

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

“Valoración de la Vitamina B-12 en Preparaciones Farmacéuticas
Nacionales por medio del Lactobacillus Leichmannii”

TESIS

PRESENTADA POR

MARIA GEORGIA GOMEZ

PREVIA A LA OPCION DEL TITULO DE

LICENCIADA EN

QUIMICA FARMACEUTICA

NOVIEMBRE DE 1970



7
015.328
d 633x
1970
F.C.Q.
Pg. 1

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR BIBLIOTECA DE
INVENTARIO: 10

U N I V E R S I D A D D E E L S A L V A D O R

Rector en Funciones

Arq. Gonzalo Yáñez Díaz.

Secretario

Dr. Joaquín Figueroa Villalta.

F A C U L T A D D E C I E N C I A S Q U I M I C A S

Decano

Dr. Julio César Morán Ramírez.

Secretario

Dr. Elías Alvarado Cornejo.

ASESOR DE TESIS :

Dra. Concha Lemus de Bendix.

JURADO CALIFICADOR DE TESIS:

Dra. Concha Lemus de Bendix.

Dra. Hilda Mercedes P. de Novoa.

Lic. José Jaime Lozano.

DEDICATORIA :

A mis Padres

Rodolfo Antonio Gómez
María Concepción de Gómez.

A mi Abuela

María Osorio v. de Hernández.

A mi Esposo

Guillermo Reyes Guillén.

A mis Hermanos

Rodolfo Antonio, Ana Bessy, Gloria
Estela, Elisa Concepción, Francis-
co José, Alcides, Rolando Aquiles-
y Roberto Alfredo.

A la Facultad de Ciencias Químicas.

A la Universidad de El Salvador.

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

A la Dra. Concha Lemus de Ben--
dix y Dra. Hilda Mercedes P. de
Novoa, por la asesoría prestada.

Al Departamento de Química Far-
maceútica, quien facilitó todos
los medios para que se elabora-
ra el presente trabajo.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION	1
II.	METODOS MICROBIOLOGICOS. Generalidades. ...	4
III.	METODO SEGUIDO EN EL PRESENTE TRABAJO	20
IV.	RESULTADOS OBTENIDOS	33
V.	CONCLUSIONES	41
VI.	RECOMENDACIONES	42
VII.	BIBLIOGRAFIA	43

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

Este trabajo tiene el propósito de contribuir al control de calidad de las Especialidades Farmacéuticas, en lo - que se refiere al contenido de Vitaminas B₁₂ utilizando el - método microbiológico, como sistema de determinación y valo- ración de la cianocobalamina. Los métodos de valoración pue- den ser físicos, químicos y microbiológicos. Pero, los pri- meros análisis de Vitaminas se hicieron empleando método Bio- lógicos. Los efectos específicos producidos por las vitami- nas en animales de experimentación sirvieron de base para la valoración cuantitativa de los mismos. Los métodos Químicos, Físico-químicos y microbiológicos se han ido desarrollando - gradualmente. Todavía hoy, los métodos biológicos son a ve- ces indispensables para la determinación de vitaminas. A pe sar de la indiscutible ventaja que les proporciona su mayor- selectividad, el empleo de los métodos biológicos se han ve- nido limitando sucesivamente, ya que requieren mayor tiempo- para su ejecución; son normalmente caros y sus límites de -- error son con frecuencia muy amplios. También se recurre a- los métodos biológicos cuando se requiere determinar la faci lidad de observación o liberación de las vitaminas presentes en preparaciones farmacéuticas.

Los métodos microbiológicos han sido ampliamente uti lizados en la determinación de las vitaminas del grupo "B".

Debido principalmente a su gran sensibilidad y alta especificidad, estos métodos son preferidos en muchos laboratorios, especialmente para la investigación de vitaminas en materiales de origen natural. La especificidad y exactitud de los métodos microbiológicos pueden incrementarse, por medio de aplicación de métodos modernos de separación (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de capafina).

El método microbiológico ideal sería aquel que dispusiera de un microorganismo que se desarrollara específicamente en presencia de una determinada sustancia y el desarrollo, o su metabolismo dependiera directamente de la concentración de dicha sustancia. Debido a la dificultad de encontrar tales cepas, se ha inducido, seleccionando y estudiando mutantes que precisen determinadas sustancias.

Microorganismos usados con este objeto son:

- 1o. Lactobacillus leichmannii 7830
- 2o. Escherichia coli 113-3
- 3o. Euglena gracilis y
- 4o. Ochromonas malhamensis.

Utilizando una sensibilidad de un picogramo = 10^{-12} gramo.

Los métodos microbiológicos de valoración pueden ser: turbidimétricos, volumétricos y auxanográficos.

El trabajo se concretó a la valoración microbiológica de distintos preparados farmacéuticos nacionales (Jarabes, inyectables y grageas) que contienen vitamina B₁₂ (sumando 14 - los investigados. Siguiendo el método Turbidimétrico de Valoración Microbiológica por medio del Lactobacillus leichmannii, (9).

Se siguieron todas las medidas meticulosas que debentomarse para que todo el material de vidrio esté estéril y libre de Vitamina B₁₂.

Los ensayos microbiológicos requieren en general atención constante al detalle porque la reproducción exitosa de - los resultados depende de que se satisfaga todos los requerimientos nutricionales bajo la presión de un factor único limitante, esencialmente se está trabajando con un sistema múltiple de enzimas que en este caso se pone en acción con cantidades nanográficas de Vitamina B₁₂. Las cantidades extremada--mente pequeñas del complejo de cobalaminas que soportan el -- crecimiento del organismo Lactobacillus Leichmannii, aumenta-- las precauciones necesarias para proveer un ambiente controlado.

METODOS MICROBIOLOGICOS

Los métodos microbiológicos para la determinación de vitaminas se basan en la observación de que algunos microorganismos de características bien definidas pueden multiplicarse y producir ciertos productos metabólicos iónicos en presencia de la vitamina del 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 la vitamina B₁₂ al medio inicialmente transparente por ausencia de crecimiento, la multiplicación del microorganismo causa una turbidez que es medida fotométricamente. Además de la medida turbidimétrica, los productos metabólicos formados por el microorganismo pueden determinarse cuantitativamente; por ejemplo pueden valorarse volumétricamente la mezcla de ácidos producidos por algunos microorganismos a partir de la glucosa suplementada al medio. La valoración fotométrica de los reactivos de crecimiento es más sencillo y puede llevarse a cabo con mayor rapidez y es el procedimiento de valoración que se ha seguido en el presente trabajo.

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.

Dentro de este intervalo 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 contiene la vitamina pura.

Material y Método.

Como microorganismo de prueba se utilizó la cepa Lac tobacillus leichmannii (7830) la cual estaba cuidadosamente-- empacada, se procedió a abrirla de acuerdo al instructivo -- que traía adjunto.

Como abrir los cultivos liofilizados. Se calienta vigorosa-- mente el extremo punteado del recipiente exterior en una lla-- ma de bunsen, mientras está caliente, se añade una o dos go-- tas de agua para romper el vidrio; se remueve el extremo del recipiente de un rápido golpe con un lápiz u otro objeto si-- milar y se procede luego a sacar el vial interior.

Como Rehidratar el Cultivo. Asepticamente se agrega al mate-- rial liofilizado 0.5 ml. de un medio apropiado mediante una-- pipeta serológica, se mezcla bien y se pasa la mezcla total--

a un tubo de ensayo que contiene de 5 a 6 mililitros del mismo medio. De esta suspensión se hacen los cultivos ya sea a un medio líquido o sólido, incubándose a temperaturas apropiadas con tratamiento y condiciones adecuadas, la mayoría de estos cultivos crecieron en 48 horas.

Esta cepa, debe mantener la sensibilidad de los microorganismos de ensayo hacia la vitamina en estudio, y por lo tanto fue necesario cultivarla y mantenerla diariamente en medios de cultivos líquidos o sólidos, que llenan los requisitos mínimos y contener la cantidad suficiente de todos los sustitutos esenciales para su crecimiento.

El medio de cultivo líquido contiene:

0.75 gramos de extracto de agua soluble de levadura.

0.75 gramos de peptona.

1.0 gramos de dextrosa anhidrida.

0.2 gramos de fosfato monopotásico en 60 mililitros de agua.

10.0 mililitros de jugo de tomate.

1.0 mililitro de solución de polisorbato 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.

El pH es de 6.8, el cultivo se siembra en picadura,-- se incuba a 37°C durante 24 horas.

Los requerimientos que deben satisfacerse para garantizar un procedimiento sencillo, reproducible y exacto, limita tan notablemente el número de organismos apropiados para las determinaciones microbiológicas; 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 fa--

oilmente medibles, dentro del intervalo óptimo, para su determinación cuantitativa.

- d) Los microorganismos empleados deben poseer un metabolismo intenso, 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 infecciones y hacer innecesariamente difícil el procedimiento analítico.

Para el ensayo microbiológico de las vitaminas debe confiarse principalmente en los microorganismos cuyo metabolismo y requerimiento nutritivo son más similares a los del hombre y animales. La mayoría de las cepas de ensayo son adaptaciones naturales incapaces de producir por si mismas determinados factores esenciales para el crecimiento.

Cepas Tipo.

Con el fin de mantener la sensibilidad de los microorganismos de ensayo hacia las vitaminas que deben ser determinadas, es necesario cultivarlos en un medio que cubre los requisitos mínimos por contener la cantidad suficiente de todos los sustitutos esenciales por su crecimiento, incluyendo

la vitamina en cuestión. En algunos microorganismos es aconsejable realizar la resiembra en un medio en el cual la Vitamina para cuya determinación se emplea se halla presente en conceptos fuertemente reducidos en la cantidad mínima suficiente para asegurar un crecimiento adecuado antes de emplear la cepa para la valoración de la vitamina. Ello reduce la posibilidad de que las células microbianas puedan sintetizar cierta cantidad del componente vitamínico por si mismo.

Las cepas que hayan sido "reacionadas" o formadas al "ayuno" de este modo proporcionan normalmente una curva más aguda en la determinación vitamínica, con notables diferencias en la turbidez producida por los conceptos máximo, lo cual mejora la exactitud del análisis.

Para mantener la actividad bioquímica y prevenir el desarrollo de formas adaptativas indeseables, no solo deben seguirse cuidadosamente las indicaciones respecto a la composición cualitativa y cuantitativa del medio nutritivo correspondiente a un microorganismo determinado, sino que también debe concederse gran importancia al tratamiento y conservación de las resiembras. Cuando después de resiembras repetidas sobre medios poco favorables para su desarrollo, decrece la actividad bioquímica de ciertas especies exigentes, suele ser muy beneficiosa realizar un pase de rutina a travez de -

un "medio de refresco" o de recuperación. Para los *Lactobacillus*, por ejemplo, este medio tiene la siguiente composición:

Peptona (Caseina)	1.0 gr.
D-Glucosa	1.0 gr.
Fosfato Monopotásico	0.2 gr.
Carbonato Cálcico	0.3 gr.
Agar purificado	1.5 gr.
Solución Salina A.	0.5 ml.
Solución Salina B.	0.5 ml.
Extracto de hígado	2.3 gr.
Agua c. s. p.	100 ml.

El pH del medio de recuperación se ajusta al óptimo para el crecimiento de componentes microorgánicos, según se indica en el apartado "cultivos originales" o "cepas tipo".- El medio intuba en fracciones de diez miligramos en tubos de ensayo, esterilizándose a 115°C. durante veinte minutos y de jando enfriar en posición inclinada.

Liofilización.

En los últimos años, la desecación por congelación - (liofilización) se ha venido empleando de forma progresiva -

para mantener los microorganismos de ensayo en un estado altamente activo. Se trata, efectivamente de una forma de conservación en la cual el metabolismo de los microorganismos -- se reduce al mínimo.

Puesto que la reproducción se impide, no pueden tener lugar mutaciones espontáneas, evitándose la pérdida de -- la plena capacidad de respuesta en el momento de emplearlo -- en el ensayo microbiológico. Los cultivos conservadores de esta manera se preparan creciendo las cepas en un medio líquido de incubación. Después de incubación se centrifuga el cultivo y el precipitado se suspende en un volumen igual de solución de gelatina al 10 %. La suspensión obtenida se distribuye en pequeñas ampollas al efecto y se liofiliza. Los cultivos así desecados permanecen visibles durante muchos -- años.

Inóculo.

Los inóculos de bacterias o protozoos apropiados experimentalmente se preparan mezclando las suspensiones o preparaciones liofilizadas del microorganismo de ensayo con el medio de cultivo apropiado e incubándolos a la temperatura -- establecida. La levadura y los hongos se transfieren al me-

dio desde los tubos de agar inclinado correspondiente. Los componentes del medio nutritivo original que puedan interferir se eliminan generalmente del cultivo mediante repetido lavado previo con el medio de ensayo recomendado, o simplemente, con solución salina (suero fisiológico). Este procedimiento - bastante largo - puede simplificarse considerablemente suspendiendo el cultivo lavado en la cantidad suficiente de tampon fosfatos pH = 7. conteniendo el 15 % (V/v) de glicerol bidestilado, de tal modo que proporciona un inóculo del contaje bacteriano recomendado y conservándolo en congelador (de 15 a 20°C) hasta que se requiera su empleo. Este inóculo queda listo para su uso en cualquier momento incondicionalmente después de su descomposición.

Recuento Bacteriano.

Creemos recomendable que la equivalencia de los inóculos se establezca sobre la base del número de microorganismos viables por ml. Para cualquier tipo de microorganismos este número guarda una relación definida con la turbidez, -- cuando el cultivo está en fase logarítmica de crecimiento. -- En experimentos, llevados a cabo empleando nefelómetro EEL - (Evan electroselenium Ltd. Potter Street. Harlow; Essex Inglaterra). Se obtuvieron los siguientes valores, por compa-

ración con la turbidez patrón calibrado por la misma firma, --
(9).

Organismos	Recuento bacteriano por ml. X 10^{-6}	% Turbidez (Patrón=100 %)
Lactobacillus arabinosus	300	60
Lactobacillus fermenti	300	60
Lactobacillus helveticus	100	30
Lactobacillus leichmannii	100	30
Leuconostoc mesenteroides	200	60
Streptococcus faecalis	200	40
Kloeckera brevis	200	60
Saccharomyces carlsbergensis	3	15

Medios de Cultivo para el Ensayo Microbiológico.

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: la muestra pro--

blema o las soluciones patrón que contienen vitaminas; y el inóculo bacteriano. Los medios de ensayo se preparan mezclando soluciones de distintos compuestos nutritivos en la preparación adecuada, las soluciones nutritivas que se emplean en la preparación de los medios de ensayo microbiológicos que se refieren con el nombre de "solución madre" o primarios. Después de mezclar adecuadamente las soluciones primarias, se diluyen hasta 1000 ml. con agua y se ajustan al pH apropiado. La mezcla resultante después de filtración se designa como "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 (y, en algunos casos, de ácido ascórbico, agentes tensoactivos como el Tween-, etc.) en la proporción adecuada.

Los medios de cultivo deshidratados y listos para su uso, suministrados por diversas firmas comerciales, no son siempre equivalentes de acuerdo con nuestros propios resultados, a los medios de cultivos extemporaneamente a partir de los diversos ingredientes. Este hecho, junto con la coloración más pronunciada que tienen normalmente las preparaciones comerciales, es el responsable de las curvas de óptimo inferior que se obtiene a menudo con las mismas, y que disminuyen la exactitud del procedimiento. En cualquier caso, la eficacia de los medios de cultivo "listo para su em--

pleo" debe establecerse por ensayos preliminares.

No es aconsejable conservar las soluciones madre durante muchos días. Las soluciones de vitaminas deben ser -- siempre de reciente preparación.

Aparatos de Vidrio.

Una vez limpios mediante los procedimientos habituales en los laboratorios, todos los utensilios de vidrio necesarios para llevar a cabo estos ensayos deben tratarse durante una noche con ácido clorhídrico 3N, lavando después cuidadosamente y abundantemente con agua. A continuación, el material de vidrio se seca y esteriliza a 200°C. durante una hora como mínimo. Los tubos y matraces utilizados para los ensayos o para la preparación de los medios de cultivo deben hallarse siempre provistos de cierre de vidrio o de metal ya que los tapones de algodón, celulosa o materiales similares pueden introducir factores de crecimiento de las soluciones.

Calidad del Vidrio.

La calidad del vidrio utilizado en los ensayos microbiológicos es importante, ya que los oligoelementos que pue-

den librarse al medio en determinadas condiciones pueden influenciar el crecimiento. Se utilizó vidrio Pyrex.

Preparación 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 liberarlas de los componentes de alto peso molecular que pueden formar (por ejemplo, complejos vitamina protídicos). Es, -por tanto, esencial preparar el material original para el -ensayo microbiológico mediante hidrólisis preliminar. El -método más sencillo para liberar a 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 las muestras -por ejemplo, la naturaleza y cantidades de proteínas y almidón presentes-, cabe la posibilidad de que el método descrito para la liberación cuantitativa de las vitaminas a partir de sus formas combinadas -no sea el más conveniente en el caso particular en estudio. En consecuencia, las condiciones de hidrólisis (concentra--ción de ácido, 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 cuales son las condiciones óptimas para ello la hidrólisis ácida puede llevarse a cabo en un tiempo comparativamente menor, pero no siempre conduce a los mejores resultados. Las preparaciones comerciales de diastasa empleadas para la enzimólisis contiene, - algunas veces, pequeñas cantidades de vitamina y, en consecuencia, es aconsejable examinar el posible contenido vitamínico en todo los lotes enzimáticos que se reciban. Si se hallan una cantidad medible en los mismos, la proporción presente en la cantidad de enzima empleada en el ensayo de liberación debe sustraerse del resultado total obtenido en la determinación microbiológica.

Dilución de la Muestra.

La solución de la muestra o el extracto del material es estudio se diluyen de tal modo que el resultado aproximado previsto caiga en la región central, más 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.

Soluciones de Calibración.

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.

Soluciones Control.

Es aconsejable comprobar en cada experimento microbiológico la esterilidad de los medios de cultivo por medio de un control, llevado a cabo simultaneamente, que no se inocula, pero que se trata de forma idéntica a las muestras y soluciones de calibración. Es aconsejable asegurarse de que el medio de cultivo no contiene factores estimulantes del crecimiento. Con este fin, nueve mililitros del medio colocados en un tubo de ensayo se tratan con un mililitro de agua en lugar de adicionar un mililitro de la solución de la muestra; se inoculan con una gota de cultivo y se incuban junto con los tubos que contienen las diluciones problema y-

patrón. 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 (en este caso se -- usó el verde). 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 pipe-- teando una gota de una solución de formaldehído al 1 %, en -- cada tubo de cultivo y agitar (9).

METODO SEGUIDO EN EL PRESENTE TRABAJO

Cepa Empleada.

Como microorganismo de prueba se utilizó la cepa 7830 *Lactobacillus leichmannii*. Esta cepa, con el fin de mantener la sensibilidad de los microorganismos de ensayo hacia la vitamina en estudio que debía ser determinada, fue necesario -- cultivarla y mantenerla diariamente en medios de cultivos líquidos o sólidos que cubrían los requisitos mínimos, por contener la cantidad suficiente de todos los sustitutos esenciales para su crecimiento.

Esta cepa se mantuvo en un medio de cultivo líquido-- que contiene:

- 0.75 gramos de extracto de agua soluble de levadura.
 - 0.75 gramos de peptona.
 - 1.0 gramos de dextrosa anhidrida.
 - 0.2 gramos de fosfato monopotásico en 60 milili---
tros de agua.
 - 10 mililitros de jugo de tomate.
 - 1 mililitro de solución de polisorbato 80 (Tween
80).
 - agua hasta 100 mililitros.
- Se ajusta a un pH de 6.8.

Las especies de *Lactobacillus* se clasifican en Homofermentativo y Heterofermentativo. El *Lactobacillus leichmannii* pertenece a las Homofermentativo que producen solamente trazas de productos finales distintos del ácido láctico de la fermentación de la glucosa.

Lactobacillus leichmannii: Bergey et al. 1925 (*Bacillus leichmannii* I, Henneberg, Z. Tschr. f. Spiritusindustrie, 26, 1930, 22; also see Cent. f. Bakt. II Abt. 11, 1903, 163. ----- Bergey et al. Manuel, 2nd ed, 1925. 180).

Leichmannii M. L. El nombre *leichmannii* viene de -- Leichman, nombrado por el profesor G. Leichmann bacteriólogo alemán.

Descripción.

Son bacilos de 0.6 x 2 a 4 micras, son aislados o en cadenas cortas; las células muestran 2 o más granulos teñidos intensamente. No son móviles. Gram-positivos. Cultivo de gelatina en picadura no hay licuefacción. Colonias en -- Agar en flautas: limitado, grisáceo, crece mejor en picadura. Caldo: turbido.

trecholososa, pequeñas cantidades de galactosa, manitol y alfa glicósido, no fermenta la lactosa, rafinosa arabinosa, ramosa, dextrina e inulina, forma 1.3 por % de ácido láctico en mash, Produce ácido láctico levorotatorio.

No forma nitritos de nitratos.

Microaerófilo.

Temperatura óptima de 36°C, máxima entre 40°C. y -- 46°C.

Relación con otras especies: esta especie es aparentemente similar al lactobacillus delbrueckii pero tiene una temperatura óptima más baja.

Procedencia: se ha aislado de levadura comprimida y de leche fermentada.

Habitat. Productos lácteos (2).

Soluciones madres empleadas en la preparación de los medios de cultivo para el ensayo microbiológico de la Vitamina B₁₂.

Solución 1. Se disuelve en 40 ml. de HCl 1N 400 -- mgr. de L-cistina y la misma cantidad de DL-triptófano.

- Solución 2. Se disuelven en 50 ml. de HCl 1N hir---
viendo, 20 mgr. de cada una de las si---
guientes bases: adenina, guanina y ura-
cilo.
- Solución 3. 20 mgr. de xantina se suspenden en 3 --
4 ml. de agua, se añade 1 ml. de una so-
lución de amoníaco al 25 por %, la mez-
cla se calienta a 70°C. y se agita has-
ta que se ha disuelto totalmente el pro-
ducto. La solución se enfría y se dilu-
ye hasta 20 ml. con agua.
- Solución 4. a) Se disuelven en 400 ml. de ácido acé-
tico 0.02 N calentando, 10 mgr. de ribo-
flavina, 10 mgr. de clorhidrato de tia-
mina y 20 mgr. de ácido nicotínico.
b) 5 mgr. de D-biotina se disuelven 50-
ml. de agua. Se añade 1 ml. de esta so-
lución a la solución "a".
- Solución 5. Se disuelven en 400 ml. de etanol al 25
por %, calentando, 20 mgr. de ácido 4 -
-aminobenzoico, 10 mgr. de D-pentotena-
to cálcico, 40 mgr. de clorhidrato de -
piridoxina, 40 mgr. de clorhidrato de -
piridoxal, 8 mgr. de diclorhidrato de -
piridoxamina y 2 mgr. de ácido fólico.

- Solución 6. Solución salina A. Se disuelven en 100 ml. de agua 2.5 gr. de fosfato monopotásico y 2.5 gr. de fosfato dipotásico. Esta solución se denomina frecuentemente como Solución salina "A".
- Solución 7. "Solución salina "B". Se disuelven en 100 ml. de agua. 1 gr. sulfato de magnesio, 0.05 gr. de cloruro sódico, 0.05 gr. de sulfato ferroso y 0.05 gr. de sulfato de manganeso. Esta solución se denomina "Solución salina B".
- Solución 8. 200 mgr. de L-aspargina se disuelven en 20 ml. de agua calentando.
- Solución 9. 10 gr. de hidrolizado de caseína (hidrólisis ácida) exento de vitaminas se disuelven en 100 ml. de agua, calentando.
- Solución 10. 20 gr. de acetato de sodio anhidro se disuelven en 100 ml. de agua calentando.

Inoculo.

El microorganismo se inocula a partir del cultivo en medio líquido (sin agar) y se incuba a 37°C. durante 20 horas. Se centrifuga, se lavan las células 3 veces con medio -

de ensayo estéril libre de vitamina B₁₂ y se resuspende, finalmente, en 10 ml. de este medio de ensayo.

Medio de Ensayo.

Con *Lactobacillus leichmannii*.

El medio de ensayo se prepara mediante los siguientes volúmenes de las soluciones madres en un matraz erlenmeyer de 2 litros.

40 ml. de la solución	1
50 ml. de la solución	2
20 ml. de la solución	3
40 ml. de la solución	4
40 ml. de la solución	5
40 ml. de la solución	6
40 ml. de la solución	7
20 ml. de la solución	8
100 ml. de la solución	9
100 ml. de la solución	10

La mezcla se diluye hasta 1000 ml. con agua, se ajusta a pH 6. y se calienta a 120°C. durante 10 minutos. El --

precipitado que se forma se elimina por filtración, una vez enfriada totalmente la mezcla. Antes de su distribución en los tubos de ensayo, se mezclan 100 partes (v/v) de este medio básico de doble concentración con 80 partes de una solución de 40 grs. de glucosa, 4 grs. de ácido ascórbico y 2 ml. de solución Tween 80, 800 ml. de agua. Porciones de 9 ml. - de este medio de ensayo se distribuyen en los tubos de ensayo que se tapan y se esterilizan a 115°C . durante 10 minutos.

Solución Patrón.

Cianocobalamina o vitamina B_{12} exactamente pesada se disolvió en agua destilada estéril en una concentración de - 10.00 pg/ml.

Curva de Calibración.

A partir de la solución patrón se prepara la siguiente serie de concentraciones: 1000, 200, 100, 50, 20 y 10 pg. de vitamina B_{12} por ml. Un ml. de cada una de estas diluciones se pipetea, en condiciones estériles en los tubos de ensayo que ya contienen 9 ml. del medio de ensayo. Cada concentración se conduce por triplicado con el fin de incrementar la exactitud del análisis.

Método.

El método turbidimétrico empleado fue el descrito por Rolf Strobeck, Heinz M. Henning (1).

Para analizar soluciones que contienen solamente Vitamina B₁₂ o cianocobalamina se diluyen progresivamente con agua destilada estéril hasta que la concentración de vitamina B₁₂ sea la misma de la solución patrón. De esta solución llevamos a concentraciones 1000, 200, 100, 50, 20 y 10 µg/ml. de vitamina B₁₂ (igual a las de la curva de calibración).

Para suplementos vitamínicos se preparan soluciones con agua destilada estéril a concentraciones igual a las descritas anteriormente.

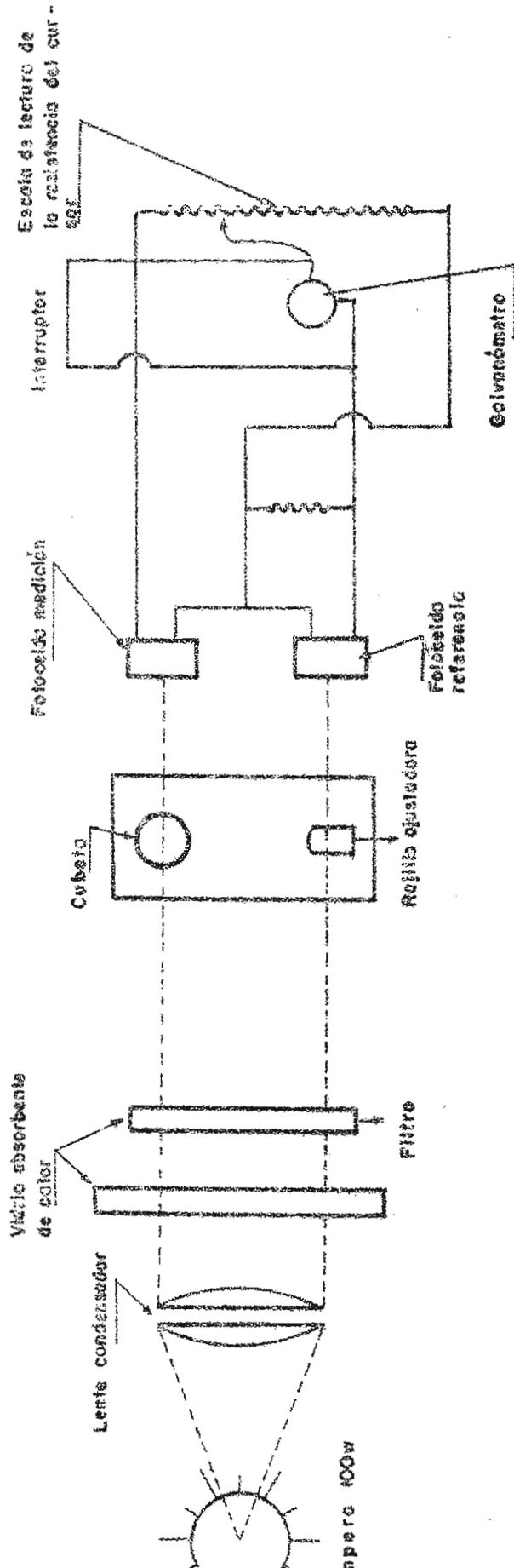
Un mililitro de cada una de estas diluciones se pipetea, en condiciones estériles en los tubos de ensayo que ya contiene 9 mililitros del medio de ensayo. Cada concentración se conduce por triplicado, con el fin de incrementar la exactitud del análisis. Se añade a cada tubo de ensayo una gota del inóculo ya preparado a 37°C. durante veinticuatro horas.

Tan pronto como transcurren las veinticuatro horas se

procedió a la valoración del ensayo. Se midieron las turbideces de las soluciones patrón y soluciones problema en colorímetro Klett empleando el filtro verde de 490-500 m μ . Los valores obtenidos a partir de las soluciones patrón y problemas se representan frente a las concentraciones en un papel milimetrado, las unidades de turbidez se señalan a lo largo de la escala lineal (Ordenadas) y las concentraciones en picogramos 10^{-12} gramos por tubo de ensayo (abscisas).

Las turbideces halladas en las muestras se convierten en las correspondientes concentraciones empleando la curva de calibración así construida. Multiplicando por el factor de dilución se obtiene la cantidad de vitamina B₁₂ por gramo de muestra original.

ESQUEMA OPTICO Y ELECTRICO DEL COLORIMETRO DE KLETT



Instrucciones para el manejo del Fotocolorímetro Klett Summer
son.

- 1o. Antes de conectar el aparato estar seguro que el filtro a emplear ha sido colocado en el lugar que le corresponde en el aparato y hacer coincidir en (C) la aguja con la línea media de la escala mediante el botón (D) situado en la parte superior del aparato. No se puede usar este botón a menos que el instrumento esté apagado.
- 2o. Conectar el aparato a un toma corriente y encender el swich (H).
- 3o. Colocar un tubo limpio para colorímetro conteniendo agua destilada en el punto (E) del aparato. - No coger nunca el tubo por su parte inferior.
- 4o. Por medio del botón (A) colocado enfrente del aparato poner a 0 la escala de la lectura (B).
- 5o. Encender la lámpara del colorímetro por medio del swich 1.
- 6o. Hacer coincidir en (C) mediante el botón (G) que está colocado a la izquierda de (E).
- 7o. Dejar en reposo 5 minutos para permitir que se establezca equilibrio en el aparato y chequear nuevamente la posición del cero con el botón (G). - Si no está en cero hacerlo llegar.
- 8o. Apagar el aparato con (H) retirar el tubo con ---

agua destilada, y colocar en su lugar un tubo Klett limpio conteniendo la solución de concentración des conocida. Encender de nuevo.

90. Mover (A) hasta que (C) está nuevamente en línea y leer en la escala (B).

Reactivos y Material Usado.

HCl 1N : Se disuelven 3.08 mililitros de HCl con centrado en 100 mililitros de agua.

CH₃COOH 0.02N : Se disuelven 1.14 mililitros de ácido - acético en 100 mililitros de agua.

NH₃ 25 % : Se disuelven 43.103 ml. de NH₃ en 100 - ml. de agua.

Tubos de ensayo con tapón de rosca de 15 cc. de capacidad.

Papel indicador.

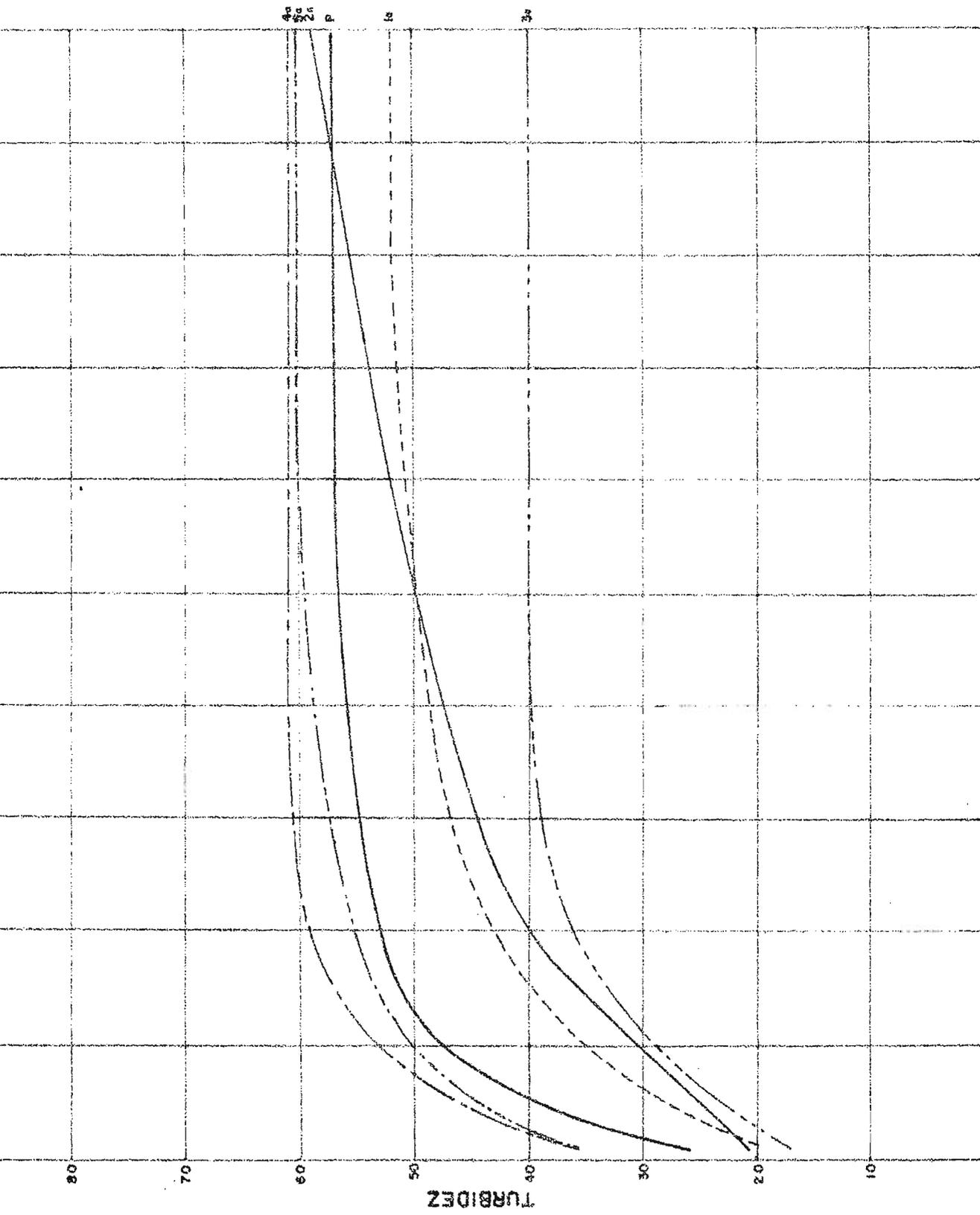
Probeta, frascos volumétricos de 50, 100, 250, 500, y - 1000 ml.

Beaker, erlenmeyer, balones de varias capacidades.

RESULTADOS OBTENIDOS

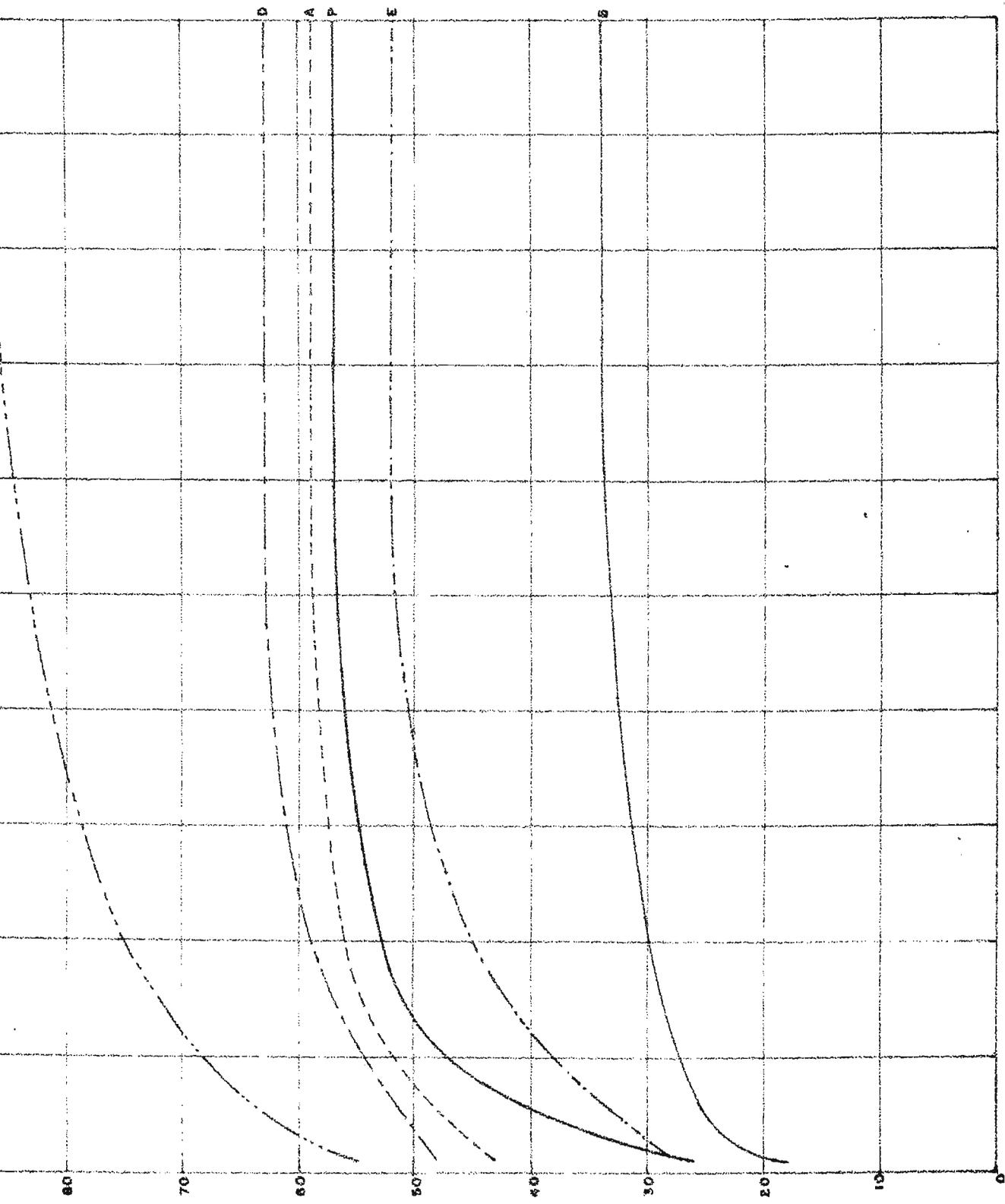
I N Y E C T A B L E S

Concentración Pg/ml.	Patrón	10.	20.	30.	40.	50.
1000	57.5	52.0	59.0	40.0	61.0	60.0
200	53.0	43.0	40.0	36.0	59.0	55.0
100	47.6	35.0	30.0	28.5	50.0	51.0
50	34.3	28.0	25.0	21.0	46.0	41.0
20	30.0	21.0	22.0	20.0	34.0	38.0
10	26.0	20.0	21.0	17.0	33.0	36.0



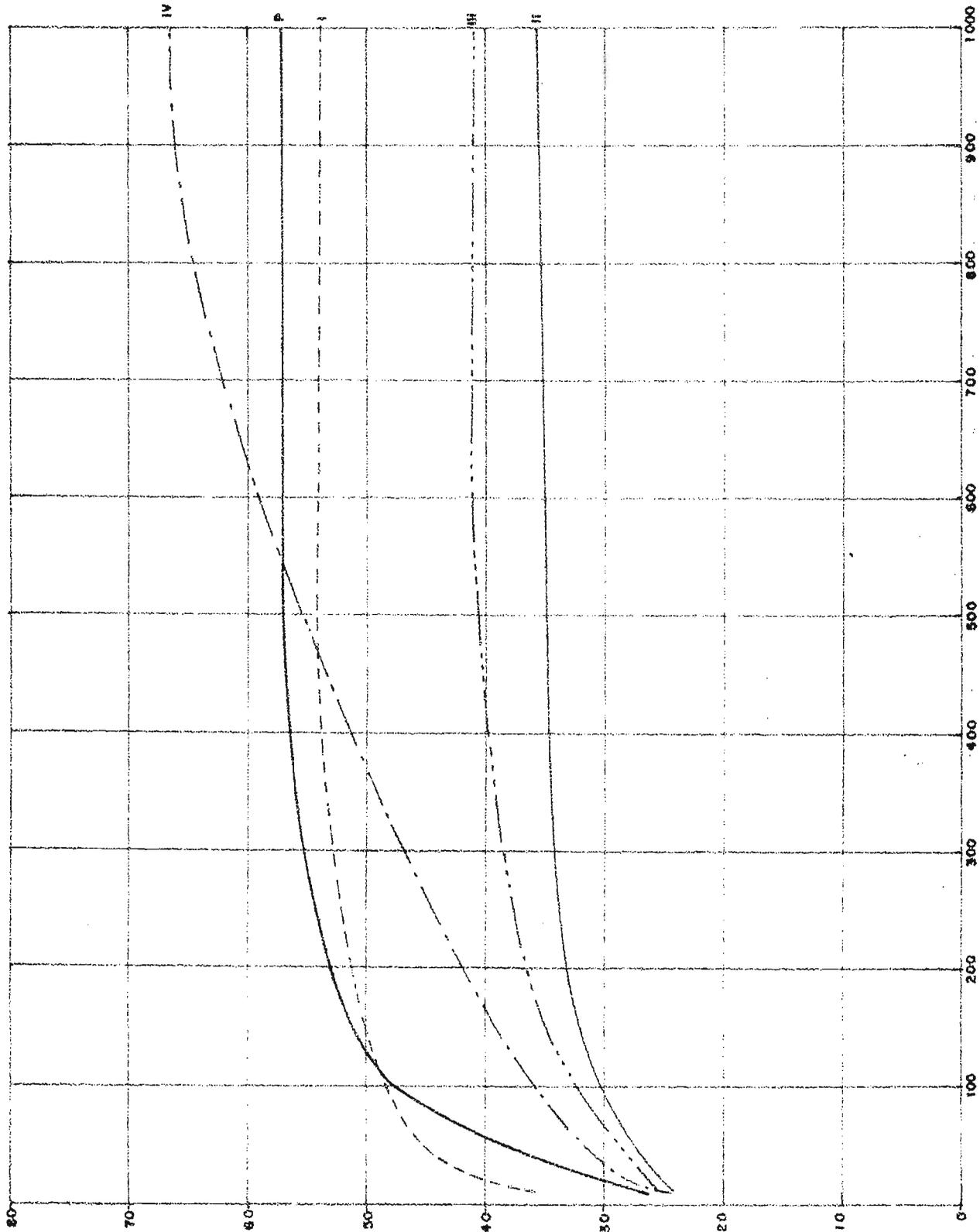
J A R A B E S

Concentración Pg/ml.	Patrón	A	B	C	D	E
1000	57.5	59.0	34.0	87.0	65.0	52.0
200	53.0	56.5	30.0	75.0	59.0	45.0
100	47.6	52.0	27.0	66.0	54.0	38.0
50	34.3	50.0	25.0	63.0	51.0	32.3
20	30.0	44.5	22.0	58.0	50.0	29.0
10	26.0	43.0	18.0	55.0	48.0	28.0



G R A G E A S

Concentración Pg/ml.	Patrón	I	II	III	IV
1000	57.5	54.0	36.0	41.0	67.0
200	53.0	51.5	33.0	36.5	42.0
100	47.6	48.0	30.0	32.5	38.0
50	34.3	45.5	27.5	28.5	32.0
20	30.0	42.5	25.0	26.0	28.0
10	26.0	36.0	24.0	25.0	24.0



Los resultados del contenido de vitamina B₁₂ en especialidades farmacéuticas, se obtuvieron a partir de las curvas de calibración eligiendo como concentración de referencia 100-pg/ml.

I N Y E C T A B L E S

Especialidades Farmacéuticas	Concentración obtenida de Vitamina B ₁₂	Concentración declarada en marbeta
1o.	350 mcg. en cada c.c.	1000 mcg. en cada c.c.
2o.	200 mcg. en cada c.c.	1000 mcg. en cada c.c.
3o.	750 mcg. en cada c.c.	5000 mcg. en cada c.c.
4o.	125 mcg. en cada c.c.	100 mcg. en cada c.c.
5o.	1500 mcg. en cada c.c.	1000 mcg. en cada c.c.

J A R A B E S

Especialidades Farmacéuticas	Concentración obtenida de Vitamina B ₁₂	Concentración declarada en marbete
A	70 mcg. en cada 100c.c.	100 mcg. en cada 100c.c.
B	1 mcg. en cada 5 c.c.	10 mcg. en cada 5 c.c.
C	10 mcg. en cada 5 c.c.	5 mcg. en cada 5 c.c.
D	1150 mcg. en cada 100c.c.	500 mcg. en cada 100c.c.
E	500 mcg. en cada ml.	1000 mcg. en cada ml.

G R A G E A S

Especialidades Farmacéuticas	Concentración obtenida de Vitamina B ₁₂	Concentración declarada en marbete
I	1.7 mcg. en cada Tableta	2 mcg. en cada Tableta
II	50.0 mcg. en cada Tableta	250 mcg. en cada Tableta
III	12.5 mcg. en cada Tableta	50 mcg. en cada Tableta
IV	15.7 mcg. en cada Tableta	15 mcg. en cada Tableta

C O N C L U S I O N E S

- 1o. El método microbiológico que emplea la cepa 7830 de Lac
tobacillus leichmannii permite valorar Vitamina B₁₂ en
especialidades farmacéuticas en soluciones o en grageas
ya sea libre o combinada con otras vitaminas.
- 2o. Los resultados de contenido de Vitaminas B₁₂ en inyecta
bles y jarabes resultaron discrepancias en las concen--
traciones obtenidas y las declaradas en marbete.
En las grageas hubo similitud en dos y discrepancia en
dos.
- 3o. En el caso de las grageas se pueden atribuir los resul-
tados a una mala mezcla debida a la cantidad tan poca -
de Vitamina B₁₂ que hay que incorporar.
- 4o. El medio de cultivo fue preparado en el laboratorio de-
bido a que da resultados más exactos que los medios de-
cultivo comerciales.
- 5o. El método es sencillo y el material de fácil adquisi---
ción.
- 6o. El bacilo es muy delicado, fue cultivado 3 veces por se
mana para poderlo mantener vivo.

R E C O M E N D A C I O N E S

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo se recomienda que las valoraciones de Vitamina B₁₂ deben hacerse por métodos microbiológicos y ocupar como microorganismo ideal el *Lactobacillus leichmannii* debido a su sensibilidad y alta especificidad en la determinación de esta vitamina ya que el desarrollo y metabolismo de este bacilo dependen directamente de la concentración existente de Vitamina B₁₂.

Se haga la valoración microbiológica por este método de todas las preparaciones farmacéuticas que existen actualmente en el mercado salvadoreño que contengan Vitamina B₁₂.

Para una persona normal el organismo necesita 2 microgramos diarios y para un enfermo depende de sus necesidades. Las grandes dosis se eliminan rápidamente por la orina.

Se recomienda que se analicen sustancias naturales que puedan ser fuentes de Vitamina B₁₂.

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

1. ANALISIS DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA, Santiago de Chile, Tomo XVII, 1965.
2. BREED, Robert S., MURRAY, E. G. D., SMITH, Hathan R. - Bergey's, "Manual of Determinative Bacteriology". Seventh Edition Baltimore - the Williana Cia Welking Company, 1957.
3. CLICK, David, "Methods of Biochemical Analysis", volumen XIV.
4. DAVIS, B. D. y MINGIOLI, E. S., J. "Bacterial", 60,17-1950.
5. GOODMAN, Louis S. y ALFRED, Gilman, Bases Farmacológicas 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.- p. 1680 - 1685.

6. HOBART H., Willard, MERRITT, Lynne L., Jr. DEAN, John-A. Dean, "Métodos Instrumentales de Análisis", Nueva Edición revisada, corregida y aumentada. Traducida de la 4a. edición en inglés. Cía. Editorial Continental, S. A., México - España, p. 87-109.
7. PAUL, György y W. N. Pearce, "The Vitamina" Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. Second-Edition Volumen VII. Academic Press. -- New York and London 1967, p. 277 - 279.
8. PEARSON, Giorgi, "The Vitamins Methods".
9. STROBECKER, Rolf, Heinz M. Henning, "Análisis de Vitaminas". Métodos comprobados traducidos -- por F. Maynor. Patrocinado por E. Merck AG-Darmstadt. Editorial Paz Montalvo -- Madrid 1967, p. 17, 18, 27, 36, 192, -- 202, 210 y 405.