúcidos y lípidos.

El objeto del siguiente trabajo es la de estudiar la relación del nivel indispensable, para el correcto funcionamiento del organismo humano y animal, el efecto de su carencia como consecuencia enfermedad de algunos sistemas de preparación. Como medio para la incorporación necesaria como factor vitamínico al organismo.

## HISTORIA

Hacia 1948, dos escuelas: la de Rickes (en América) y la de Lester Smith (Inglaterra) culminaron una serie de trabajos con la obtención y aislamiento de la vitamina  $B_{12}$  de extractos hepáticos. Este producto cristalino, de color rojo como compuesto de cobalto, había de considerarse en seguida como el "factor extrínseco antianémico". Poco tiempo después Castle propuso el nombre de "factor extrínseco" y emitió su célebre teoría es decir, que el "factor extrínseco" existente en el jugo gástrico normal actúa sobre el factor intrínseco que existe en los alimentos para producir el principio antianémico que se almacena en el hígado. Hoy sabemos que el factor extrínseco es de hecho la vitamina  $B_{12}$ . Es una vitamina muy extendida en la naturaleza, de origen microbiológico, ya bajo la forma ciano o de hidroxocobalaminas, en múltiples órganos de animales (hígado, riñón, estómago, leche, yema de huevos, queso, harina de soya etc.), así como en cultivos de diversas bacterias y hongos y aún, lo que es más curioso, en las mismas heces de enfermos con anemia perniciosa (falta de absorción en ellos, al carecer de factor intrínseco). Los vegetales no la contienen prácticamente. Sus soluciones son de un bello color rojo violáceo, con intensidad, en íntima relación con la concentración vitamínica. Pronto se demostró que la vitamina  $B_{12}$  tenía gran potencia para suscitara completa remisión hematológica y neurológica en la anemia perniciosa y que era eficaz en algunas o

### PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

Aun se desconoce la fórmula estructural completa de la vitamina B<sub>12</sub>. Su composición química aproximada es C 61-64 H 86-92 N 14 ó 13-P Co. Su peso molecular es alrededor de 1300. Es una sustancia que aparece en cristales aciculares rojos que tiene aproximadamente 4.5% de cobalto, en enlace covalente y no iónico; el color rojo guarda relación con el complejo de coordinación de cobalto. Se han identificado varios fragmentos de la molécula; 5.6 dimetilbenzimidazoles o en enlace glucosídico con una molécula de ribosa (en posición 1), a su vez fosforada en C<sub>2</sub> ó C<sub>3</sub>, 2 residuos de aminofranol y un grupo ciano. El N en la posición 3 del núcleo de benzimidazol está unido en coordinación con el átomo de cobalto. El CN está unido al cobalto. La molécula es diamagnética, lo que indica que el cobalto es trivalente. Los datos analíticos sustentan las teorías recientes sobre su fórmula estructural y así se ha planteado que en la vitamina B<sub>12</sub> deben existir amidas carboxílicas por su comportamiento ante la hidrólisis con ácidos y álcalis y que es imposible que exista un enlace directo Co-O-P-, por su comportamiento a los rayos X, Su analogía con otros productos naturales, sugiere que el puesto entre el grupo fosfático y el resto de la molécula debe ser un aminofranol. También se sospecha por su efecto hematológico que la parte básica de la molécula tiene estructura de porfirina o poli-pirrol: Pero existen dudas en ese sentido, debido a la ausencia de una banda de Soret en el espectro de absorción de la vitamina y la no formación de maleinimidazoles por oxidación.

Los metales pesados y los reductores y oxidantes fuertes destruyen la actividad de la vitamina B<sub>12</sub>, pero no se altera si se calienta en autoclave a 121°C por poco tiempo. Se ha preparado vitamina B<sub>12</sub> con cobalto y fósforo radioactivos por biosíntesis o en la pila nuclear; esta sustancia ha tenido gran utilidad en

FORMA Y COLOR:

*Cristaliza en agujas de color rojo vivo.*

PUNTO DE FUSION:

*Los cristales se oscurecen a 210° - 220° con punto de fusión por debajo de 300° C.*

SOLUBILIDAD:

*Soluble en alcohol e insoluble en acetona, cloroformo y éter. Un gramo se disuelve en 80 mls. de agua.*

ESTABILIDAD:

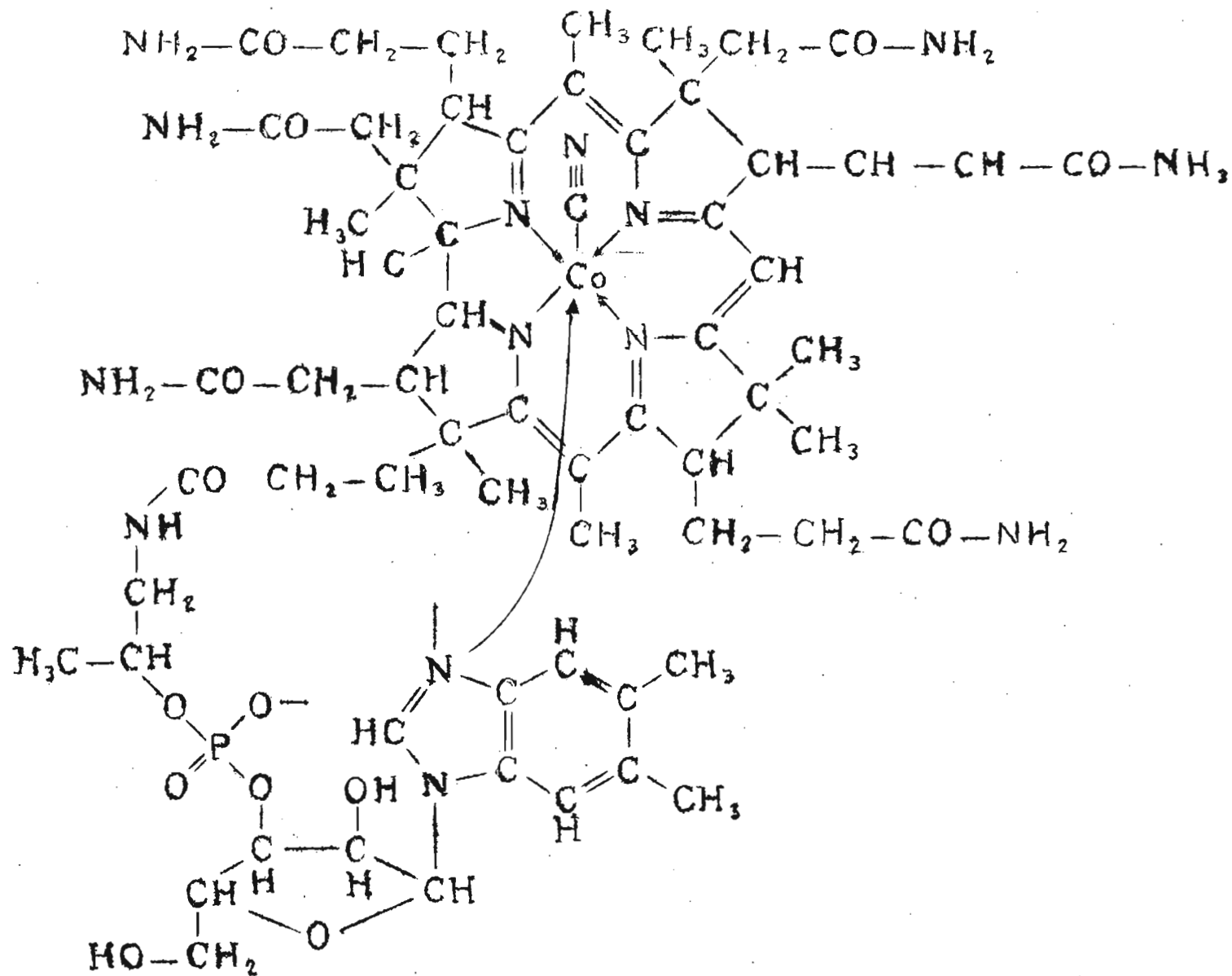
*Termostable en solución acuosa. Estabilidad máxima a un pH de 4.5-5. Inactivado por ácidos y álcalis.*

FORMULA QUIMICA:

$C_{61-64} \quad H_{86-92} \quad N_{14} \quad O_{13} \quad P_{Co}$

ESTRUCTURA QUIMICA: (ver figura adjunta)NOMENCLATURA:

*El grupo ciano de la molécula de vitamina B<sub>12</sub> está ligado de manera tan firme al cobalto, que no puede ser separado ni sustituido por otros radicales. Sin CN la molécula se denomina cobalamina y la que posee CN se llama cianocobalamina. La denominación B<sub>12</sub> se emplea como sinónimo de cianocobalamina, aunque muchas sustancias congéneres poseen actividades de vitamina B<sub>12</sub>. Existe toda una familia de cobalaminas naturales y de síntesis, según el radical que sustituye al CN. La vitamina B<sub>12</sub> es la hidroxicobalamina (acuocobalamina) en la que el radical CN es reemplazado por un OH; la vitamina B<sub>12a</sub> es la for-*



Cianocobalamina

Fórmula molecular:  $C_{63}H_{88}CoN_{11}O_{11}P$

Peso molecular: 1.355 40

ma anhídra de la  $B_{12b}$ . Cuando el radical CN es reemplazado por  $NO_2$ , se produce la vitamina  $B_{12c}$  o nitrocobalamina. La sustancia originalmente descrita como vitamina  $B_{12d}$ , es, en realidad  $B_{12b}$ . Hay otras cobalaminas: Dicianocobalamina, tiocianatocobalaminas, clorodobalamina y sulfitocobalamina. Se ha estudiado la actividad hematopoyética y neurotrópica de la vitamina  $B_{12}$ ,  $B_{12c}$  en pacientes de anemia perniciosa en recaída, y se ha descubierto que poseen más o menos la misma actividad que la cianocobalamina.

### FUENTES NATURALES DE OBTENCION

La cianocobalamina es la primera sustancia orgánica natural indispensable para la vida en la que se ha encontrado cobalto. A peso igual a la cianocobalamina es la más activa de todas las vitaminas conocidas. La única fuente natural de un compuesto es la actividad metabólica de los microorganismos; no hay pruebas de que sea elaborada en los tejidos de animales y vegetales superiores. Casi no existe en los productos vegetales excepto en las algas, vegetales de vida acuática y se sospecha que el alto contenido que suelen presentar los animales acuáticos se debe precisamente a la ingestión de los referidos vegetales; la existencia de cianocobalamina en los tejidos animales se debe a la síntesis microbiana en el tubo digestivo. Por ejemplo, la flora bacteriana de la fanja de los rumiantes produce vitamina B<sub>12</sub>; para el proceso, se necesita cobalto y la deficiencia de cobalto en los rumiantes es en realidad, deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>. En el hombre la síntesis de la vitamina se efectúa principalmente en el intestino grueso, lugar en el que no se absorbe. Las heces de los animales y el hombre suelen tener gran cantidad de vitamina B<sub>12</sub>. Las personas normales y las pacientes de anemia perniciososa excretan por las heces unos 5 microgramos de vitamina B<sub>12</sub> al día.

La cianocobalamina natural está combinada con proteínas y suele ser metabólicamente inactiva hasta que la combinación es disociada por color o proteólisis. La concentración de vitaminas en diversos productos animales y vegetales es bastante baja; por ejemplo, el hígado fresco posee menos de una parte por millón (alrededor de 500 mgs. por tonelada); la misma concentración hay en el líquido de fermentación de las especies de *Streptomyces* empleadas en el comercio como fuente abundante y barata de cianocobalamina.

Son ricos en la vitamina las almejas, el contenido de la panza del carnero y las heces de algunos animales: Hay una concentración intermedia en hígado, riñón y corazón de ternera, cordero y vaca; existe en pequeña cantidad en la carne de carnero, de res vacuno, cerdo y pollo, en la yema de huevo, algunos quesos y la mayor parte de las hortalizas; en la leche sólo hay huellas de cianocobalamina; la leche humana posee solamente 0.4 mcgs. por litro. El músculo de vaca posee de 2 a 10 mcgs. de vitamina B<sub>12</sub> por 100 gs. cosa que explica su contenido de factor extrínseco de Castle identificado como cianocobalamina.

La baja concentración de la vitamina B<sub>12</sub> en el hígado de mamíferos hace pensar que el efecto antianémico del hígado entero administrado por vía oral, observado inicialmente por Minot y Murphy en 1926, es atribuible en gran parte al ácido fólico y no a la cianocobalamina, la que es ineficaz administrada oralmente a las dosis que posee el hígado empleado; muchos años después se demostró que el ácido fólico tiene efecto hematopoyético similar al del extracto hepático en la anemia megaloblástica.



### FUNCIONES METABOLICAS

Las vitaminas  $B_{12}$  ejercen numerosos efectos importantes y diferentes sobre el organismo de los mamíferos. La cianocobalamina es indispensable para la nutrición y el crecimiento normal. Por consiguiente, nada tiene de extraño que se necesite una cantidad óptima de la vitamina para el funcionamiento de un tejido tan activo y de tan rápida regeneración como la médula ósea, que en el hombre normal produce 200.000.000 de eritrocitos por minuto; también es comprensible que la deficiencia vitamínica se refleje prontamente en la hematopoyesis anormal. La cianocobalamina es indispensable para la hematopoyesis normal por su intervención en la síntesis de nucleoproteínas y ácido nucleico, que al trastornarse puede causar anemia macrocítica megaloblástica como la característica de la anemia perniciosa.

La cianocobalamina es esencial no solamente para la maduración normal de los eritroblastos, sino también para la maduración de las células epiteliales; por ejemplo, los pacientes con recidiva de anemia perniciosa presentan anomalías características de las células de la mucosa gástrica y oral, lo que no se observa en los enfermos con remisión terapéutica. Los animales con deficiencia de cianocobalamina sufren reducción de la basofilia citoplásmica y del ácido ribonucleico (en las células hepáticas y pancreáticas). La deficiencia de Ribonucleoproteína es corregida por la administración de vitamina  $B_{12}$ .

Aunque la cianocobalamina es importante para el crecimiento de diversas especies animales (cerdo, pollo, rata, etc.) y para la puesta y la incubabilidad de los huevos cuando la dieta es deficiente, la afirmación de que favorece el crecimiento de los niños no ha sido demostrado con rigor. La vitamina tampoco ofrecerá el ritmo de crecimiento de los niños prematuros. Quizás estos hechos sean simplemente traducción, de que el in-

greso alimenticio de cianocobalamina suele ser suficiente, si no falta un factor condicionante necesario para su absorción o utilización, como el factor gástrico intrínseco de Castle, por ejemplo.

La cianocobalamina también tiene importante acción neurotrópica. Es indispensable para los procesos metabólicos encargados de la integridad funcional de las fibras mielínicas del sistema nervioso central y periférico. En la anemia perniciosa del hombre, no son raras las neuropatías periféricas la esclerosis postero lateral de la médula espinal y las alteraciones mentales.

La vitamina B<sub>12</sub> también posee efecto hipotrófico. En ciertas circunstancias, corrige o previene la infiltración grasa del hígado causada por alimentación deficiente y protege contra ciertos tipos de lesiones hepáticas provocada por agentes tóxicos. Este efecto protector guarda relación con la acción de la vitamina sobre las reacciones de transmetilación y sobre la biosíntesis y el metabolismo de los métodos lábiles y posiblemente de algunos otros fragmentos unicarbonados. Experimentos efectuados en hígado de rata deficiente en cianocobalamina indican que la transmetilación necesita la vitamina como cofactor o precursor. La conservación en serina requiere vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico; la síntesis de metionina a partir de la homocistina (por introducción de un radical metilo tras conversión de la homocistina en homocisteína) necesita cianocobalamina. Como el ácido fólico, la vitamina B<sub>12</sub> participa en la utilización de Fragmentos unicarbonados; ambas sustancias permiten el crecimiento de animales (pollos, ratas) sometidos a alimentación correcta de metilo lábil y que tiene homocistina como precursor de la metionina; este efecto se debe a que favorecen la utilización de ciertas fuentes del radical metilo de la metio-

La cianocobalamina está encargada de mantener en forma reducida sulfhidrúlicos; esta forma es necesaria para el funcionamiento de muchos sistemas enzimáticos S-H- activados.

La vitamina estimula la reducción de los grupos S-S y retarda la oxidación de las radiales S-H. De este modo, favorece la formación de metionina disminuyendo la oxidación del radical S-H de la Homocisteína, el aceptor de metilo. También se ha superado que la cianocobalamina tiene influencia en el metabolismo de las grasas porque facilita la reducción de la forma S-S de coenzima A a la forma activa S-H. La carencia de cianocobalamina se caracteriza por mengua de la concentración de S-H (principalmente glutatión) en los eritrocitos y el hígado; este trastorno cede mediante la administración de B<sub>12</sub>: En la deficiencia de ácido fólico o de hierro no se observa esta disminución.

Quizá por su influencia sobre el metabolismo de las proteínas, la vitamina B<sub>12</sub> contrarresta el efecto catabólico proteínico de la cortisona y el retardo del crecimiento consecutivo al hipertiroidismo provocado experimentalmente. La cianocobalamina así mismo tiene importancia en el metabolismo de los carbohidratos y las grasas. La vitamina B<sub>12</sub> también aumenta la esterilización del caroteno y la acumulación de la vitamina "A" en los tejidos, sea porque mejora la absorción del caroteno o porque favorece su conversión enzimática.

PATOGENIA Y NATURALEZA DE LA ANEMIA PERNICIOSA

En 1926, Minot y Murphy hicieron el importantísimo descubrimiento de que la administración de hígado era eficaz en el tratamiento de la anemia perniciosa. Esta observación fundamental, basada en parte en los trabajos en animales de Whipple, Robson, Robbins y sus colaboradores, y las aportaciones subsiguientes de muchos investigadores condujeron al descubrimiento de la vitamina B<sub>12</sub> y son la médula de nuestros actuales conocimientos sobre la causa y el tratamiento de la anemia perniciosa y las anemias megaloblásticas afines.

Según se considera actualmente, la clásica anemia perniciosa Addisoniana es una enfermedad carencialmente del hombre, causada por la falta de una sustancia específica segregada normalmente por la mucosa gástrica.

Esta sustancia, llamada factor gástrico intrínseco de Castle, es indispensable para la absorción del factor alimenticio (extrínseco) ahora identificado como cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) de la que se necesita una pequeña cantidad (1 a 2 microgramos diarios) para la maduración normal de los eritrocitos y otros elementos figurados de la sangre, para la integridad funcional del sistema nervioso central, y para que la mucosa lingual y la del tubo digestivo permanezcan sanas. Así pues, la anemia perniciosa es considerada como el conjunto de síntomas originados de una deficiencia prolongada, como alteraciones características en la lengua, mucosa gástrica, médula ósea y sistema nervioso. Algunos de los síntomas y signos, como debilidad, disnea, dolor precordial, ictericia ligera y edemas, resultan de la intensa anemia megaloblástica; otros son atribuibles al tubo digestivo, como la lengua lisa y dolorosa (lengua de Hunter), la dispepsia y la diarrea; entre los del sistema nervioso central se cuentan los siguientes: Neuritis periférica, esclerosis posterolateral, a-

alrededor de 80% presentan alteraciones neurológicas de ota magnitud y aproximadamente 60% tienen trastornos cerebrales. La anemia no causa, por si misma, lesiones nerviosas, que pueden aparecer antes de manifestarse el trastorno hematológico y a veces persisten y evolucionan después que se ha normalizado en cierto grado el cuadro hematológico; además, la administración de ácido fólico corrige las manifestaciones hematológicas, pero no las neurológicas. Si la deficiencia no se domina, la anemia perniciosa es mortal; cuando se corrige la deficiencia, la remisión terapéutica es completa y la muerte se difiere indefinidamente.

Antes de descubrirse que la vitamina B<sub>12</sub> es el factor alimenticio indispensable para evitar la megaloblástica de la médula ósea y otras manifestaciones de anemia perniciosa y que la ociocobalamina es la sustancia activa del extracto hepático, el agente desconocido que posee el hígado se denominaba "Principio Hepático" "Factor antianémico" y "Factor de maduración eritrocítica". De tiempo atrás se sabía que la deficiencia alimenticia prolongada y las anomalías intestinales, solas o en combinación, causaban anemias megaloblásticas: Después, gracias a las notables investigaciones efectuadas durante más de un cuarto de siglo por Castle y colaboradores, se descubrió la importancia etiológica de un factor gástrico.

Castle postuló que para la formación y la utilización del factor antianémico era necesario lo siguiente:

- 1- Un factor extrínseco presente en los alimentos;
- 2- Un factor intrínseco contenido en la mucosa gástrica normal y segura en el jugo gástrico.
- 3- Interacción de los factores extrínsecos en el tubo digestivo, antes de su absorción, de la

- 4- El almacenamiento de esta sustancia en el hígado y quizá su transformación en la glándula.
- 5- Lesión del principio antianémico a los tejidos hematopoyéticos y utilización en la hematopoyesis normoblastica. Consideraremos a continuación cada uno de estos requisitos indicando las modificaciones pertinentes.

### 1. Factor Extrínseco:

Los trabajos de Castle indicaban con claridad que un Factor termoestable alimenticio reaccionaba de alguna manera con el jugo gástrico normal y formaba el precursor del principio hepático. El procedimiento para descubrir la presencia del factor extrínseco en determinado alimento era muy laborioso; había que tratar el alimento con jugo gástrico normal y someter el producto resultante a ensayo en pacientes con anemia perniciosa para valorar su facultad de producir reacción hematológica satisfactoria. El factor extrínseco resultó especialmente abundante en los animales ricos en complejo vitamínico B, pero no se pudo identificar con ninguno de los componentes conocidos de dicho complejo. Ahora se ha demostrado que el factor extrínseco está formado por la vitamina B<sub>12</sub> y sus precursores alimenticios. Aunque es bien sabido que la anemia perniciosa no es causada por alimentación defectuosa y que el ingreso de vitaminas B<sub>12</sub> en cantidad que exceda de lo normal no basta para prevenir o tratar la enfermedad, es posible que en ciertos pacientes la deficiencia alimenticia prolongada sea factor desencadenante, también existe la posibilidad de que la carencia de vitamina B<sub>12</sub> agrande o acelere los trastornos del funcionamiento gástrico características del padecimiento. Además, la dieta suficiente es de importancia en la prevención y el tratamiento de ciertas anemias megaloblasticas afines, aunque en algunas de ellas, la deficiencia del ácido fólico es de primordial importancia.

## 2. Factor Intrínseco:

Castle y asociados demostraron que la alteración patológica fundamental en la anemia perniciosa es la incapacidad de la mucosa gástrica para segregar la sustancia que ellos denominaron "Factor Intrínseco". Hoy se sabe que este factor es indispensable para la absorción de la vitamina B<sub>12</sub>. Por ejemplo, una dosis oral de cianocobalamina que de otro manera sería ineficaz ( 5 microgramos diarios) suscita reacción hematológica en pacientes de anemia perniciosa en recidiva si se ingiere simultáneamente con una pequeña cantidad de jugo gástrico normal, (10 cc); el jugo gástrico de los pacientes con anemia perniciosa es ineficaz. El exceso de factor intrínseco no aumenta la absorción de vitamina B<sub>12</sub> en las personas normales. No se ha determinado la estructura Química del factor intrínseco ni se ha aislado en forma pura. Sin embargo, se conocen muchas de sus propiedades Químicas; es inestable, termolábil, no dializable y la digestión péptica lo destruye. Se ha supuesto que el factor intrínseco es apoliteína, lesogima, ácido fólico y aminopolipetidasa, hipótesis hoy inválidas. Queda por precisar si es mucoproteína, mucopolisacárido o si sencillamente está absorbida en una de esas sustancias.

La secreción de factor intrínseco es independiente de la capacidad gástrica para segregar ácidos clorhídrico y pepsina. No obstante, en la anemia perniciosa de ordinario el estómago no segrega pepsina y casi invariablemente, sino es que siempre, no secreta ácido clorhídrico libre ni como reacción a la histamina. Estos hechos parecen indicar un trastorno básico y generalizado de la función gástrica, que afecta la secreción de enzimas y la de ácido. En las observaciones efectuadas en autopsia, durante la cirugía o mediante gastroscopía, se han visto numerosas anomalías gastrointestinales. Sobresale entre ellas la característica atrofia de la mucosa

gástrica, mas marcada en el fondo del órgano; el epitelio glandular es delgado o ha desaparecido y a menudo ha sido reemplazado por epitelio "intestinal". La desaparición de las células acidófilas explica la aquilia. Muchos enfermos presentan también enteritis crónica. Las lesiones mejoran con la administración de cianocobalamina o extracto hepático, pero persiste la atrofia de la mucosa y nunca se recupera la capacidad del estómago para secretar factor intrínseco, ácido clorhídrico y pepsina, aunque desaparezcan todos los demás signos y síntomas de la enfermedad.

En el hombre el fondo del estómago es el principal lugar en que se segrega factor intrínseco. Aunque las regiones del cardias y el píloro tienen cierta actividad. Así, pues, la localización del proceso degenerativo observado histológicamente en la anemia perniciosa concuerda perfectamente con el lugar de secreción del factor intrínseco en el estómago normal. En el cerdo, el factor intrínseco es formado principalmente en los folículos pilóricos del estómago, pero el duodeno también es fuente importante; así se explica la eficacia terapéutica del duodeno y el píloro pulverizado del cerdo en la anemia perniciosa. La valoración del factor intrínseco se efectúa fácil y rápidamente administrando simultáneamente por vía oral el extracto o secreción gastro intestinal y cianocobalamina con Co.60 (cobalto radiactivo) a enfermos de anemia perniciosa en remisión y determinando la cantidad de Co.60 eliminada por las heces, si hay factor intrínseco activo la absorción de cianocobalamina vuelve a cifras normales. Otros métodos de coloración se basa en la cantidad de vitamina con Co.60 ingerida que toma el hígado; la cantidad se mide por cuentas de destellos efectuadas sobre la proyección cutánea del hígado y el resto del abdomen.



### 3. "INTERACCION" DEL FACTOR INTRINSECO Y EL EXTRINSECO Y ABSORCION DEL PRODUCTO DE DICHA INTERACCION.

Puesto que tanto el factor extrínseco como el intrínseco son ineficaces si se administra aislados a pacientes de anemia perniciosa y son muy eficaces administrados simultáneamente, mucho se ha estudiado la naturaleza de la "interacción" entre ambos factores. La idea de Castle era, que una reacción química, originaba el producto antianémico, que en seguida era absorbido, la demostración posterior de que la cianocobalamina es al propio tiempo el factor extrínseco y el principio hepático anuló tal hipótesis. A pesar de lo mucho que se ha investigado, son incompletos los datos acerca del lugar preciso de la interacción (si acaso ésta se efectúa) entre el factor intrínseco y la vitamina B<sub>12</sub> y acerca de los factores que la gobiernan. Es probable que ocurra principalmente en la primera parte del intestino delgado, es decir, en el lugar de absorción de la cianocobalamina.

Es indudable que el factor intrínseco permite la absorción de la vitamina, pero desconocemos el mecanismo del fenómeno. Por las pruebas indirectas de que el intestino sólo absorbe la vitamina B<sub>12</sub> combinada, se ha enfocado la atención sobre la facultad del factor intrínseco y de otras sustancias para ligar la cianocobalamina. La vitamina combinada no sirve para el crecimiento bacteriano es más termolabile que el propio factor intrínseco y fácilmente desdoblable por proteólisis. Hasta en los enfermos con anemia perniciosa la cianocobalamina se combina en cierta medida, independientemente del factor intrínseco. Además, la actividad de combinación de diversas fracciones del estómago de cerdo no guarda relación directa con sus actividades de factor intrínseco y algunas pruebas indican que el factor de combinación y el intrínseco son distintos.

### 4. ALMACENAJE DEL PRINCIPIO ANTIANEMICO.

La vitamina B<sub>12</sub> se deposita en su formación original en los tejidos y no como producto de la interacción de los factores intrínsecos y extrínseco, según opinaba Castle. El hígado del hombre y de muchos animales domésticos y silvestres estiman la hematopoyesis normal en la a

El almacenamiento de la vitamina  $B_{12}$  en el hígado y otros lugares no es indispensable para la hematopoyesis normal; la médula ósea puede obtener directamente la cianocobalamina de la sangre. El hígado de los pacientes de anemia perniciosa en recidiva carece de vitamina  $B_{12}$  lo que se ha demostrado por ensayo microbiológico y por ensayo clínico del extracto de dicho hígado. La falta de almacenaje de la vitamina simplemente traduce la insuficiente absorción alimenticia y no es un defecto primario en la anemia perniciosa.

50. LIBERACION DEL PRINCIPIO ANTIANEMICO POR EL HIGADO Y UTILIZACION DE LA MEDULA OSEA

La vitamina almacenada en el hígado y otros lugares es utilizada por los órganos hematopoyéticos para formar glóbulos rojos normales. No hay pruebas de que en la anemia perniciosa séptica o en cualquier otra anemia megaloblástica estén alterados la liberación de la vitamina de los lugares de almacenaje su utilización por la médula ósea.

LA MEDULA OSEA EN LA ANEMIA PERNICIOSA Y LA ACCION DE LA CIANOCOBALAMINA  
SOBRE ELLA.

La carencia de cianocobalamina origina hiperplasia megaloblástica de la médula ósea porque no alcanzan la madurez los precursores de los eritrocitos. De los megaloblásticos proceden los eritrocitos megalocitos observados en la sangre periférica; el megaloblástico es una célula patológica que se observa principalmente en la anemia perniciosa, pero también en la anemia por deficiencia de ácido fólico. El examen de la médula ósea descubre desarrollo anormal de megacariocitos y leucocitos y detención del desarrollo de los precursores leucocitarios. Esto explica la trombocitopenia y los leucocitos polimorfonucleares grandes, "viejos", con núcleo dividido en muchos segmentos. Así, pues, la vitamina  $B_{12}$  es indispensable para todas las funciones hematopoyéticas de la médula ósea; su falta origina una paumielopatía, y la vitamina está encargada principalmente del metabolismo de las células primordiales o quizá de los elementos reticuloendoteliales de la médula ósea.

Son bien conocidos los efectos morfológicos que produce la cianocobalamina en la médula ósea megaloblástica de la anemia perniciosa y de algunas anemias afines; sin embargo, no se conoce el proceso bioquímico de esta acción ni la relación entre la vitamina  $B_{12}$  y otros factores hematopoyéticos, sobre todo el ácido fólico.

La vitamina  $B_{12}$  (en cantidades de microgramos) y el ácido fólico (en miligramos). Funcionan como enzimas en la formación del ácido nucleico; los defectos del metabolismo de este ácido impiden la eritropoyesis normoblástica y ocasionan megaloblastosis de la médula ósea.

## ABSORCION, DISTRIBUCION, DESTINO Y ELIMINACION

A pesar de lo mucho que se ha investigado, los datos de la absorción, el destino y la excreción de cianocobalamina en el organismo de los mamíferos son incompletos y se obtienen con dificultad, pues las cantidades de vitamina son del orden de microgramos por centímetros cúbicos en los líquidos biológicos; el cuerpo del hombre adulto normal posee sólo unos cuantos miligramos. La inyección de extracto hepático de concentración conocida de cianocobalamina produce niveles plasmáticos y urinarios semejantes a los que cabría esperar con dosis equivalentes de vitamina B<sub>12</sub> cristalizada.

En la exposición que sigue nos limitaremos a mencionar los resultados obtenidos en el hombre normal y en pacientes con anemia megaloblástica.

### Absorción

La cianocobalamina se absorbe rápidamente de los lugares de inyección intramuscular y subcutánea, al cabo de una hora de la inyección intramuscular, la concentración en el plasma llega al máximo. La absorción por el tracto gastrointestinal, reducido hasta en las personas normales, está supeditada a numerosos factores, de los cuales el más importante es el factor gástrico intrínseco de Castle. Cuando falta esta sustancia, se absorbe muy poca vitamina.

El defecto fundamental en la anemia perniciosa es la carencia de factor intrínseco. La absorción se efectúa principalmente en el duodeno; en el estómago y parte inicial del yeyuno hay cierta absorción, y ninguna en el íleon. En el Colon, lugar en que la flora microbiana produce cianocobalamina endógena, la absorción es insignificante; esto se evidencia en que es necesario administrar grandes dosis por vía rectal (1000 a 3000 microgramos) para suscitar reacción hematológica.

La absorción gastrointestinal de la vitamina está disminuída en pacientes con reacción gastrointestinal extensa, anastomosis intestinal etc. La facultad de absorber vitamina B<sub>12</sub> exógena también es menor en los viejos, quizá porque la mucosa gástrica segrega menos factor intrínseco. La anemia perniciosa es sumamente rara en los jóvenes.

La cianocobalamina que posee los alimentos está combinada con proteínas de la que es separada por las enzimas proteolíticas en la primera porción del tubo digestivo.

La parte no absorbida es tomada por las bacterias; casi toda esta fracción se elimina con las heces, degradada en parte.

La cianocobalamina es absorbida por el epitelio intestinal sólo después de que ha sido ligada. La combinación es termolábil y probablemente se efectúe en la luz del intestino o durante el proceso de absorción; en esta combinación intervienen otras sustancias, además del factor intrínseco, puesto que el fenómeno ocurre también en los enfermos de anemia perniciosa.

La combinación se hace en el intestino y no en el hígado, pues la inyección intramesentérica de una dosis determinada de cianocobalamina libre en personas normales, suscita excreción urinaria de vitamina libre comparable en números redondos a la eliminación provocada por la inyección intramuscular, la cianocobalamina combinada no es eliminada por el riñón.

#### Distribución y Destino.

La cianocobalamina se deposita en muchos tejidos del organismo, quizá en todos, principalmente en hígado, estómago, riñón, cerebro y músculos. En el adulto normal el hígado posee unos 400 a 1000mcgo. la reserva orgánica total se ha calculado en varios miles de microgramos. Como la necesidad diaria de vitamina es de unos 2 microgra-

sólo aparecen cuando la reserva ha sufrido una intensa deplección, al punto de que la concentración de cianocobalamina en el plasma está por debajo del límite inferior de lo normal, es fácil comprender por que pueden pasar meses o años después de suspender el tratamiento para que aparezca recidiva olínica.

Tras la absorción aparece cianocobalina en el plasma, en forma libre y combinada. El nivel de vitamina B<sub>12</sub> en el plasma es mayor en jóvenes que en ancianos y hay informes de que es superior al normal en los diabéticos. La vitamina está en combinación laxa con la fracción Alfa globulina del suero; cuando se añade cantidad excesiva del fármaco o suero humano normal invitrio, la cantidad de vitamina combinada aumenta al doble.

### Excreción

Sólo la cianocobalamina libre es accesible a la eliminación rectal. En el hombre la vitamina B<sub>12</sub> inyectada por la vena se elimina por filtración glomerular. En las personas normales no sometidas a administración de cianocobalamina, la excreción úrinaria total es de 0.2 mogs. al día o menos aún. Gran parte de cianocobalamina libre dada por vía parenteral es excretada por la orina. El porcentaje eliminado guarda relación a la dosis inyectada, así se retiene más vitaminas B<sub>12</sub> tras la administración de dosis pequeñas que de cantidades mayores. Como la facultad del plasma para combatir la cianocobalamínica es escasa y como se necesitan varias horas para que la vitamina se combine con la alfa globulina, la parte principal se excreta en el término de 8 horas. La concentración urinaria suele normalizarse al cabo de 24 horas.

La cianocobalamina atraviesa la placenta y pasa de la madre al feto.

## PREPARADOS VIAS DE ADMINISTRACION Y DOSIS

Disponemos de numerosos inyectados y orales para el tratamiento de la anemia perniciosa y anemias afines. Las pruebas actuales inducen que la vitamina B<sub>12</sub> es la sustancia terapéuticamente activa en la anemia perniciosa y que el extracto hepático obra por la cianocobalamina que posee. El preparado de elección es la vitamina B<sub>12</sub> administrada por inyección intramuscular, también existen preparados para inyecciones subcutáneas con buena absorción. Los preparados orales son mucho más caros; y cuando falta el factor intrínseco de Castle la absorción es escasa por el tubo gastrointestinal y no siempre puede confiarse que produzca remisiones en pacientes graves o que logren tener la evolución de lesiones neurológicas.

### Inyecciones de Cianocobalamina: U.S.P.

Es el preparado de la sustancia que posee cobalto y es eficaz en la anemia perniciosa: se obtiene del hígado o especialmente como producto metabólico de microorganismos adicionados (bacterias y actinomicetos). La vitamina se presenta en polvo cristalino higroscópico de color rojo oscuro, soluble en agua al 1.80. Es inactivado por los ácidos y bases muy fuertes pero es muy estable a la temperatura ambiente en solución salina fisiológica y puede calentarse en autoclave durante 15 minutos a 121° C sin que se altere.

Se expende en frascos de 5-10cc. disuelta en solución salina isotónica para administración intramuscular, cada centímetro cúbico posee 10, 15, 30, ó 50 microgramos de cianocobalamina. El fármaco es más barato que el extracto hepático para la administración parental, produce menos molestias en el lugar de inyección y no suscita reacción de hipersensibilidad.

### Cianocobalamina en Concentrado de Factor Intrínseco U.S.P.

Este preparado se expende para uso oral en cápsulas y tabletas. Es una mezcla de vitamina B<sub>12</sub> (Factor extrínseco) y estómas e intestinos

intrínseco parcialmente purificado). Que facilita la absorción del primero. La actividad hematopoyética del preparado se valoriza por ensayo en pacientes con anemia perniciosa en recidiva y se expresa en unidades orales USP. De ordinario cada tableta o cápsula posee media unidad oral USP. La cantidad equivalente de una unidad oral USP, tiene actividad de vitamina  $B_{12}$  correspondiente como máximo a 15 microgramos de cianocobalamina y no más de 300 microgramos (sobre base seca) del concentrado de factor intrínseco. El preparado es caro. La unidad sobresaliente de este preparado oral es que puede administrarse a enfermos que reusan someterse a terapéutica parenteral.

### Inyección del Hígado

(Extracto Hepático para uso Parenteral) USP. Es la solución acuosa esterilizada de la fracción soluble y termostable del hígado de mamíferos; inyectado por vía intramuscular a pacientes con anemia perniciosa, provoca la característica reacción hematopoyética. El extracto hepático es eficaz en estos enfermos gracias a la cianocobalamina que posee: es más, su actividad, según ensayo microbiológico se expresa en valor de vitamina  $B_{12}$ . El hígado inyectable se expende en ampollas de 1, 5 y 10 cc., tiene de 10 a 20 microgramos de actividad de cianocobalamina por cc. El hígado inyectable crudo USP, se produce suspendiendo el proceso de obtención en determinado estadio de manera que el producto final, procede directamente de una solución que posee no más de 70% de alcohol en volumen se expende en ampolletas de 1, 10 y 30 cc. de solución acuosa estéril. Cada cc. cubico tiene actividad equivalente a 1 ó 2 microgramos de cianocobalamina. El preparado está destinado principalmente al tratamiento de la anemia macrocítica en lactante mujeres embarazadas, etc. que si bien guarda relación con la anemia perniciosa, no reacciona necesariamente a la vitamina  $B_{12}$  o, el extracto hepático parenteral muy purificado y concentrado no hay pruebas de que el extracto no refinado posea algunas sustancias necesarias para el tratamiento de la anemia perniciosa que no existe en el extracto concentrado y purifi-



### Solución Hepática

*Extracto Hepático líquido USP.* Este preparado oral posee el extracto hepático USP en solución acuosa o hidroalcohólica. Es caro, de sabor desagradable y posee las mismas desventajas que el extracto hepático desecado.

La dosis mínima para el paciente con anemia perniciosa en remisión es de una unidad oral USP al día. Este preparado se emplea raramente.

### Estómago Pulverizado USP

Este preparado oral es el polvo granuloso desecado obtenido del estómago de cerdo. Su actividad es destruida por el calor, es de suponerse que el polvo no debe ingerirse con líquidos o alimentos calientes. Su eficacia se debe al factor intrínseco y el factor extrínseco. Es muy poco usado.

### PREPARADOS ANTIANEMICOS DE PREDIGONADOS

A pesar que la anemia perniciosa es poco frecuente, el número de preparados comerciales para el tratamiento de esta enfermedad aumenta año por año. Muchos médicos emplean este medicamento sin discernimiento; esta costumbre no sólo ocasiona gastos inútiles para el paciente, sino que puede serle verdaderamente perjudicial puesto que suele oscurecer la verdadera naturaleza del padecimiento. Por ejemplo, la reacción favorable producida por la cianocobalamina en un enfermo con anemia macrocítica derivada al carcinoma gástrico puede oscurecer y retardar el diagnóstico exacto, el empleo de este fármaco en el tratamiento de la neuritis periférica no se ha diagnosticado claramente, puede oscurecer la anemia perniciosa subyacente. El empleo de mezclas de sustancias hematopoyéticas multiplica la posibilidad de cometer errores similares. Muchos preparados antianémicos son una mezcla de hígado, estómago y ácido fólico, hierro, cobalto, cobre y vitamina B<sub>12</sub>, muchas

otras vitaminas y hasta hormonas en gran cantidad. Straus ha expuesto las razones que hay para no emplear dichas mezclas "El tratamiento de perdigonada es deplorable por muchas razones. La mayor parte de estas mixturas no poseen la cantidad suficiente de cualquiera de sus exponentes para producir el efecto máximo. El enfermo paga no sólo la sustancia que necesita sino también fármacos innecesarios. La terapéutica de la anemia con estos preparados puede oscurecer en tal medida el cuadro clínico que imposibilita la valorización precisa de las necesidades terapéuticas subsiguientes. La mayoría de los enfermos con anemia perniciosa addisoniana necesitan tratamiento durante toda la vida, en tanto que casi todos los enfermos con anemia por deficiencia de hierro, una vez mejorados permanecen así a menos que reaparezca la causa original; por consiguiente, a un enfermo en quien no se ha diagnosticado con certeza la anemia perniciosa, se administrará hígado y hierro y el paciente se restablece, es imposible saber cuál fue la sustancia activa. Si en este momento se suspende el tratamiento, en caso de tener anemia perniciosa el paciente, más tarde o más temprano recaerá, además corre el riesgo que esta recidiva sea fundamentalmente neurológica y que avance hasta lesionar de manera irreparable la médula espinal, antes de que se identifique la naturaleza del padecimiento. Por otra parte, si la anemia es por deficiencia de hierro y se continúa al tratamiento combinado de hígado y hierro, el paciente se ve obligado a someterse a los gastos e incomodidades de tomar un preparado de hígado que no necesita.

#### Vías de Administración

Las vías más convenientes para administrar cianocobalamina o extracto hepático es la intramuscular. Ya hemos mencionado las muchas desventajas de la administración oral en la anemia perniciosa.

El precio es el de los más importantes tomando en cuenta que el

que se suministre en grandes dosis (más de 100 veces la vía intramuscular) o se combine con una fuente de factor intrínseco, la administración sublingual no ha dado resultado. La experiencia preliminar administrando la vitamina por insuflación ha dado resultados alagüños; la cianocobalamina se inhala como polvo (a la manera de rape) o por nebulización disuelta en solución salina fisiológica. La absorción pulmonar es suficiente y la dosis necesaria para suscitar reacción hematológica adecuada son del orden de las inyectadas por vía intramuscular. Este procedimiento inocuo poco costoso, ofrece una alternativa útil de la inyección parenteral en pacientes escogidos.

### Dosificación

La dosificación de cianocobalamina o extracto hepático en la anemia perniciosa depende de varios factores: Producto empleado, vías de administración, intensidad de la anemia, presencia de complicaciones como infección, lesiones neurológicas y por último reacción terapéutica. Para suscitar remisión inicial clínica y hematológica satisfactoria en el paciente con anemia perniciosa en recidiva y sin complicaciones, deben administrarse 30 microgramos de cianocobalamina por vía intramuscular diariamente en días alternos, hasta dar 10 dosis; a continuación se inyectan 15 a 30 microgramos una o dos veces por semana, hasta lograr la remisión completa. La dosis de mantenimiento es de 40 a 60 microgramos cada dos semanas o bien de 80 a 100 microgramos al mes. Las dosis mayores con mayores intervalos no aumenta la duración de la remisión y son poco satisfactorias, dado que la mayor parte de grandes dosis se eliminan rápidamente por la orina.

Los pacientes muy enfermos o que padecen complicaciones infecciosas o neurológicas necesitan intenso tratamiento parenteral; deben emplearse dosis iniciales y de sostenimiento mayores. Las cantidades de vitamina B<sub>12</sub> necesarias para obtener la evolución de lesiones nerviosas suele ser dos o tres veces la requerida para mantener cifras hematológicas normales. La administración de estas grandes dosis durante largo tiempo pueden convertir un fracaso en éxito.

Hay muchas pruebas que pueden determinar por completo el daño nervioso y que si el tratamiento adecuado se hizo temprano y se sostiene con constancia, puede haber considerable mejoría. El paciente sólo estará a cubierto de sufrir mayor daño del sistema nervioso cuando el volumen corpuscular medio alcanza cifras normales. La cuenta de eritrocitos debe mantenerse por encima de 4.5 millones por milímetro cúbico y el índice de color debe estar dentro de los límites normales, para saber si el tratamiento es suficiente sólo puede confiarse en el examen atento y frecuente de la sangre del enfermo y en la investigación de signos físicos.

No debe tratarse de administrar el mismo sistema terapéutico a todos los pacientes; cada enfermo se debe tratar según sus necesidades, ya que el extracto hepático y la cianocobalamina administrados por vía parenteral, no son muy caros y el tratamiento insuficiente, puede prolongar el tiempo requerido para el tratamiento o para el restablecimiento y producir incapacidad grave, más vale administrar dosis excesivas que dosis insuficientes. Los enfermos que no reaccionan con el tratamiento usual necesitan terapéutica parenterales constantes, empleando dosis muy grandes de cianocobalamina o extracto hepático. Entre las causas de rebeldía más comunes al tratamiento se cuentan las siguientes: Infección, mixedema, artritis crónica y acromegalia. Los pacientes ancianos con médula ósea arteriosclerótica, suelen requerir dosis muy elevadas de vitamina, si el paciente no reacciona ni con dosis parentéricas muy elevadas, está justificado poner en duda la potencia de los medicamentos empleados o la exactitud del diagnóstico.

En resumen, la cantidad necesaria de cianocobalamina o extracto hepático varía en cada enfermo; debe darse dosis suficientes para provocar remisión sostenida clínica y hematológicamente y para evitar o detener el ataque del sistema nervioso. En los pacientes muy enfermos o que padecen lesiones neurológicas, sólo el tratamiento parenteral proporciona resultados satisfactorios. En la anemia perniciosa

REACCIONES TOXICAS

El uso clínico de vitamina  $B_{12}$  cristalina no ha producido efectos tóxicos secundarios. La inyección es prácticamente indolora y no suscita reacción local molesta, los enfermos hipersensibles al extracto hepático toleran muy bien la vitamina  $B_{12}$ . Al contrario la inyección parenteral de extracto hepático puede causar reacción alérgica moderada o intensa. La frecuencia de estas reacciones es muy variable en los distintos grupos publicados. La reacción de hipersensibilidad puede ocurrir después de varios años de administrar sin tropiezos extractos hepáticos o al reanudar la inyección después de un período prolongado de interrupción. Puede observarse manifestaciones alérgicas locales o generales. Los efectos locales similares al fenómeno de Arthus. Entre las manifestaciones generales se encuentran las siguientes: Rubor, Cefálea, Escalo—fríos, Fiebre, Disnea, Prurito, Urticaria y una reacción semejante al choque que puede ser alarmante. La sustancia alergénica es específica para la especie y no para el órgano.

El extracto de hígado de cerdo produce con mayor frecuencia reacción alérgica que el extracto de hígado de res o carnero. Es dudoso el valor clínico de las pruebas cutáneas para descubrir la hipersensibilidad. En el episodio agudo está indicado la Epinefrina; se han empleado con éxito como medida profiláctica, los fármacos antihistamínicos. En algunos enfermos tiene utilidad un curso de desensibilización. Otros mejoran si se cambia la marca de extracto hepático. El método de elección de los enfermos con anemia perniciosa es sustituir el extracto hepático por vitamina  $B_{12}$ .

USO TERAPEUTICO

El único uso clínico perfectamente comprobado de cianocobalamina y el extracto hepático refinado es el tratamiento de la anemia perniciososa, aunque algunas anemias macrocíticas (como médula ósea megaloblástica) reacciona en grado variado, también tiene valor terapéutico en caso de espru tropical y no tropical. Así mismo está indicado después de realizar una gastroctomía ante la posibilidad de deficiencia de factor intrínseco.

Existe otro estado especial de anemia perniciosa provocada por la infección de las lombrices que sirven de cebo para la pesca (posiblemente el parásito utiliza la vitamina  $B_{12}$  en el tracto intestinal). La concentración de esta vitamina también suele encontrarse en las embarazadas y los ancianos.

La vitamina  $B_{12}$  se ha usado favorablemente en el tratamiento de varios trastornos nerviosos no asociados a la anemia perniciosa. Se ha conseguido combatir el dolor en pacientes con neuropatías o trastornos de la nutrición y ciertos casos de neuritis diabética y neuritis dependientes del alcoholismo crónico y cirrosis hepática.

A su vez mantiene adecuadamente el control neurológico en humanos y animales, interviene en la formación de la sangre y previene afecciones hepáticas graves, tales como cirrosis y el engrosamiento. Es un factor útil en la prevención y tratamiento de todo tipo de ampolopatías especialmente taboárdutica y alcohólica, en los animales actúa como un agente importantísimo, en el desarrollo y el crecimiento. Todos los rumiantes se desarrollan bien en ausencia de la vitamina, por que ellos son capaces de sintetizarla por las bacterias del rumen.

Se ha comprobado su reacción en el metabolismo de prótidos, glúcidos y lípidos en la formación de ácidos nucleico y en los procesos de

Desde el punto de vista agrícola, también resulta interesante conocer la distribución de la vitamina  $B_{12}$  en las tierras de cultivo, pues aunque no se ha comprobado ampliamente el efecto directo de la misma sobre los vegetales, se conoce que los animales que ingieren plantas, procedentes de tierras ricas en ella, no suelen presentar los trastornos típicos de la deficiencia de vitamina  $B_{12}$  aunque el referido vegetal no acause la presencia de cobalamina en los análisis.

Una de las observaciones más importantes encontradas en lo relativo al metabolismo de las cobalaminas, es el alto contenido en las heces de enfermos con anemia perniciosa. Ese hecho demuestra que la enfermedad no se debe a un suministro incompleto de la misma, sino a la poca capacidad de absorción por parte del enfermo y estos pacientes no responden a un tratamiento por vía digestiva pero se reponen rápidamente con dosis menores administradas por vía parenteral.

### ANEMIA PERNICIOSA

En cosa de días mejoran objetiva y subjetivamente los enfermos con anemia perniciosa addisoniana a quienes se administra dosis suficientes a cianocobalamina o extracto hepático, ceden los trastornos gastrointestinales, la mucosa lingual inflamada y atrófica se normalizan. Los síntomas causados por la anemia se alivian y los valores sanguíneos vuelven a lo normal, mejoran las fuerzas, la actividad mental y el apetito del paciente, quien al cabo de varias semanas está curado sintomáticamente. Sin embargo, persiste la atrofia de la mucosa y la aclorhidia rebelde para la histamina, no se recupera la facultad del estómago para elevar el valor intrínseco de Castle. Por consiguiente la deficiencia que causa la anemia perniciosa no es curada y debe administrarse el tratamiento por toda la vida. Los enfermos con ataque al sistema nervioso central necesitan mayor tiempo para mejorar, pero el progreso de la lesión se detiene inmediatamente. La lesión de fascículos laterales de la médula espinal responde

más lentamente que las afecciones de las heces posteriores; por consiguiente, al mejorar la función de las heces posteriores pueden aparecer por vez primera la espastuidad, los reflejos exagerados el signo de Babinsky positivos etc. Esto no debe considerarse como manifestación de progreso de la lesión nerviosa.

Las complicaciones cerebrales desaparecen con lentitud. La reacción hematopoyética es la primera y más notable fase del restablecimiento y traduce con bastante exactitud la evolución del enfermo. La aspiración seriada de médula ósea indica que unas cuantas horas después de la inyección intramuscular de vitamina B<sub>12</sub> o extracto hepático desaparece la detención del proceso de maduración y las megaloblastos comienzan a transformarse en células reticuladas maduras. En el término de 48-72 horas se ha restablecido por completo la hematopoyesis normoblástica y desaparecen los leucocitos neutrófilos gigantes y los megacariocitos anormales. Conforme progresa la mejoría desaparece la anemia macrocítica, la leucopenia y la trombocitopenia. Los cambios descritos de la médula ósea pueden ser provocados por una dosis pequeña de cianocobalamina a todas luces insuficiente para lograr una remisión completa; por lo tanto, el diagnóstico puede ser enmascarado durante muchos meses, sólo debe comenzarse el tratamiento específico cuando es diagnosticada con certeza la anemia perniciosa. De dos a cinco días después de comenzada la terapéutica se observan reticulocitos en la sangre periférica; por lo general llegan al máximo después del décimo día. La forma y altura de reticulocitos depende de varios factores: Dosis de cianocobalamina, vía de administración y, sobre todo, gravedad de la anemia. El valor máximo de reticulocitos guarda relación directa con la cantidad inicial de eritrocitos; en pacientes cuya cuenta inicial de hematíes es inferior a un millón por milímetro cúbico no es raro que estas células lleguen a 50-70%. Poco después de elevarse la curva de reticulocitos se inicia el incremento de reticulocitos, y se inicia el incremento de los eritrocitos, por último llega a alcanzar valores de 4.5-5 millones por milímetro cúbico. En los enfermos graves los glóbulos rojos aumentan aproximadamente medio



millón por milímetro cúbico a la semana. La concentración de hemoglobina crece con mayor lentitud que la cuenta de eritrocitos, de aquí resulta que el índice de color elevado (hemoglobina corpuscular media) disminuye. El tamaño de los eritrocitos (volumen corpuscular medio) también disminuye. Hacia el final de la tercera semana la cuenta de reticulocitos vuelve a valores semejantes a las que presentaba antes del tratamiento y los valores hematológicos son normales de 2-4 meses.

#### ANEMIA MEGALOBLASTICA DEL EMBARAZO Y PUERPERIO

Este síndrome llamado equivocadamente anemia perniciosa suele presentar este mismo cuadro típico en la médula ósea, sin embargo en la sangre periférica la anemia es normocítica; el jugo gástrico suele presentar ácido clorhídrico libre no hay degeneración subaguda de la médula espinal. De ordinario esta enfermedad es refractoria a la cianocobalamina pero reacciona con el ácido fólico, el ácido folínico y el extracto hepático crudo.

#### ANEMIA MACROCITICA NUTRICIONAL

Los enfermos con anemia macrocítica nutricional no reaccionan con la cianocobalamina o el extracto hepático purificado a menos que la médula ósea sea megaloblástica. Esta enfermedad se debe a la absorción y asimilación deficiente hematopoyética la absorción insuficiente de vitamina B<sub>12</sub> puede ser resultado de resección gastro intestinal amplia enteritis regional mayor, utilización de la vitamina para una flora bacteriana anormal en el intestino. De ordinario la anemia megaloblástica nutricional asociada con disfunciones intestinales es causada principalmente por deficiencia de ácido ascórbico. Por consiguiente si la cianocobalamina es ineficaz debe ensayarse el ácido fólico, puede ser útil auxiliar el ácido ascórbico y extracto hepático (crudo) oral.

#### USOS DIVERSOS

La anemia megaloblástica acréstica refractoria que antes se creía causada

co hepático (ahora identificado como vitamina  $B_{12}$ ), probablemente resulte de la deficiencia de utilización de ácido fólico; de ordinario en esta anemia carecen de efecto la cianocobalamina y el extracto hepático purificado pero el padecimiento remite con ácido fólico y ácido folínico. La anemia perniciosa por "*Diphilobacterium laun*" (tenia, de los peces) a veces reacciona con cianocobalamina. La parasitación perjudica la absorción intestinal de vitamina  $B_{12}$  alimenticia; probablemente porque el bacterio céfalo absorbe la sustancia; cuando se elimina la tenia, desaparece la anemia. La anemia macrocítica asociada a cirrosis hepática de ordinario no es megaloblástica, y por lo tanto, en ella es ineficaz la cianocobalamina, sin embargo en casos excepcionales, la médula ósea es megaloblástica y en tal caso está indicada la vitamina  $B_{12}$ . La mayoría observada cuando se administra extracto hepático por su efecto beneficioso sobre las tensiones nerviosas de la anemia perniciosa, la cianocobalamina se ha empleado en diversos trastornos neurológicos como neuritis periférica, neuralgia del trigémino, esclerosis múltiple, neuropatía diabética etc.; no hay pruebas de que en estos síndromes hay deficiencia de cianocobalamina. Tiene utilidad en el tratamiento de padecimientos alérgicos y dermatológicos y que apresura el restablecimiento de la hepatitis por virus.

NALISIS

Se comenzará a describir el método microbiológico. Este ha sido ampliamente utilizado en la determinación de vitamina del grupo "B". Debido a su gran sensibilidad y su alta especificidad, estos métodos son preferidos en muchos laboratorios, especialmente para la investigación de vitaminas naturales de origen natural.

El método microbiológico ideal sería aquel que dispusiera de un microorganismo que se desarrollara especialmente en presencia de una determinada sustancia y el desarrollo, o su metabolismo dependiera directamente de la concentración de dicha sustancia.

MICROORGANISMOS USADOS CON ESTE OBJETO SON

- 1) *Lactobacillus leischmannii* 7830
- 2) *Escherichia coli*
- 3) *Euglena gracilis*
- 4) *Ochromonas malhamensis*

Utilizando una sensibilidad de un ptogramo igual a  $10^{-12}$  gramos. Los métodos microbiológicos de valorización pueden ser turbidimétricos, volumétricos y auxanográficos.

Los ensayos microbiológicos requieren en general atención constante al detalle porque la reproducción eritosa de los resultados depende de que se satisfaga todos los requerimientos nutricionales bajo la presión de un factor único limitante. Las cantidades extremadamente pequeñas del complejo de cobalaminas que soportan el crecimiento del organismo *Lactobacillus leichmannii* aumenta las precauciones necesarias para proveer un ambiente controlado.

Los métodos microbiológicos para la determinación de vitaminas se basan en la observación de que algunos microorganismos de caracte-

ductos metabólicos iónicos en presencia de vitaminas de grupo "B". Estos microorganismos se cultivan en un medio nutritivo que carece de un compuesto vitamínico determinado; el crecimiento se inhibe totalmente, cuando se añade la muestra que contiene  $B_{12}$  el medio inicialmente transparente por carencia de crecimiento, la multiplicación del organismo causa turbidez que es medida fotométricamente, también pueden determinarse cuantitativamente; por ejemplo pueden valorarse volumétricamente la mezcla de ácidos producidos por algunos microorganismos a partir de la glucosa suplementada al medio.

Si se añaden cantidades crecientes de la muestra problema, la turbidez del medio, que refleja el mayor crecimiento se incrementa gradualmente y dentro de un cierto intervalo de concentración, es directamente proporcional a la cantidad de vitamina presente, este intervalo es llamado de requerimiento para un desarrollo equivalente a la mitad del máximo "pueden compararse con gran precisión los efectos causados por la adición de la muestra problema y de una solución de referencia que contienen la vitamina pura.

El medio de cultivo líquido contiene:

- 0.75 gramos de extracto de agua soluble de levadura
- 0.75 gramos de peptona
- 1.00 gramos de dextrosa anhidra
- 0.2 gramos de fosfato monopotásico en 60 mililitro de agua
- 10. Ml. de jugo de tomate
- 1. Ml. de solución de polisobato 80 (tween 80) agua hasta 100 mililitros se ajusta a un pH de 6.8

El medio de cultivo sólido contiene

- 1.0% glucosa
- 0.75% de extracto de levadura
- 0.75% gramos de peptona de caseína

1.5% de agar

0.2% de fosfato monopotásico

0.5% de jugo de tomate

0.05% de Tween 80

PH 6.8, el cultivo se siembra en picadura se encuba a 37°

C. durante 24 horas.

Los requerimientos que deben satisfacerse para garantizar un procedimiento sencillo, reproducible y exacto, limitan notablemente el número de organismos apropiados para la determinación micro-biológica, dichos requerimientos son:

- a) El microorganismo debe ser específico para la vitamina que se ha de determinar.
- b) Las propiedades de la cepa que se emplea deben permanecer absolutamente constantes después de un prolongado período de resiembras.
- c) Las manifestaciones vitales del microorganismo (crecimiento, formación de productos metabólicos, etc.) deben proporcionar efectos graduales y fácilmente medibles dentro del intervalo óptimo, para determinar cuantitativamente.
- d) Los microorganismos empleados deben poseer un metabolismo interno, de tal modo que los análisis pueden llevarse a cabo en el menor tiempo posible.
- e) Los microorganismos utilizados no deben ser patógenos, para evitar exponer al analista el riesgo de infección y hacen innecesariamente difícil el procedimiento analítico.

Para el ensayo microbiológico de la vitamina debe confiarse principalmente en los microorganismos cuyo metabolismo y requerimiento nutritivo son más similares al hombre y animales.

#### RECUESTO BACTERIANO

La equivalencia de los inóculos se establece sobre la base del número de microorganismos viables por mililitro, el que guarda una relación

### MEDIO DE CULTIVO PARA EL ENSAYO MICROBIOLOGICO

Un medio de ensayo es un medio nutritivo de composición definida, que contiene todos los ingredientes necesarios para el crecimiento del microorganismo excepto, la vitamina que se pretende determinar.

Los únicos componentes adicionales requeridos para completar el ensayo son: las muestras problema o solución patrón que contienen vitaminas; y el inóculo bacteriano. Los medios de ensayo se preparan mezclando soluciones de distintos compuestos nutritivos en la preparación adecuada a la que le llama, solución madre o primaria. Después de mezclar adecuadamente la solución primaria, se diluye hasta 100 ml. con agua y se ajustan al pH apropiado. Esta mezcla después de filtrado se designa "medio básico". La solución empleada para la determinación microbiológica en el medio de ensayo que se prepara a partir del medio básico por adición de la solución de glucosa en la proporción adecuada.

### PREPARACION DE LAS MUESTRAS

La vitamina en estudio puede hallarse bien en estado libre o en forma combinada. Los microorganismos de ensayo responden únicamente a las vitaminas que se hallan en estado libre y con escasas excepciones son incapaces de librarlas de los componentes de alto peso molecular que pueden formar ( por ejemplo, complejos vitamínicos protídicos. Es por tanto, esencial preparar el material original para el ensayo microbiológico mediante hidrólisis preliminar. El método para librar las vitaminas de sus diversas formas combinadas es calentar la muestra en agua o en tampón pero la hidrólisis enzimática o ácido es el procedimiento más empleado habitualmente. Debido a la composición variable de la muestra por ejemplo, la naturaleza y cantidades de proteínas y almidón presentes. Cabe la posibilidad de que el método descrito para la liberación cuantitativa de la vitamina a partir de sus

En consecuencia, las condiciones de hidrólisis (concentración de ácidos, tiempo de calefacción, cantidad de enzimas), empleadas para un material desconocido, deben modificarse en varias series de experimentos paralelos para comprobar si la vitamina se libera cuantitativamente y cuáles son las condiciones óptimas para ello, la hidrólisis ácida pueden llevarse a cabo en tiempo comparativamente menor pero no siempre conduce a los mejores resultados.

#### DILUCION DE LA MUESTRA

La solución de la muestra o el extracto del material en estudio se diluye de tal modo, que el resultado aproximado previsto caiga en la región central, mas lineal de la curva de calibración. Si la concentración de la vitamina en la muestra problema es totalmente desconocida, la dilución óptima para el análisis microbiológico debe determinarse por experimentos previos. Para el análisis microbiológico se preparan como mínimo tres diluciones óptimas a partir de la solución problema.

#### SOLUCION DE CALIBRACION

Las curvas de calibración se determinan para cada análisis y es válida exclusivamente para el mismo. Las diluciones de las soluciones de calibración se mezclan con el medio de ensayo; se inoculan y se incuban en las mismas condiciones que las diluciones de la muestra.

#### SOLUCION CONTROL

Es aconsejable comprobar en cada experimento microbiológico la esterilidad de los medios de cultivo por medio de control, llevando a cabo simultáneamente que no se inocula, pero que se trata de formar idéntica a las muestras y soluciones de calibración. Cuando se realizan las medidas fotométricas ninguno de los controles empleados debe mostrar turbidez medible.

### MEDIDA

La lectura se realiza tan pronto como la solución de calibración correspondiente a la menor concentración empleada presente características medibles (turbidez).

Para la valoración nefelométrica el contenido de los tubos se agita previamente.

Una vez eliminadas las burbujas de aire, la turbidez se mide en un fotómetro apropiado. La turbidez puede expresarse indistintamente como extinción, como transmitancia, o simplemente por lectura en el galvanómetro, si es imposible realizar inmediatamente las lecturas, el crecimiento posterior puede evitarse pipeteando una gota de una solución de formaldehído al 1% en cada tubo de cultivo y agitar.

### ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

El análisis de la vitamina  $B_{12}$  por procedimiento físico-químico es muy difícil debido a la concentración excepcionalmente baja —comparada con las otras vitaminas B— en que esta vitamina se halla en la naturaleza.

En consecuencia, este tipo de análisis puede aplicarse únicamente a soluciones relativamente concentradas de vitaminas  $B_{12}$ , preparaciones farmacéuticas y, en algunos casos, extractos de hígado y concentrados de piensos ricos en vitamina  $B_{12}$  siempre que sea posible separar la vitamina  $B_{12}$  de las impurezas interferentes.

### MÉTODOS

Los métodos físico-químicos más importantes para la determinación de vitamina  $B_{12}$  se basan en la absorción de la luz de la propia vitamina  $B_{12}$  en solución acuosa o bien en la determinación fotométrica del grupo cianuro de la cianocobalamina.



ABSORCION DE LA LUZ POR LA CIANOCOBALAMINAANALISIS = ESPECTROFOTOMETRICO DE LA VITAMINA B12

Las soluciones acuosas de cianocobalamina presentan los siguientes máximos de absorción.

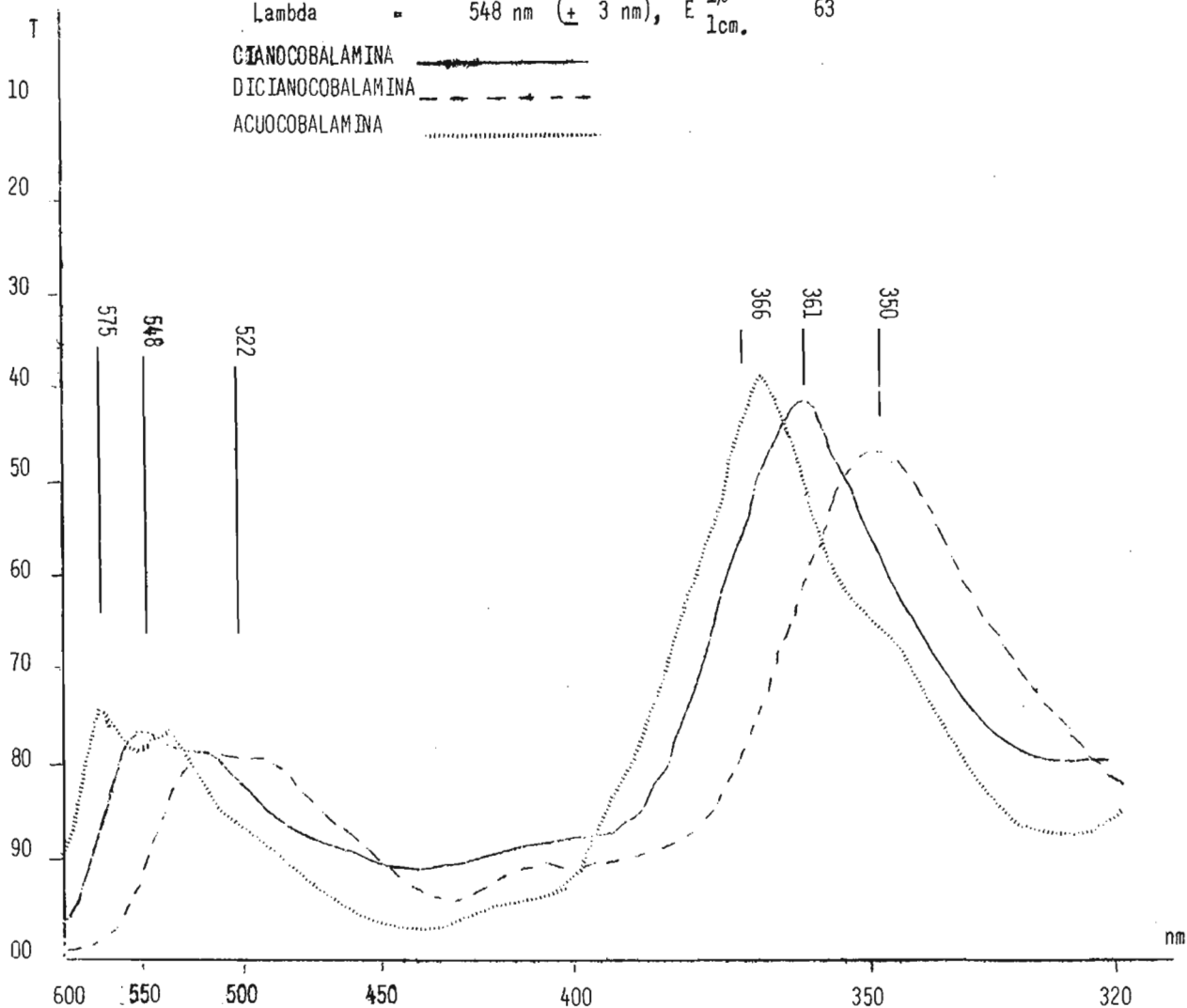
$$= 278 \text{ nm ( 1nm) } E_{1\text{cm.}}^{1\%} = 115$$

$$= 361 \text{ nm ( 1nm) } E_{1\text{cm.}}^{1\%} = 207$$

$$= 548 \text{ nm ( 3nm) } E_{1\text{cm.}}^{1\%} = 63$$

Lambda - 278 nm ( $\pm$  1 nm), E  $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$  115  
 Lambda - 361 nm ( $\pm$  1 nm), E  $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$  207  
 Lambda - 548 nm ( $\pm$  3 nm), E  $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$  63

CIANOCOBALAMINA —————  
 DICIANOCOBALAMINA - - - - -  
 ACUOCOBALAMINA .....



Espectros de absorción de: acetato de acuocobalamina, cianocobalamina y dicianocobalamina en solución acuosa.  
 Concentración: 1.76 mg. 100 ml. (aprox. 0.000013 molar): cubeta de 1 cm. de espesor.

$I_a$  absorción a 361 nm. de las soluciones de vitamina  $B_{12}$  (inyectables, gotas) diluidas a una concentración de 1-2 mg/ml., se miden en el espectrofotómetro frente al disolvente, en una cubeta de cuarzo de 1 cm. Si las soluciones de vitamina  $B_{12}$  contienen aditivos conservadores que puedan absorber luz en la misma región del espectro, no es suficiente emplear agua como blanco. La industria preparadora puede preparar soluciones testigo cuya composición sea idéntica a la empleada para las soluciones de vitamina  $B_{12}$  (pero omitiendo la adición de este producto), pudiéndose medir, por tanto, la absorción de la luz frente a estos blancos idóneos en el control analítico de las soluciones de vitamina  $B_{12}$ .

$$\frac{E_{361}}{0.207} = \text{mg. de cianocobalamina/100 ml. de solución (cálculo)}$$

Si la "absorción ajena" es demasiado pronunciada (quizás debido a los conservadores que contenga la solución), es aconsejable aislar la vitamina antes de proceder a la medida espectrofotométrica. La determinación de la absorción roja visible de la vitamina  $B_{12}$  a 548nm ( $\pm 3$  nm) puede emplearse, asimismo, para la valoración aproximada del contenido en vitamina  $B_{12}$  de una solución. Este procedimiento proporciona resultados menos exactos debido a que la extinción específica a 548 nm. es comparativamente menor. ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 63$ ).

#### INTERFERENCIA POR OTRAS COBALAMINAS

No debe olvidarse un hecho importante: los espectros de absorción de todas las cobalaminas son muy similares respecto a la posición del máximo de absorción. La coloración de todos los derivados es de un rojo profundo. El punto de absorción máxima de la acuo-(hidroxo-)cobalamina, que se forma a partir de la cianocobalamina (por ejemplo, mediante su exposición a la luz) se halla a 351 nm. Difiere, por tanto, tan sólo 10 nm. del máximo de la cianocobalamina. La descomposición de la vitamina  $B_{12}$  con formación de acuo-(hidroxo-)cobalamina puede detectarse únicamente si el desplazamiento del máximo a 361 nm. hacia menores longitudes de onda supera los límites de incertidumbre

de la escala de longitudes de onda del espectrofotómetro empleado. La acuo-(hidroxo-) cobalamina puede constituir el 5-10 por 100 de la cianocobalamina pura sin que pueda registrarse el desplazamiento característico en el máximo de sorción. Se ha demostrado que estas preparaciones son todavía activas en el hombre. Sin embargo, aplicando un estricto criterio de precisión, el método espectrofotométrico para la valoración de vitamina  $B_{12}$  debe considerarse como un procedimiento que proporciona resultados razonablemente adecuado únicamente para el control de dosis en preparaciones farmacéuticas. El valor del método es menor cuando se aplica a pruebas de estabilidad -por ejemplo, después de su conservación en condiciones ambientales en las que predomina un fuerte calor (climas tropicales)-, ya que, aparte de la acuo-(hidroxo-) cobalamina todavía activa, en la descomposición de la vitamina  $B_{12}$  pueden formarse productos inactivos que difieren notablemente de las cobalaminas activas en su absorción a la luz visible y ultravioleta. Por todo ello, cuando el máximo de absorción ya no se localiza a  $361 \pm 1$  nm. y  $548 \pm 3$  nm, debe intentarse conseguir el aislamiento de la fracción de cianocobalamina pura por cromatografía.

#### ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA VITAMINA $B_{12}$ EN MEZCLAS

(por ejemplos, en preparados hepáticos y concentrados de piensos).

Ya se ha indicado que los inyectables o gotas de vitamina  $B_{12}$  pura, constituyen los únicos casos en los que puede medirse directamente la absorción de la cianocobalamina a 361 ó 548 nm., ya que las otras sustancias presentes en estas soluciones no afectan la absorción a las longitudes de onda crítica. Aunque este criterio es válido para las formas galénicas recientemente preparadas, los cambios que pueden producirse durante su conservación o a causa de las condiciones desfavorables de temperatura pueden hacer necesaria la previa eliminación de las sustancias interferentes a el aislamiento de la vitamina  $B_{12}$ . En la gran mayoría de los casos, tales como en los complejos vitamínicos B y en las preparaciones polivitamínicas, extractos hepáticos y concentrados para piensos, la separación previa es absolutamente in-

dispensable para el análisis exacto de la vitamina  $B_{12}$ .

Las resinas cambiadoras de iones del tipo "Amberlite" se emplean habitualmente para el aislamiento de la vitamina  $B_{12}$  y para la separación de los productos de descomposición de la misma a partir del extracto 3 y 4. Puesto que la vitamina  $B_{12}$  es una sustancia neutra, no es absorbida por cambiadores de aniones ni cationes, mientras que ciertos productos procedentes de la descomposición de la cianocobalamina y otros compuestos activos hidrosolubles presentes en los preparados vitamínicos tienen propiedades básicas o ácidas y son retenidos, por tanto, por los cambiadores catiónicos o aniónicos. Los cambiadores iónicos derivados de la célula -tan ampliamente utilizados en estos últimos años en la química de proteínas- son especialmente adecuadas para la purificación de las soluciones de vitamina  $B_{12}$ .

Una desventaja de la purificación empleando combinadores iónicos es que, normalmente, las columnas deben ser lavadas con volúmenes muy considerables de agua con el fin de eluir cuantitativamente la vitamina  $B_{12}$  para el análisis espectrofotométrico. En consecuencia, la solución de vitamina  $B_{12}$  resulta diluida varias veces en relación a la solución original, alcanzándose concentraciones a las cuales la extinción obtenida es insuficiente para una medida espectrofotométrica exacta. Sin embargo, puede concentrarse la vitamina  $B_{12}$  por extracción con fenoles. Las pérdidas de vitamina  $B_{12}$  tienen lugar a lo largo del proceso de purificación por cromatografía de ión-cambio pueden conocerse con exactitud mediante la adición de cianocobalamina marcada con cobalto radioactivo y la determinación subsiguiente del factor de recuperación por medida de la radioactividad antes y después de la purificación. Este método es laborioso y requiere disponer de las instalaciones adecuadas para trabajar con sustancias radiactivas. Van Mello ha descrito un método sencillo para el aislamiento de la vitamina  $B_{12}$  por filtración a través de una columna de Amberlite XE-97, en el cual se evitan en gran medida las pérdidas de materiales. Aunque la columna consiste en una resina de ión cambio

en la parte superior de la columna y se eluye específicamente sólo cuando se adiciona una mezcla de dioxano-ácido clorhídrico o de tetrahidrofurano-ácido clorhídrico la mayoría de las impurezas y otras sustancias interferentes presentes en el extracto se eliminan previamente de la columna mediante tratamiento con diversos disolventes. Dado que la vitamina  $B_{12}$  se eluye rápidamente con una pequeña cantidad de líquido (forma una banda muy estrecha y concreta), se consigue simultáneamente un enriquecimiento de la solución. La experiencia ha demostrado que este método, concebido originalmente para el análisis de vitamina  $B_{12}$  en preparados farmacéuticos, puede emplearse también para el análisis de vitamina  $B_{12}$  en concentrados de piensos. Incluso en el caso de productos crudos de fermentación, cuyos extractos tienen una coloración parda de mayor o menor intensidad, se consigue una purificación tan completa de la vitamina  $B_{12}$  que su curva de absorción se corresponde totalmente con la de la vitamina  $B_{12}$  patrón.

### REACTIVOS

Amberlite XE - 97, producida por Rohm & Hass, Philadelphia, USA.

Hidróxido sódico 1 N

Acido clorhídrico 0,1 N.

Dioxano-ácido clorhídrico: se mezclan 60 ml. de dioxano para cromatografía con 10 ml. de ácido clorhídrico 1N y 30 ml. de agua.

Tetrahidrofurano-ácido clorhídrico: Se mezclan 60 ml. de tetrahidrofurano para cromatografía con 10 ml. de ácido clorhídrico 1 N y 30 ml. de agua.

Acetona 85 por 100: se mezclan 85 ml. de acetona G.R. con 15 ml. de agua.

Solución de cianuro potásico al 5 por 100: se disuelven 5 g. de cianuro potásico G.R. en 95 ml. de agua.

Solución de ácido cítrico: se disuelven 10 g. de ácido cítrico en 90 ml. de agua.

Solución tampón pH 4. 65 g. de citrato sódico G.R. y 50 g. de ácido cítrico se disuelven en agua hasta 1.000 ml. Si es necesario, se a-

Lana de vidrio (LAB)

p-clorofenol crist.

Mezcla para la extracción de vitamina B<sub>12</sub> a partir de las soluciones acuosas: se disuelven 50 g. de p-clorofenol en 100 ml. de tetracloruro de carbono G.R.

1-Butanol para cromatografía.

Acido sulfúrico diluido: una parte (v/v) de ácido sulfúrico 95-97 por 100 (d-1.84) G.R. se adiciona cuidadosamente, enfriando y agitando, a nueve partes de agua.

Papel indicador universal.

Vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) para bioquímica.

Se agita la resina Amberlite XE 97 con agua y se deja reposar la mezcla durante toda la noche. Se decanta el líquido turbio sobrenadante y la resina se agita de nuevo con agua. Transcurridos diez minutos, se decanta de nuevo el sobrenadante. Se repite este lavado hasta que los líquidos sobrantes sean prácticamente transparentes e incoloros.

Cuando se ha decantado la última porción de líquido de lavado, se añade hidróxido sódico 1 N y se deja actuar sobre el cambiador iónico durante media hora, aproximadamente. Se elimina el alcali y la resina se lava con agua hasta que los líquidos presenten un pH neutro. Se decanta el agua y la resina se mantiene sumergida en tampón pH 4 durante algún tiempo. Se vierte la cantidad suficiente de esta mezcla en el tubo cromatográfico (de 2 cm. de diámetro aproximadamente) hasta que se obtiene una columna de alrededor de 10 cm. de altura, una vez la resina ha sedimentado totalmente. Se elimina el líquido y se añade nueva cantidad de tampón pH 4. Se cierra la columna y se ladea adecuadamente para conseguir una íntima mezcla del adsorbente con la solución tampón, dejando acto seguido que la columna de resina sedimente lentamente. La solución tampón se elimina gota a gota, abriendo la llave inferior de la columna. El pH de los líquidos efluyentes debe ser = 4, aproximadamente. El tratamiento con tampón pH 4 debe repetirse

se, si fuera necesario, hasta que se alcance este pH en los líquidos efluyentes. Finalmente, se elimina el líquido hasta que su nivel quede a unos mm. por encima de la parte superior de la columna de resina. En este momento, el cambiador iónico está dispuesto para su empleo.

#### AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE LA VITAMINA B<sub>12</sub>

En el caso más sencillo, es decir, cuando la solución de cianocobalamina no contiene otras cobalaminas ni productos de descomposición de la vitamina B<sub>12</sub> se pipetea directamente sobre la columna un volumen exactamente medido de la misma. La solución debe contener entre 100 y 250 ug. de cianocobalamina y hallarse a un pH comprendido entre 4 y 6.

Para el análisis de la vitamina B<sub>12</sub> total, expresada en cianocobalamina (por ejemplo, cuando se controlan los niveles de cobalamina en extractos hepáticos o en soluciones de vitamina B<sub>12</sub> que contienen probablemente cierta cantidad de acu- o hidroxocobalamina), se convierte previamente todas las cobalaminas en cianocobalamina por tratamiento con cianuro potásico. En un vaso de precipitados se trata una solución que contenga alrededor de 100 a 250 ug. de vitamina B<sub>12</sub> con ml. de solución de cianuro potásico; se ajusta el pH entre 4-6 (con papel indicador universal) empleando una solución de ácido cítrico (tención: trabájese en vitrina) y se conserva en una vitrina de gases de buen tiro durante quince-veinte minutos. A continuación, la solución se vierte sobre la columna de resina debidamente preparada. El vaso de precipitados se lava con unos pocos mililitros de una mezcla compuesta por 40 ml de tampón pH 4 y 60 ml. de agua y los líquidos de lavado se añaden a la columna.

#### ANALISIS DE COMPRIMIDOS Y GRAGEAS.

Para analizar, la vitamina B<sub>12</sub> en comprimidos o grageas, que contenen-



mente . El polvo obtenido se dispersa con agua y la suspensión obtenida se trasvasa a un matraz Erlenmeyer, lavando adecuadamente con 30-50 ml. de agua. Se añaden 5 ml. de la solución de cianuro potásico y la mezcla se calienta en baño de vapor durante quince, veinte minutos. La suspensión se enfría y se ajusta a pH 4-6 con solución de ácido cítrico (atención: realícese esta operación en vitrina, debido a la producción de ácido cianhídrico); se mantiene en la vitrina durante veinte minutos aproximadamente y la solución sobrenadante se vierte sobre la columna de resina debidamente preparada. El residuo se lava con dos porciones de 5 ml. de agua. Los líquidos de lavado se centrifugan y el sobrante se deoanta, asimismo, sobre la columna.

#### ANALISIS DE VITAMINA B<sub>12</sub> EN PIENSOS CONCENTRADOS

La extracción de la vitamina B<sub>12</sub> a partir de concentrados de piensos se realiza de forma similar. Se disgrega con agua una cantidad del concentrado que contenga previsiblemente entre 100 y 250ug. de vitamina B<sub>12</sub>. La suspensión acuosa se traslada a un vaso de precipitados con la ayuda de 20-50 ml. de agua, se añaden 2 ml. de la solución de cianuro potásico y la mezcla se calienta sobre baño de vapor durante treinta minutos. Este tratamiento no sólo convierte la vitamina B<sub>12</sub> existente a la forma ciano, sino que libera a la vitamina de sus formas combinadas con proteínas. Una vez enfriada la mezcla, se ajusta a pH 4-6 con solución de ácido cítrico (papel indicador universal, procédase en vitrina) y se deja permanecer en la vitrina durante 20 minutos. Acto seguido, se centrifuga a la velocidad suficiente para permitir una separación completa. La solución sobrenadante se vierte sobre la columna de resina ya preparada y el residuo se lava con dos porciones de 5-10 ml. de agua. Los líquidos de lavado se centrifugan y los sobrenadantes se adicionan, asimismo, a la columna.

La cianocobalamina puede también determinarse, con excelentes resultados, mediante el procedimiento de la resina cambiadora de iones, cuando se halla en soluciones diluidas de vitamina  $B_{12}$  (alrededor de 1-2 ug. de vitamina  $B_{12}$  por ml.). En este caso, el volumen de la solución problema percolado a través de la columna debe ser de 50 a 100 ml. o incluso mayor. No existe inconveniente alguno que impida tratar con el cambiador iónico una solución acuosa pura de la concentración indicada. Sin embargo, estas concentraciones tan bajas (1-2 ug/ml.) de vitamina  $B_{12}$  no se hallan normalmente en soluciones de vitamina  $B_{12}$  pura, sino en preparaciones combinadas tales como jarabes o gotas para su empleo oral, es precisamente cuando se manejan estas preparaciones farmacéuticas, cuya viscosidad es notablemente alta, cuando la filtración a través de la columna de resina es más difícil y, a veces, impracticable. En estos casos la vitamina  $B_{12}$  puede enriquecerse por extracción con tenoles antes del tratamiento en la columna de resina. El método consiste en añadir dos gotas de la solución de cianuro potásico a un volumen de la solución (diluido a 50-100 ml. con agua, si la viscosidad es alta) que contenga, como mínimo, 50 ug de vitamina  $B_{12}$  en un embudo de separación (Squibb). La mezcla se agita vigorosamente. La solución resultante se extrae primeramente con 10 ml. de la mezcla de clorofenol y otras dos veces con 5 ml. de la misma. Los extractos clorofenólicos se combinan en otro embudo de decantación, se diluyen con 10 ml. de carbono y 10 ml. de 1-butanol y la mezcla se agita vigorosamente con dos porciones de 5 ml. de agua, dejando que se separen perfectamente las fases después de cada adición de agua. Las capas acuosas se añaden sobre la columna de resina debidamente preparada. Una vez eliminada la fase acuosa, la ampolla de separación se lava con unos pocos ml. de tampón pH diluido (40 ml. tampón pH 4 y 60 ml. de agua) y los líquidos de lavado se vierten, asimismo, sobre la columna de Amberlite.

Tan pronto como la solución muestra que contiene la vitamina  $B_{12}$ , ha percolado a través de la columna y su nivel se halla únicamente 1-2 mm. por encima de la superficie de la resina, se añaden sucesivamente por

fluyentes emerjan prácticamente desprovistos de coloración. Entonces la columna se lava con 50-100 ml. de acetona al 65 por 100 y, finalmente, con otra porción de ácido clorhídrico 0.1 N.

Es muy importante, cuando la columna se lava con ácido clorhídrico, acetona y de nuevo ácido clorhídrico, que los líquidos efluyentes finales se hallen totalmente desprovistos de coloración. En consecuencia, el volumen de los líquidos de lavado dependerá exclusivamente de la naturaleza y cantidad de las impurezas presentes. Aparte del color rojizo propio de la vitamina  $B_{12}$  absorbida -que se localiza principalmente en la parte superior de la columna-, no deben permanecer otras coloraciones extrañas en la resina cambiadora. Cuando ello se consigue, la elución de la vitamina  $B_{12}$  proporciona, habitualmente, un eluato transparente que presenta el color típico de la cianocobalamina y que contiene este producto prácticamente puro.

### ELUCION

Cuando el lavado de la columna ha finalizado y el ácido clorhídrico empleado en el último lavado se halla únicamente a 1-2 mm. por encima de la superficie de la resina, se pipetea sobre la misma 20 ml. de dioxano ácido clorhídrico o un volumen similar de tetrahidrofurano-ácido clorhídrico para la elución de la vitamina  $B_{12}$ .

### DIOXANO - HCl

La mezcla de dioxano-ácido clorhídrico se utiliza siempre que la vitamina  $B_{12}$  situada en la parte superior de la columna tenga el color rojo característico y no se observen otras sustancias de tonalidad parduzca en la columna. Este es el caso que se presenta normalmente cuando se emplean preparaciones farmacéuticas simples y que contienen cantidades relativamente elevadas de vitaminas  $B_{12}$  siempre que la columna haya sido cuidadosamente lavada.

TETRAHIDROFURANO-HCl

En cambio, es necesario la elución con tetrahidrofurano-ácido clorhídrico cuando se analiza la vitamina  $B_{12}$  en piensos concentrados. Incluso en el análisis de especialidades farmacéuticas puede darse el caso de que ciertos materiales acompañados de coloración pardo-amarillenta no pueden eliminarse fácilmente de la banda propia de la vitamina  $B_{12}$  a pesar de un lavado cuidadoso y repetido.

Estas sustancias se comportan en la columna de forma análoga a la vitamina  $B_{12}$ ; asimismo, acompañan a la vitamina cuando se eluye con dioxano-ácido clorhídrico. Se eliminan ulteriormente durante la extracción con clorofenol.

Tan pronto como la primera porción de eluyente (dioxano- o tetrahidrofurano-ácido clorhídrico) pasa a través de la columna, se forma un anillo rojo bien definido que se desplaza gradualmente hacia abajo. Inmediatamente antes de que ésta banda alcance la lana de vidrio que sustenta la columna de resina, se elimina con papel de filtro el líquido que pueda permanecer en el tubo de salida.

Si se emplea dioxano-ácido clorhídrico como líquido eluyente, se recoge el eluato coloreado en un matraz aforado de 10 ml. Se sigue pasando la solución eluyente hasta que el líquido fluye totalmente desprovisto de la coloración característica (suele conseguirse después de recoger 5 ml. de eluato, aproximadamente). Es importante procurar que exista siempre una capa de dioxano-ácido clorhídrico por encima de la columna mientras se está recogiendo el eluato de vitamina  $B_{12}$  si fuera necesario, debe añadirse mayor cantidad de líquido para que no se seque el extremo superior de la columna. Después de la adición de 4 ml. de ácido clorhídrico 0.1 N. el contenido del matraz aforado se

diluye hasta la señal de aforo (10 ml.) con ácido clorhídrico dioxano.

Se filtra, si es preciso, a través de un buen papel de filtro. (banda azul).

Cuando se emplea tetrahidrofurano-ácido clorhídrico para eluir, los líquidos efluyentes no se recogen en un matraz aforado, sino en un pequeño matraz de fondo redondo. Tan pronto como el efluente se halla totalmente desprovisto de la coloración característica de la vitamina  $B_{12}$ , se añaden 3-4 ml. de agua al contenido del matraz y se elimina el tetrahidrofurano por evaporación, realizada a baja presión y con calefacción suave. La solución clorhídrica residual de vitamina  $B_{12}$  se transfiere a un embudo de decantación, lavando adecuadamente con un poco de agua y se extrae con dos porciones de 3 ml. de la mezcla de clorofenol los extractos clorofenólicos combinados se lavan con 5 ml. de ácido sulfúrico 2 N. La capa de clorofenol lavada se trata con una gota de solución de cianuro potásico, 20 ml de cloroformo, 5 ml. de 1-butanol y 5 ml. de agua. Al agitar, la vitamina  $B_{12}$  retorna cuantitativamente a la fase acuosa (capa superior) cuando las fases líquidas se han separado perfectamente. La capa orgánica se extrae de nuevo con 5 ml. de agua y la fracción correspondiente se añade al extracto acuoso obtenido anteriormente. Esta solución se filtra a través de un pequeño filtro de "banda azul", recogiendo el filtrado en un matraz aforado de 20 ml. Se diluye hasta la señal de aforo con los líquidos procedentes de un cuidadoso lavado del filtro con agua, mezclando completamente mediante agitación.

#### MEDIDA

Las soluciones que se han diluido hasta la señal de aforo en los matraces aforados respectivos se valoran frente a agua en un espectrofotómetro, empleando cubetas de 1 cm. en el primer caso (matraz aforado de 10 ml.) y de 2 cm. para el segundo (matraces

CALCULO

$$\frac{E_{361} \times 100}{0.207} = \text{ug. de vitamina } B_{12} \text{ en la muestra de partida,}$$
 donde  $E_{361}$  = extinción a 361 nm. del eluato de dioxano-ácido clorhídrico diluido hasta 10 ml. y medido en una cubeta de 1 cm. o extinción de la solución obtenida por el método del tetrahidrofurano, diluida hasta 20 ml. y medida en una cubeta de 2 cm; 0.207 = extinción a 361 nm. de 100 ug de cianocobalamina en 10 ml. de solución, medida en una cubeta de 1 cm. ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 207$ ).

OBSERVACIONES

Cuando la fracción de vitamina  $B_{12}$  se purifica por extracción con la mezcla de clorofenol, puede ocasionarse un pérdida del 5. al 10 por 100 de la vitamina  $B_{12}$ . Si este método se emplea para determinaciones sistemáticas es aconsejable conducir simultáneamente una valoración comparativa en la cual se trata una solución de cianocobalamina pura. De esta forma puede corregirse la pérdida observada en el análisis de control al realizar el cálculo del contenido en vitamina  $B_{12}$  de la muestra. Sin embargo en la mayoría de los casos es suficientemente exacto referir todos los análisis a un factor de pérdida inicialmente determinado y establecido. Por ejemplo, si se pierde el 10 por 100, los resultados se multiplican por el factor 100/90; si se pierde el 5 por 100, se multiplican por el factor 100/95.

TIEMPO REQUERIDO

El análisis de vitamina  $B_{12}$  en preparaciones complejas, tales como los concentrados de piensos, que deben eluirse con tetrahidrofurano-ácido clorhídrico y extraerse después tal como se ha indicado,

requiere aproximadamente una jornada completa de trabajo, Si la determinación no puede completarse en un sólo día, puede interrumpirse bien sea antes de la elución de la vitamina (siempre que la columna se deja en medio clorhídrico 0.1 N; la acetona debe desplazarse completamente con ácido clorhídrico) o bien después de eliminarse el tetrahidrofurano del eluato de vitamina  $B_{12}$  por destilación. La solución de vitamina  $B_{12}$  dejada la vigera en ácido clorhídrico es estable hasta el próximo día. Sin embargo, la vitamina  $B_{12}$  no es estable en las soluciones que contienen dioxano o tetrahidrofurano. Si el máximo de la solución problema no corresponde a  $361 \pm 1$  nm. y se plantean dudas acerca de la pureza de la fracción de vitamina  $B_{12}$  que se está valorando es aconsejable determinar la curva de absorción de la solución problema entre 330 y 600 nm. Si no se dispone de un espectofotómetro con registrador acoplado, es suficiente medir la absorción en el mínimo a 430 nm. y en el máximo a  $548 \pm 3$  nm. , junto con la determinación a 361 nm. La relación  $E_{548}$  debe hallarse comprendida entre 3.0 y 3.5 y la relación  $E_{548} / E_{430}$  entre 2.4 y 3.0. Si los cocientes obtenidos caen dentro de estos límites. La fracción de vitamina  $B_{12}$  es suficientemente pura. El contenido en vitamina  $B_{12}$  calculado de acuerdo con la fórmula indicada anteriormente, proporcionará unos resultados muy cercanos al valor real.

No siempre es posible purificar la vitamina  $B_{12}$  mediante paso a través de columna y la subsiguiente extracción, de tal modo que la curva de absorción de la solución problema corresponda exactamente con la solución de cianocobalamina pura. Este caso puede presentarse tanto en el análisis de productos crudos de fermentación (piensos concentrados con vitamina  $B_{12}$ ) como cuando se valoran preparaciones farmacéuticas de vitamina  $B_{12}$  parcialmente alteradas. Las impurezas interferentes - productos de degradación y otras cobalaminas presentes en productos naturales- muestran con frecuencia unas características de absorción muy similares a

las de la vitamina  $B_{12}$ . Su influencia sobre la forma de la curva de absorción de la solución problema de vitamina  $B_{12}$  es normalmente muy escasa, pero originan las suficientes para que pueda detectarse con certeza que se comportan de forma parecida a la vitamina  $B_{12}$  activa. En estos casos, es aconsejable comprobar los resultados analíticos por la determinación microbiológica de la vitamina  $B_{12}$ .

Otros métodos para confirmar los resultados analíticos es el siguiente: Se neutraliza exactamente el eluato de tetrahidrofurano-ácido clorhídrico (pH 7.0. medidor de pH electrodo de vidrio) con hidróxido sódico 0.1 N. No es necesario eliminar el tetrahidrofurano por destilación. La solución neutra se percola a través de una columna de 1.5 cm. de diámetro y 5 cm. de altura de cambiador celulósico. La columna se compone, concretamente, de partes iguales de P-celulosa (celulosa fosforilada) y de CM-celulosa (carboximetilcelulosa), y retiene las sustancias catiónicas. La cianocobalamina es neutra y, en consecuencia, no es retenida por esta columna cambiadora de cationes: al tratar con agua libre de anhídrido carbónico (previamente hervida y enfriada rápidamente) se recupera cuantitativamente en el matraz receptor. El eluato obtenido se diluye con agua en un matraz aforado de 50 ml. hasta la señal de aforo. La medida se realiza a 361 nm. en una cubeta de 5 cm. frente a agua. Cuando las sustancias interferentes son de naturaleza catiónica - lo cual, de acuerdo con nuestra experiencia, constituye el caso más frecuente - la curva de absorción del eluato acuoso de la columna de celulosa corresponde perfectamente con la curva obtenida con vitamina  $B_{12}$  pura. Dado que la solución inicial debe diluirse considerablemente al eluir la columna con agua, suele ser necesario concentrar de nuevo la solución diluida por extracción con clorofenol antes de proceder a la medida espectrofotométrica.



ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA ACUO--(HIDROXO--) COBALAMINA  
(VITAMINA B<sub>12</sub>)

ABSORCIÓN DE LA LUZ

El máximo de absorción del acetato anhidro de acuocobalamina en solución acuosa es el siguiente:

$$X = 274 \text{ nm } (\pm \text{ nm}) , E \frac{1\%}{1\text{cm.}} = 145$$

$$X = 351 \text{ nm } (\pm \text{ nm}) , E \frac{1\%}{1\text{cm.}} = 188$$

$$X = 522 \text{ nm } (\pm \text{ nm}) , E \frac{1\%}{1\text{cm.}} = 60$$

Las correspondientes extinciones específicas de la Hidroxocobalamina, cuyo peso molecular (1.346,39) es menor que el del acetato de acuocobalamina (1.406,44) debido al peso molecular del ácido acético, son superiores a las del acuoderivado (factor 1.045), pero los máximos de absorción se hallan localizados en las mismas longitudes de onda. Únicamente el pico a 351 nm es adecuado para el análisis espectrofotométrico:

La determinación de acuocobalamina en inyectables que no contengan otros componentes activos además de esta vitamina, es extremadamente sencilla. Se diluye la solución, si es necesario, hasta alcanzar una concentración de 1 mg. de acuocobalamina en 100 ml. y se mide frente a agua en un espectrofotómetro, a 351 nm ( $\pm 1$  nm).

$$\frac{E_{351}}{0.188} = \text{mg. de acetato de acuocobalamina en 100 ml. de la solución problema.}$$

$$\frac{E_{351}}{0.196} = \text{mg. de acuocobalamina base (o hidroxocobalamina) en 100 ml. de la solución problema.}$$

Lógicamente, este método tan sencillo únicamente proporciona resultados precisos con preparados que contengan exclusivamente acuocobalamina pura o sales puras de acuocobalamina. La curva de absorción entre 300 y 600 nm da una idea aproximada de la pureza del componente activo.

La conversión de la acuocobalamina a la forma ciano (cianocobalamina) mediante adición de cianuro, constituyen un método de control muy útil cuando se emplea el procedimiento que acabamos de describir. En un matraz aforado de 100 ml. se añade 1 ml. de la solución de cianuro potásico a un volumen de la solución problema que corresponda a 1 miligramo de acuocobalamina, aproximadamente. A continuación se adiciona, gota a gota, la solución de ácido cítrico hasta que el pH de la solución sea alrededor de 5.7 (vitrina). Se diluye la solución con agua hasta la señal de aforo y se realiza la medida en el espectrofotómetro a 361 nm. (máximo de la cianocobalamina) frente a agua. Si se emplea una cubeta de 1 cm., el contenido en acuocobalamina se calcula como sigue:

$\frac{E_{361}}{0.207} \times A = \text{mg de acuocobalamina (hidroxo-)} \text{ en } 100 \text{ ml. de la}$

solución problema donde  $A = \frac{\text{p.mol. acuocobalamina}}{\text{p.mol. cianocobalamina}}$

Cuando se calcula el contenido en acetona de acuocobalamina, el factor A es igual a 1.038. Para la acuocobalamina base e hidroxo-cobalamina, se emplea el factor  $A = 0.933$ .

#### ANALISIS EN MEZCLAS

Si la solución problema contiene otras sustancias que pueden absorber en la región de 350 nm. la acuocobalamina puede aislarse normalmente, empleando una columna de Amberlita y determinarse espectrofotométricamente después de proceder a su elución con dioxano-ácido clorhídrico. Indistintamente, la vitamina  $B_{12}$

puede purificarse como forma acuosa o bien convertirse en cianocobalamina por tratamiento con cianuro, realizando la medida de la forma ciano.

#### PURIFICACION CON CAMBIADORES DERIVADOS DE CELULOSA

Los cambiadores iónicos derivados de la celulosa son apropiados para el aislamiento del catión acuoso-cobalamina a partir de mezclas con cianocobalamina y otros factores vitamínicos  $B_{12}$  y para la separación de productos de degradación. Las cobalaminas dadas que pueden producirse por descomposición hidrolítica, son retenidas cuando se emplea dietil-aminoetil-celulosa (cambiador iónico), mientras que la ciano- y como cobalamina pasan sin adsorberse a través de la columna. Estos dos derivados se separan ulteriormente utilizando cambiadores catiónicos derivados de celulosa, siendo preferible el empleo de una mezcla de carboxi-metil-celulosa y fosforilada (CM-celulosa y P-celulosa). Esta columna adsorbe la acuocobalamina, pero no la cianocobalamina. La acuocobalamina retenida puede eluirse con ácido acético diluido, determinándose luego en el eluato por valoración espectrofotométrica. El comportamiento de la "vitamina  $B_{12a}$ " en las columnas cambiadoras de cationes demuestra claramente que este derivado posee propiedades catiónicas en soluciones neutras y débilmente ácida y que se halla al estado de acuocobalamina y no como hidroxocobalamina.

#### CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La acuocobalamina puede diferenciarse de la cianocobalamina empleando placas de Silica-gel G. Para la detección cualitativa se aplican a una placa activada de Silica-gel G, alrededor de 20 ml. de una solución problema que contenga 5-10 ug. de acuocobalamina. Se procede al desarrollo ascendente de la placa hasta unos 2/3 del recorrido total con 1:1 metanol y agua (tiempo de desarrollo: aproximadamente una y media horas). La acuocobalamina permanece inmediatamente encima del punto de partida, mientras que la cianocobalamina se desplaza hasta la zona media de la placa.

B I B L I O G R A F I A

1. ABBOT *Vitaminas Revisión de Conceptos*
2. VELASQUEZ LORENZO, Profesor *Terapéutica con sus fundamentos de Farmacología Experimental*  
9a. Edición Editorial Científica Médico 1963
3. CESPEDES PONCE, Gicela, doctora *Distribución de vitamina B<sub>12</sub> (cobalamina) en materiales Cubanas 1962*
4. GOODMAN, Luis.S. y Alfred, GILMAN *Bases de Farmacología de la Terapéutica Traducida al Español, de la segunda edición en inglés por A. Palacios López y H. Vela Treviño, México 1962, Tomo II Editorial UTEHA*
5. GEORGIA GOMEZ, María *Valoración de vitamina B<sub>12</sub> en preparaciones Farmacéuticas Nacionales por medio del Lactobacillus. Leichmannii, Tesis previa a la opción del título de licenciada en Química y Farmacia, El Salvador 1970*
6. LITTER, Manuel *Farmacología Buenos Aires. El Ateneo c. 1960*
7. STROBECKER ROLF, Heinz M. Hernning *"Análisis de Vitaminas" Métodos comprobados, Traducidos por F. Maynor Patrocinado por E. Merck A.G. Darmstadt. Editorial Paz Montalvo. Madrid 1967*