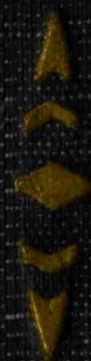


MINISTERIO DE EDUCACION DE LA NACION  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Métodos de **cuantificación** de Vitamina B<sub>12</sub>  
PRODUCIDA POR FERMENTACION  
SU MEDICION MICROBIOLOGICA



TRABAJO DE TESIS  
PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOQUIMICA Y FARMACIA

REGINA SUHAMI

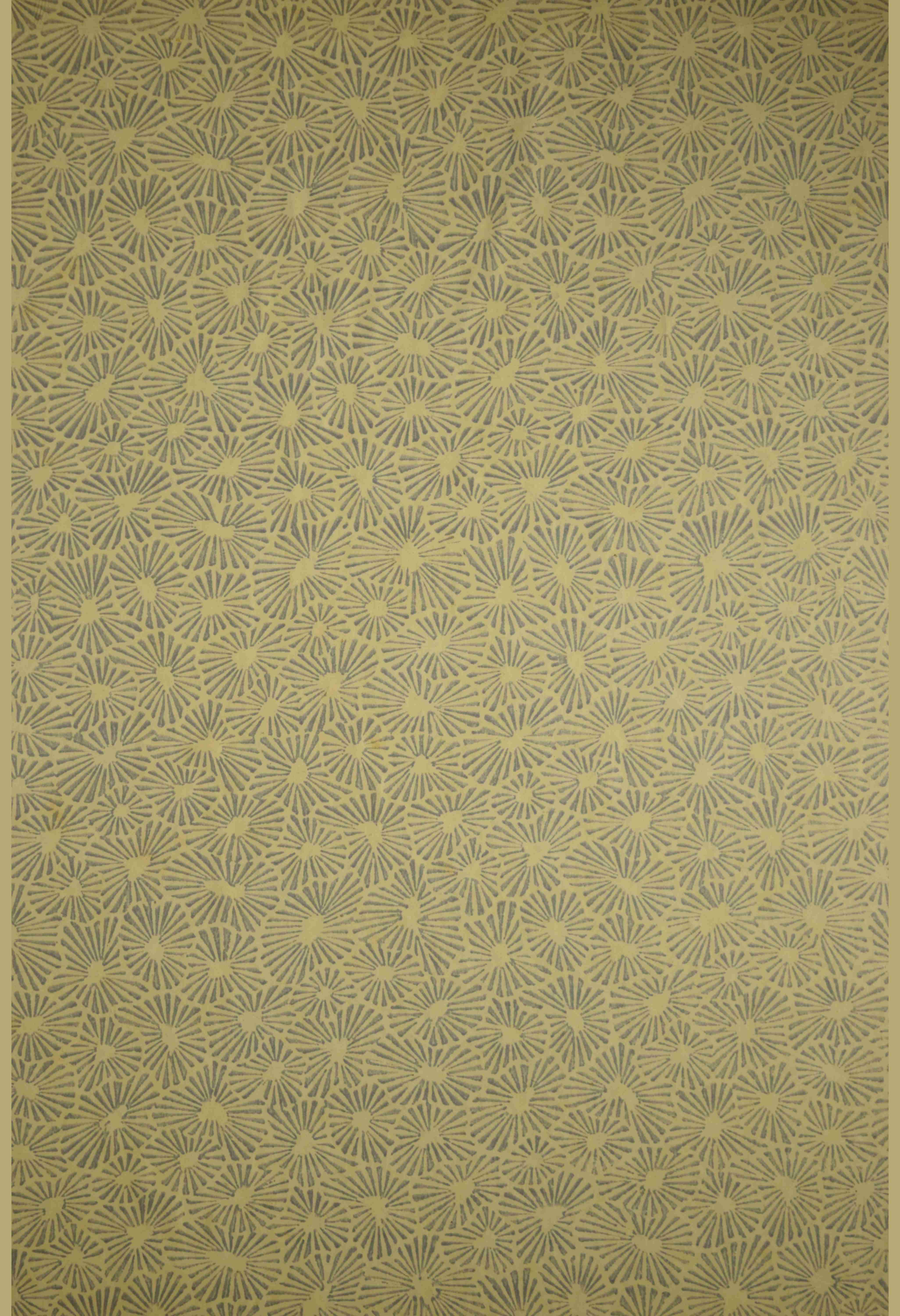
1955

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Biblioteca  
50 y 115 1° subsuelo  
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar  
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-22344







Mon. ....

.....

Fecha. ....

Inv. N. ....

Inv. N. ....



373

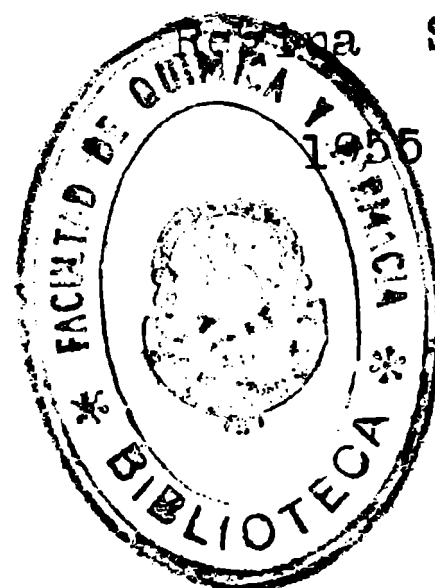


Ministerio de Educación de la Nación

Universidad Nacional de La Plata

"Métodos de extracción de vitamina B<sub>12</sub> producida por fermentación:  
Su medición microbiológica".

Trabajo de Tesis  
para optar al grado de  
Doctor en Bioquímica y Farmacia



Padrino de Tesis

Prof. Dr. Zenón Mariano Lugones

A mis padres y hermana

Trabajo realizado en la cátedra de  
Industrias Químico-Farmacéuticas y en  
los Laboratorios O.C.E.F.A. (Bs. Aires)

## Plan de Tesis

Tema: "Métodos de extracción de vitamina B-12 producida por fermentación.  
Su medición microbiológica".

- I) Introducción
- II) La vitamina B-12
  - a) Antecedentes
  - b) Propiedades generales
  - c) Constitución química
  - d) Métodos de valoración
    - 1) Químicos
    - 2) Microbiológicos
  - e) Métodos de producción
    - 1) Por extracción de fuentes naturales
    - 2) Por fermentación

\_\_\_\_\_0\_\_\_\_\_

### Parte experimental

- 1) Valoración por el método microbiológico
  - a) Selección de la cepa
  - b) Puesta a punto de la técnica de medición
  - c) Medio de cultivo
  - d) Lectura de los resultados
  - e) Interpretación



2) Producción de vitamina B-12 por fermentación con *Bacillus brevis*

3) Extracción de la vitamina B-12 de los caldos crudos de cultivo

a) Adsorción del material con carbón

b) Elución de la vitamina B-12 de los adsorbatos

Estudio de los disolventes:

a) Etanol

Soluc.acuosa de etanol del 30 al 96%

" " " " " " " " "más

sol.amoniaca1 del 1 al 10%

Etanol en los pH 4,5,6,7 y 8

b) Acetona

Sol.acuosa de acetona del 30 al 90%

c) Butanol

d) Isopropanol

e) Metanol

f) Dioxano

g) Acetato de butilo

h) Acetato de etilo

i) Tricresol

j) Fenol



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

La vitamina B-12, factor de crecimiento ampliamente distribuido en la naturaleza en cantidades mínimas, estimula la función de hematopoyesis y desempeña un papel importante en la nutrición del hombre y de los animales.

Su aislamiento fue realizado a partir de materiales biológicos como el hígado casi simultáneamente por tres laboratorios independientes de investigadores: uno americano (Compañía Merck) y dos ingleses (Laboratorios Glaxo y British Drug House).

Con la obtención en forma cristalizada de la vitamina B-12, a partir de los caldos crudos de fermentación de microorganismos como el *Streptomyces griseus*, *S. antibioticus*, *S. roseochromogenus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* etc. se lograron fuentes de gran valor industrial, que en breve tiempo producen notables cantidades de vitamina B-12.

El objeto del presente trabajo es el estudio de los disolventes dotados de mayor poder extractivo de la vitamina B-12 contenida en los caldos crudos de fermentación del *Bacillus brevis*.

Se ensaya así mismo las condiciones óptimas de extracción : temperatura, concentración y reacción.



## II LA VITAMINA B-12

### a) Antecedentes:

Para historiar el descubrimiento de esta vitamina, debemos retroceder hasta el año 1926 en que G.R.Minot y W.P.Murphy, hacen que se abandone el concepto de incurable de la anemia perniciosa, pues observaron que en el tratamiento de dicha enfermedad, la administración de un régimen alimenticio abundante en hígado era altamente satisfactorio.

El paso siguiente fue dado por E.J.Cohn y G.R.Minot y colaboradores, que aislaron del hígado la fracción G, responsable de la acción anti-anémica.

La naturaleza química de esta fracción fue considerada por Cohn en 1928, como una base nitrogenada y en 1930, como una amina secundaria ó terciaria.

H.D.Dakin y R.West en 1935, supusieron haber aislado esta fracción en estado puro y cristalino y le asignaron la estructura de un complejo que contenía hexosamina y algunos ácidos aminados, pero exenta de bases pirimidínicas y púricas.



En trabajos posteriores estos autores aclaran que la fracción antiperniciosa era un polipeptido que poseía algunas de las propiedades de las albumosas. La hidrólisis de ese polipeptido daba origen a varios ácidos aminados: (arginina, prolina, hidroxiprolina, leucina y ácido aspártico).

Los trabajos de Subbarow y Jacobsen (1937), atribuyen la acción antianémica a la existencia en el hígado de varios factores activos que fueron denominados primarios y accesorios. Los accesorios completan la acción de los primarios y son tres: un complejo de purina, tirosina y un péptido. Estos factores son inactivos pero junto a los primarios se tornan activos. La naturaleza química de los factores primarios era desconocida. Otras experiencias parecían demostrar la existencia de más de un factor antianémico. Así, la anemia causada por la toxina tífica, se curaba por extracto de hígado y no por las fracciones purificadas activas en la anemia perniciosa del hombre.

En la búsqueda del agente químico causante de la acción antianémica del hígado influye notablemente el estudio de los factores necesarios para el desarrollo de microorganismos en determinados medios de cultivo. Así, Snell y Peterson<sup>5</sup> en 1939, descubrieron un nuevo factor indispensable para el crecimiento del *Lactobacillus casei* y también del *Streptococcus lactis* R o *Streptococcus faecalis*, como lo demostraron Hutchings, Bohanes y Peterson<sup>6</sup> en el año 1941.

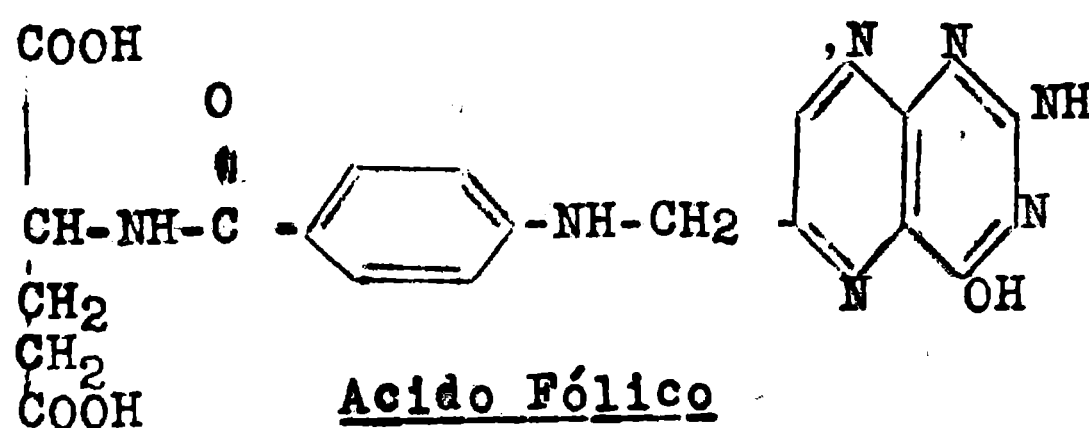
En 1942, Mitchell, Snell y Williams<sup>7</sup>, obtuvieron de un concentrado de espinacas, un extracto dotado de gran actividad sobre el crecimiento del *Lactobacillus casei* y el *Streptococcus lactis* R y a este factor desconocido dieron el nombre de Ácido Fólico, que deriva del latín "folium" (hoja) y ha persistido, aunque este factor fue hallado más tarde en otros órganos y vegetales no foliáceos.



Pfiffer, Binkley y Brown en 1943, aislaron del hígado un factor antianémico para el pollo, en forma de cristales de color amarillo-anaranjado, que a igual que el ácido fólico favorece el crecimiento del *Lactobacillus casei* y el *Streptococcus lactis* R.

La estructura del ácido fólico fue conocida por reacciones de degradación en medio alcalino y en presencia de oxígeno, descomponiéndose el ácido fólico en dos fracciones: una de función amina aromática que por hidrólisis ácida da ácido p-amino benzoico y ácido l-glutámico. La otra fracción es ácida, microcristalina, de fluorescencia azul, de naturaleza pteridínica y por descarboxilación conduce a la 2-amino-4-hidroxipteridina. La degradación del ácido fólico, por medio de anhídrido sulfuroso, da, además de la fracción amina aromática que se obtiene en medio alcalino, un derivado pteridínico de naturaleza aldehídica.

Angier y colaboradores, realizaron en 1945, la síntesis del ácido fólico y le asignaron al núcleo fundamental la estructura siguiente:



Al ser ensayado por método bacteriológicos y clínicos se consideró al ácido fólico como la verdadera "Vitamina Antianémica", por haber demostrado su capacidad de producir glóbulos rojos en la sangre como los extractos de hígado más eficaces.

Pero, el ácido fólico resultaba tóxico para el sistema nervioso pues no prevenía las lesiones neurológicas de la anemia perniciosa.



Esta neurotoxicidad ha sido explicada por Cobb, Pearson y Hastings<sup>40</sup>, como debido a la formación en las soluciones no recientes de ácido fólico de derivados de fotoescisión, tal es la 2-amino-4-hidroxi-6-formilpteridina extremadamente neurotóxica.

Tampoco podía constituir el verdadero principio antianémico pernicioso contenido en los extractos hepáticos, ya que la actividad de estos se manifestaba en dosis mucho menores que con el ácido fólico.

La imposibilidad de que el ácido fólico fuese el verdadero principio antianémico pernicioso, ha sido superado por el descubrimiento de la vitamina B-12, que actúa a la dosis de 1 gamma.

En el año 1947, Mary Shorb<sup>41</sup>, halló que el crecimiento del *Lactobacillus lactis* Dorner, era estimulado por un factor existente en el hígado en gran cantidad y en menor proporción en la levadura, pepsina, peptona, leche peptonizada etc. Revela que la propiedad antianémica de los preparados de hígado existentes en el comercio, está en relación lineal con la concentración de este factor.

Basándose en estos trabajos, K. Folkers y colaboradores<sup>42</sup> en 1948, aislan en forma cristalizada, el principio antianémico del hígado y lo designan con el nombre de "Vitamina B-12". Su actividad es tal que permite el desarrollo del *Lactobacillus lactis* en una concentración de 0.000013 microgramos por mililitro de medio de cultivo.

Simultáneamente con el descubrimiento de Folkers en Estados Unidos, Smith y Parker<sup>43</sup>, en Inglaterra, anuncian un aislamiento similar pues empleando un método cromatográfico lograron concentrados muy activos los



que por digestión trípica y nueva cromatografía condujeron a un producto que cristaliza en acetona.

Ellis, Petrow y Snook,<sup>14</sup> también en Inglaterra, obtuvieron una sustancia similar a la de Rickes y Smith.<sup>5</sup> Extrajeron el principio antianémico de sus soluciones acuosas por tratamiento repetido con n-butanol en presencia de alta concentración de sulfato de amonio. Al final realizaron una adsorción cromatográfica por columnas cargadas de bentonita ó silicato de aluminio y cristalizaron el producto adsorbido con solución acuosa de acetona.

La potencia del producto cristalino aislado fue determinado por Shorben<sup>16</sup> 1948, y es de 11.000.000 L.L.D./mg.

Dedujo Shorb,<sup>16</sup> que la vitamina B-12 existente en el hígado es responsable del desarrollo del *Lactobacillus lactis* Dorner.

Con el aislamiento de la vitamina B-12 partiendo de extractos hepáticos, se confirma la teoría de que un solo factor era necesario para el tratamiento de la anemia perniciosa del hombre.



b) Propiedades generales:

La vitamina B-12 cristalizada, aislada tanto del hígado como de los caldos de cultivo del *Streptomyces griseus*, se presenta en forma de agujas de color rojo oscuro. Es inodora y no posee sabor apreciable.

Es soluble en agua: 1 gr. se disuelve en cerca de 80 ml. de agua. Es insoluble en acetona, cloroforme y éter, pero soluble en alcohol.

El poder rotatorio específico es:  $[\alpha]_{D}^{20} 6563 \text{ \AA} = -59^{\circ} \pm 9^{\circ}$

El producto desecado es higroscópico y absorbe rápidamente de 10 a 12% de agua en ambientes de humedad relativa del 50%.

No requiere protección de la luz difusa pero sí de la luz solar pues se separa el ciano grupo que se vuelve a recombinar en la <sup>42</sup>obscuridad.

Las soluciones acuosa son neutras con una estabilidad máxima comprendida entre pH 4,5 y pH 5 pudiendo ser autoclavadas a 120°C durante 20 minutos.



Por el calor se descompone a pH 2 y más rápidamente a pH 9 y pH 12.

Los índices de refracción, determinados sobre los cristales desecados al vacío son:  $\alpha$  :1.616,  $\beta$  :1.652,  $\gamma$  :1.664

Cuando se determina el punto de fusión los cristales oscurecen entre 210 y 220°C y no funden a 300°C.

Las soluciones acuosas presentan en el examen espectroscópico las siguientes bandas de absorción: una en la región visible del espectro con un máximo de 500 m $\mu$  y dos en el ultravioleta: 361 m $\mu$  y 278 m $\mu$  con inflexiones a 322 y 304 m $\mu$ .

En las titulaciones potenciométricas se comporta como una base poliácida.

La vitamina B-12 cristalizada se inactiva lentamente en soluciones de ácidos ó álcalis fuertes.

Mantenida en ambientes estériles y vehiculizada por soluciones salinas isotónicas, puede mantener su actividad terapéutica, a la temperatura ambiente durante más de un año.

Es reducida por el hidrógeno en presencia de platino como catalizador, por el aldehído fórmico y por el bisulfito.

Es atacada profundamente por los agentes oxidantes.

En lo que respecta a la compatibilidad e incompatibilidad de la vitamina B-12 con varias sustancias de interés farmacéutico, es necesario no solo tener en cuenta las características de la vitamina B-12 sino también la pureza de la sustancia a la cual se intenta asociarla.

Las impurezas presentes en las sustancias adicionadas a la vitamina B-12, aunque representen el 1,1% ó menos del producto total, pueden dar lugar a reacciones químicas por cuanto pueden encontrarse en proporción molecular ó mayor de

la molecular con respecto a la vitamina B-12. Por tales razones es necesario controlar la pureza de todas las sustancias que forman parte de un fórmula que contiene vitamina B-12.

La vitamina B-12 cristalizada es de una gran pureza y de menor reactividad que el concentrado de la vitamina misma. Esta diferencia es bien apreciable si se compara la velocidad con que pierde la actividad la vitamina B-12 impura y la solución de vitamina pura en presencia de sustancias reductoras como por ejemplo el ácido ascórbico.

Gakenheimer y Feller, estudiaron la incompatibilidad entre la vitamina B-12 y el ácido ascórbico agregando a una solución que contenía  $15 \mu\text{g}/\text{cc}$  de vitamina B-12 cristalizada, ácido ascórbico en la proporción de  $10 \text{ mg}/\text{cc}$  y  $50 \text{ mg}/\text{cc}$  a otra muestra de la misma solución de vitamina B-12 cristalizada.

El mismo ensayo lo efectuaron con una solución de concentrado de vitamina B-12 (equivalente a  $15 \mu\text{g}/\text{cc}$  de solución)

Luego de esterilizar por filtración y envasar asepticamente en ampollas, se mantuvo a  $28-30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. La medición de vitamina B-12, por el método microbiológico indicó que más del 50% de la vitamina B-12 se había descompuesto.

Paralelamente se hicieron ensayos con las citadas soluciones de vitamina B-12 pero sin el agregado de ácido ascórbico sin observarse en la valoración descomposición de vitamina B-12.



### Propiedades terapéuticas de la vitamina B-12

Clinicamente se ha demostrado que su empleo provoca remisión de los síntomas de la anemia perniciosa, mejorando los de las anemias macrocíticas y megaloblásticas de la infancia. Con una cantidad de 10 mcg. de vitamina B-12, Ungley,<sup>11</sup> obtuvo un aumento de eritrocitos en anémicos perniciosos y con 15 mcg. el nivel de hematíes llegó a 4,5 millones por mm.<sup>3</sup>

La vitamina B-12 es activa por vía parenteral administrada en dosis del orden del microgramo (1 a 3 mcg. diarios) y se la ha identificado como el "Factor extrínseco de Castle" ó sea el componente exógeno del "Factor de maduración eritroblástica". Su acción antianémica también se manifiesta por vía oral siendo necesario para su utilización efectiva la presencia del "Factor intrínseco de Castle"; agente activador que existe en el jugo gástrico de acidez normal ó elevada pero es escaso en el paciente de anemia perniciosa pues el jugo gástrico es de baja acidez, por lo cual para que sea absorbida por vía oral debe ser acompañada de una adecuada cantidad de "Factor intrínseco", que existe en la mucosa estomacal y duodenal del cerdo.

Las proteínas animales constituyen el principal alimento aportador de vitamina B-12. Para su absorción es necesario su previa combinación con el "Factor intrínseco de Castle". La absorción se realizaría en el mismo estómago y primera porción del intestino delgado. Como la capacidad normal de absorción es baja, una buena parte de vitamina B-12, se elimina por las heces.

En el estado actual de su conocimiento, la vitamina B-12 puede explicar en el organismo viviente una serie de funciones.

Así, se la ha considerado como el componente principal del "Factor de Aprovechamiento Proteínico Animal (Animal Protein Factor), por lo que confiere al organismo mayor capacidad de asimilación del nitrógeno proteico acelerando el crecimiento por estímulo de la función plástica, lo que se ha puesto en evidencia experimentando en ratas, topos, pollos etc.

Su aplicación como estimulante del crecimiento de niños de desarrollo retardado ha sido comprobado en varios casos.

Sobre la célula hepática ejerce una acción protectora "ahorradora de la metionina", pues cuando esta vitamina está presente en la dieta, es posible utilizar la homocisteína en lugar de la metionina. Es además, capaz de aumentar "in vitro" en la célula hepática la reducción de los compuestos caracterizados por una función -S-S- .

Se le ha atribuido además un efecto antihistamínico y antianafiláctico que no se ha podido confirmar aún.

Por ser virtualmente atóxica ha sido usada con éxito en trastornos de origen hematológico, dermatológico, neurológico y gastrointestinales.

Se ha observado que la vitamina B-12, provoca una excreción del fenol en el anémico pernicioso, ejerciendo efecto análogo al de los extractos hepáticos . Esta disminución se interpreta como un índice de desintoxicación unido a la normalización del enfermo.

Las observaciones hechas sobre el comportamiento biológico de la vitamina B-12 y las que se irán efectuando, permiten suponer que se podrá llegar a la interpretación del exacto significado bioquímico de dicha vitamina.



## Propiedades farmacológicas de la vitamina B<sub>12</sub>

### Absorción:

La vitamina B<sub>12</sub> llega al organismo con los alimentos, principalmente las proteínas animales.

No obstante ser una sustancia muy soluble y difusible, su absorción que se realiza en el estómago y primera porción del intestino delgado, es extremadamente difícil aún en individuos normales. Para ello es necesario la combinación con el factor intrínseco de Castle, que es un agente activador termolábil, de naturaleza enzimática contenido en el jugo gástrico.

Castle en 1929, enunció la hipótesis de la formación del factor antianémico en el hígado. De acuerdo a esta teoría ciertos alimentos contendrían el factor extrínseco, termoestable, que se combinaría con el factor intrínseco y ambos originarían el factor antianémico, que absorbido se almacenaría en el hígado.

En la anemia perniciosa es típica la atrofia de la mucosa intestinal lo que ocasiona insuficiencia de factor intrínseco, en el jugo gástrico por él elaborado y por consiguiente deficiencia de factor antianémico.

El descubrimiento de la vitamina B<sub>12</sub> en 1948, y la eficacia de los resultados obtenidos al administrarse el factor antianémico en pacientes con anemia macrocítica, demostró claramente que el factor extrínseco, el factor antianémico y la vitamina B<sub>12</sub> eran una sola entidad química.

La intervención del factor intrínseco<sup>88</sup> no sería como reactivo químico, sino como agente imprescindible regulador de la absorción de la vitamina B<sub>12</sub>.

Para dilucidar si el factor intrínseco contenido en el jugo gástrico ácido actúa simplemente ayudando la absorción de la vitamina B<sub>12</sub> ó ambos factores juntos constituyen el factor hemopoyético presente en el suero normal, Ca-

to con la producida por las bacterias intestinales que la sintetizan en el cie-  
go y colon.

La eliminación por vía renal es escasísima aún cuando se hayan ingerido  
grandes dosis.

La eliminación es más rápida cuando ha sido administrada por vía endovenosa  
que cuando lo fue por vía intramuscular.

Introducida por vía parenteral circula por la sangre durante varias horas en  
forma libre y una pequeña parte en forma combinada. La forma libre sería ra-  
pidamente eliminada pero no la combinada.

Como toda la vitamina absorbida en el intestino se presentaría en la sangre  
bajo la forma combinada y su eliminación es escasa por la orina, aún cuando  
se haya ingerido dosis de hasta 10 mgs.

El organismo tiene poca tendencia a retener esta vitamina ya que su elimina-  
ción aumenta notablemente a continuación de su administración.

Metabolismo de la vitamina B<sub>12</sub>: Se ha demostrado el papel que desempeña como  
factor nutritivo esencial para el hombre, ratas, gallinas y muchas bacterias.  
Ejerce una notable acción antianémica, siendo el factor hemopoyético más ac-  
tivo que se conoce pues solo son necesarios microgramos para producir remi-  
sión de los síntomas de la anemia perniciosa.

Su principal función metabólica es la de promover la maduración de los eri-  
trocitos con lo cual queda normalizado el aspecto histológico de la médula  
ósea, el cuadro sanguíneo, el volumen globular y la concentración de hemoglo-  
bina. Interviene también en el metabolismo de las proteínas y nucleoproteínas  
siendo la respuesta hemática una de las consecuencias de la regulación de  
estos metabolismos.



Se sugiere que una defectuosa formación de ácidos nucleicos y nucleoproteínas conduciría al desarrollo de la anemia megaloblástica macrocítica.

El metabolismo del ácido fólico desempeña también una prominente posición en esta cadena de reacciones. En 1948 Sauberlich y Bauman<sup>12</sup>, comprobaron que el ácido fólico podía servir de factor de crecimiento para muchos *Lactobacillus* pero no para el *Leucenostoc citroverum* 8.180, que en cambio era estimulado en su crecimiento por el extracto hepático, por lo que concluyeron los autores citados, por aceptar que los extractos hepáticos contendrían un nuevo factor distinto al ácido fólico que denominaron Factor Citroverum.

Comprobaron estos autores que en la orina de ratas a las que se administró grandes dosis de ácido fólico, se ponía en evidencia la presencia de grandes cantidades de Factor citroverum, mientras que inhibiendo en el mismo animal la producción de ácido fólico por la administración de sulfaguaniidina, se suprimía casi íntegramente la eliminación urinaria de Factor Citroverum, lo que demostraba que este factor estaba estrechamente ligado al ácido fólico.

Nichel y Welch<sup>14</sup>, realizaron experiencia tendientes a demostrar que el ácido ascórbico favorece la conversión en el organismo del ácido fólico a Factor Citroverum.

Sauberlich<sup>16</sup> en 1949, observó que la aminopterina inhibe el crecimiento del *Leucenostoc citroverum*, pero que el Factor Citroverum supera tal inhibición al contrario de lo que hace el ácido fólico.

Bond y col.<sup>15</sup> en 1949, estudiaron el posible antagonismo del ácido fólico, encontrando que un derivado del ácido metilfólico era activo en tal sentido y obtuvieron el ácido folínico, convirtiendo el ácido fólico en formilfólico y después reduciendo el ácido formilfólico en presencia de ácido ascórbico.

El producto obtenido era 1 millón de veces más activo que el ácido fólico co-

no factor de crecimiento del *Leucenastoc citreorum*.

El ácido fólico y la vitamina B<sub>12</sub> intervienen respectivamente en la síntesis de la timina y de su desoxiribonucleósido ó timidina.

El ácido fólico no sería en realidad la forma biológicamente activa, la cual antes de actuar se transformaría en el organismo en un compuesto del tipo del ácido folínico.

El esquema siguiente explicaría la acción terapéutica intensa del ácido fólico y de la vitamina B<sub>12</sub> en la síntesis de la timina y de su desoxiribonucleósido ó timidina:



En la primera etapa de la síntesis de ácidos nucleicos, el ácido folínico probablemente actúe como una enzima en la metilación del uracilo para formar una base pirimidínica: la timina.

De manera similar, la vitamina B<sub>12</sub> parece promover enzimáticamente la transformación de la timina en nucleósido: timidina, que entonces entra en la formación de los ácidos nucleicos.

Una deficiencia ya sea de ácido folínico ó de vitamina B<sub>12</sub> interferirá en la síntesis de ciertos ácidos nucleicos, produciéndose la anemia macrocítica megaloblástica.

Existe una interrelación entre la vitamina B<sub>12</sub>, el ácido fólico y el ácido ascórbico, en la función de promover al desarrollo y maduración de los glóbulos rojos. Un hecho que hace destacar la necesidad de acción conjunta de la vitamina B y el ácido fólico, lo constituye el de ser ineficaz la acción de



la vitamina B<sub>12</sub> en la maduración de los megalo blastos si falta el ácido fólico. Además, cuando la vitamina B<sub>12</sub> es insuficiente el ácido fólico es ineficaz.

Se ha demostrado que una deficiencia de vitamina C, produce un mayor gasto sobre las reservas del organismo en ácido fólico, para mantener el metabolismo de los aminoácidos especialmente la tirosina, originando una anemia macrocítica.

La vitamina B<sub>12</sub> posee el carácter de Factor de Aprovechamiento Proteínico ó A.P.F., por favorecer el crecimiento por estímulo de la función plástica lo que se revela por una mayor retención del nitrógeno proteico.

El Factor de Aprovechamiento Proteínico sería idéntico a la vitamina B<sub>12</sub> ó estaría íntimamente ligado a ella.

Cuando falta el Factor de Aprovechamiento Proteínico, se altera el metabolismo proteico. Frost y col. comprobaron que ratas jóvenes a las que se administraba una dieta carente de vitamina B<sub>12</sub> crecían deficientemente pero luego el desarrollo tendía a normalizarse en proporción al tener de vitamina B<sub>12</sub> del alimento.

c) Constitución química:

La fórmula molecular de la vitamina B-12 es aproximadamente la siguiente: C<sub>61</sub>/64 H<sub>86</sub>/92 N<sub>14</sub> O<sub>13</sub> P Co.

En 1949, Folkers y colaboradores<sup>12</sup> determinaron que su peso molecular está próximo a 1300, de acuerdo al contenido en cobalto; determinado por ebullioscopia en solución alcohólica, dió un valor de 1490 más ó menos 150, demostrando el contenido en la molécula de un solo átomo de cobalto.

La presencia de cobalto ha sido demostrada por análisis espectrofotográficos y, basándose en los estudios de susceptibilidad magnética de esta vitamina se ha comprobado que es un complejo de coordinación cobáltico, siendo la unión del cobalto del tipo covalente más que iónico.

La proporción de cobalto, determinado en el producto desecado al vacío es de 4% y a este elemento se asociaría el color propio de esta vitamina .

En cuanto a la función biológica del cobalto, diremos que su importancia en la biosíntesis de la vitamina B-12, se ha verificado experimentalmente con



microorganismos como el *Mycobacterium smegmatis*, *Streptomyces griseus* y *Pseudomonas* sp. que cultivados en medios a los que no se agregó cobalto, la cantidad de sustancia activa del *Lactobacillus lactis* Dörner producida fue de 540,880, y 640 microgramos por miligramo respectivamente, mientras que en medios que tenían cobalto producían 3800, 3500 y 3000 microgramos por miligramo de sustancia activa del *Lactobacillus lactis* Dörner.

Ellis, Petrow y colaboradores<sup>17</sup> en 1949, hallaron luego de hidrolizar la vitamina B-12 con HCl al 20% y calentar 6 horas a 100°C, que el equivalente de P es del 2%.

De acuerdo con la determinación de cobalto, la relación Co:P es 1:1.

Para Smith<sup>20</sup> en cambio, sería de 1:3 lo que implicaría la existencia de dos factores de propiedades hematopoyéticas que contienen cobalto.

El conocimiento de que el P y el Co existen en la molécula de vitamina B-12, permitió su engarce con isótopos radioactivos de estos metales a fin de facilitar los estudios en el metabolismo.

Lester Smith y colaboradores<sup>21</sup>, incorporaron el Co<sup>60</sup> y el P<sup>32</sup> a la vitamina B-12 producida en la fermentación del *Streptomyces griseus*, obteniendo productos de actividad radioactiva notable.

La vitamina B-12 contiene en su molécula un grupo nitrilo destinado a coordinar el átomo de cobalto.

La existencia de este nitrilo se determinó por oxidación en un sistema cerrado. La vitamina B-12 disuelta en ácido sulfúrico 0,75N se hace reaccionar con permanganato de potasio al 2% y a la temperatura de 0°C.

La mezcla de reacción se calentó a 75°C y los gases que se producían se hicieron pasar a través de una solución diluida de hidróxido de sodio donde se

comprobó la presencia de nitrilo con bencidina, cobre y sulfato de hierro.

Brink, Kuehl y colaboradores<sup>22</sup>, obtuvieron también una liberación del ácido cianhídrico por calentamiento de la solución de vitamina B-12 en ácido clorhídrico ó solución acuosa de ácido oxálico, a la temperatura de ebullición bajo reflujo durante 5 horas.

En cambio no pudieron comprobar la presencia de nitrilo cuando la vitamina B-12 es calentada con ácido sulfúrico en condiciones similares a las señaladas para el ácido clorhídrico u oxálico, debido a que el ácido sulfúrico muestra una ligera tendencia a formar complejos de coordinación con el cobalto impidiendo el desplazamiento del nitrilo de la esfera de coordinación.

La demostración de que la vitamina B-12 no es de naturaleza polipeptídica fue realizada por Brink, Wolf, Kaczka y colaboradores<sup>23</sup>, hidrolizando con HCl 6N y tratando el producto de hidrólisis con ninhidrina que reveló ausencia de aminoácidos.

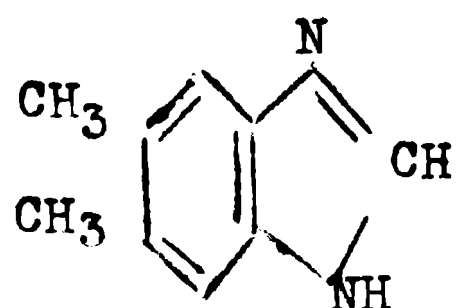
Brink y colaboradores<sup>24</sup>, llegaron a establecer la posibilidad de la existencia de anillos pirrólicos en la molécula de vitamina B-12, al observar que por fusión alcalina reacciona con el reactivo de Ehrlich (p-dimetilbenzaldehído) dando una coloración roja que es característica de las sustancias nitrogenadas incluyendo los pirroles.

Un paso de notable importancia sobre la fórmula de la estructura de la vitamina B-12, ha sido el estudio de los productos de demolición por hidrólisis ácida.

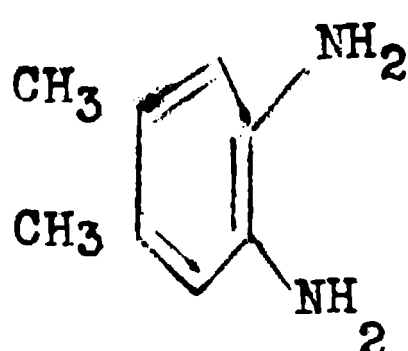
Brink, y Folkers<sup>25</sup> en 1949, han logrado aislar como producto de demolición de la hidrólisis ácida de la vitamina B-12, un compuesto de naturaleza básica que por datos analíticos y sintéticos se comprobó es el 5-6 dimetil-bencimidazol, pues tratando el 1-2 diamino 4-5 dimetil benceno con



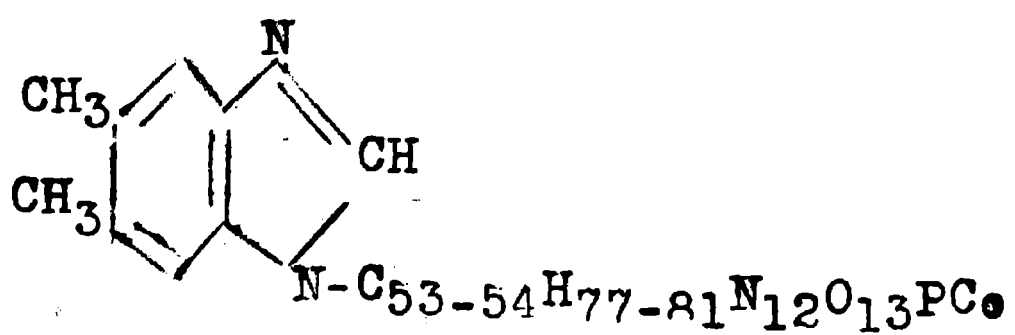
ácido fórmico se obtuvo el 5-6 dimetil-bencimidazol con un punto de fusión igual a P.F 204-205°C, idéntico al producto de estudio.



5-6 dimetil-bencimidazol



1-2 diamino 4-5 dimetilbenceno



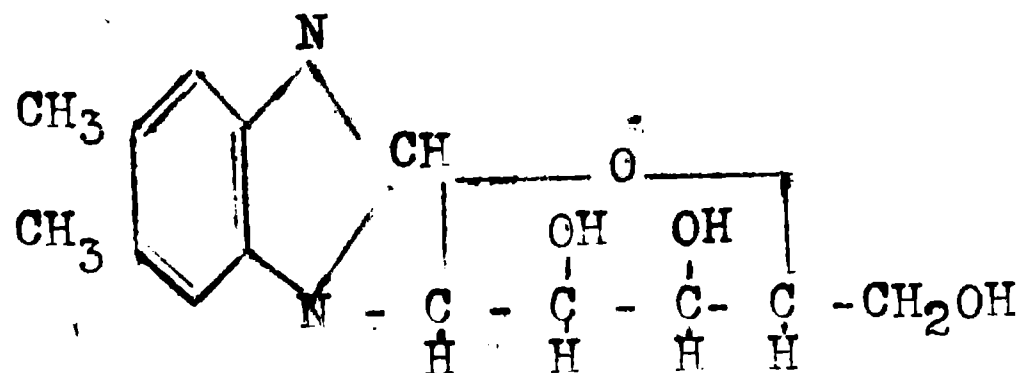
Fórmula que se atribuya a la vitamina B-12

Los estudios de Brink, Helly y colaboradores, sobre la degradación hidrolítica de la vitamina B-12, han permitido establecer que tales fragmentos de la citada vitamina, se encuentran ligados en la sustancia originaria bajo la forma de ribósido.

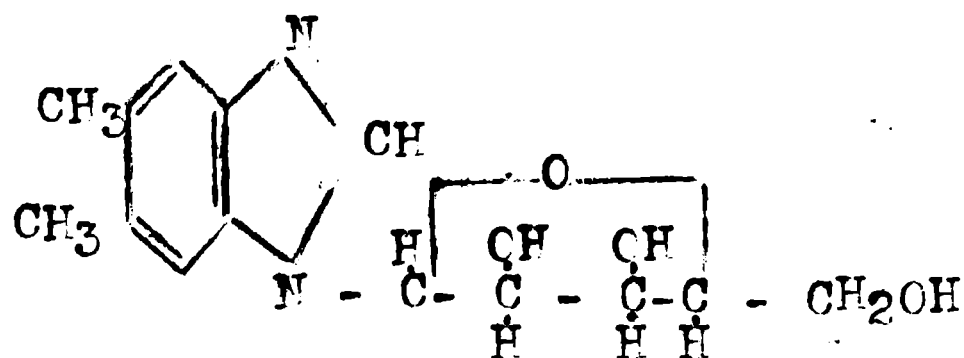
Este producto de degradación se ha podido aislar bajo la forma de picrato de 1 $\alpha$ -d-ribofuranósido 5-6 dimetil bencimidazol, cuya naturaleza química ha sido confirmada por vía sintética condensando la 2-nitro 4-5 dimetil anilina con el 5-tritil d-ribofuranósido a 2-nitro 4-5 dimetil N(5-tritil-d-ribofuranósido)-anilina, reduciendo el nitroderivado a amina y engarzando al final el núcleo bencimidazólico con ester etilminofórmico. Por hidrólisis ácida de este último producto se obtuvo una sustancia cuyo picrato se ha demostrado es idéntico al picrato del producto natural tanto por sus propiedades físicas como químicas.

Por un método de síntesis análogo al usado para el isómero  $\alpha$  se ha podido sintetizar el isómero  $\beta$  1-d ribofuranósido 5-6 dimetil-bencimidazol.

Con el objeto de simplificar la nomenclatura, se ha propuesto designar como  $\alpha$  y  $\beta$  Ribazol al  $\alpha$  y  $\beta$  1-d-ribofuranósido 5-6 dimetilbencimidazol.



$\alpha$  Ribazol



$\beta$  Ribazol



En lo que respecta a la relación entre las propiedades biológicas y la estructura química, Folkers<sup>27</sup>, hizo notar que una fracción del 5-6 dimetil-bencimidazol, ó sea la parte que corresponde al 1-2 diamino 4-5 dimetilbenceno, se encuentra tanto en la vitamina B-12 como en la Riboflavina Lixoflavina (aislada del miocardio humano) y en algunos 5-6 dimetil-bencimidazoles de interés biológico.

Estos productos de degradación por hidrólisis ácida, tienen una actividad biológica similar a la de la vitamina B-12. Las experiencias realizadas con el  $\alpha$  y  $\beta$  Ribazol revelaron una actividad igual a 1/400 de la vitamina B-12 al ser suministrados a animales junto con polvo de tiroides y faltando en la dieta las proteínas animales.

La hidrogenación catalítica de la vitamina B-12, en presencia de óxido de platino, fue realizada por Kaczka, Wolf, Folkers y colaboradores<sup>28</sup>, obteniéndose un producto que extraído por acetona cristalizó en agujas rojas. Este compuesto se designó como vitamina B-12a, siendo sus índices de refracción:  $\alpha$ : 1.580,  $\beta$ : 1.640,  $\gamma$ : 1.654. El espectro de absorción demostró un máximo de 2,780 A, 3,610 A, y 5,500 A igual que la vitamina B-12.

El contenido de cobalto se comprobó es de 4,58% y el de fósforo 2,43% .

Observaciones de Kaczka, Wolf y colaboradores<sup>29</sup>, demostraron que en la vitamina B-12a no existe el grupo nitrilo, presente en el complejo de coordinación cobáltico de la vitamina B-12, pero sí a una solución de vitamina B-12a, se agrega iones CN, se transforma en vitamina B-12.

Las soluciones acuosas de vitamina B-12a tienen un pH cercano a 9 y en las titulaciones se comporta como una base débil con un grupo hidroxilo que ha reemplazado al ión CN, de ahí la denominación de Hidroxicobalamina, mientras que la vitamina B-12 se denomina Cianocobalamina.

De los productos de fermentación del *Streptomyces aureofaciens*, Pierce, Page y colaboradores<sup>20</sup>, describen el aislamiento, en forma cristalizada de la vitamina B-12b. Jackson, Whitfield, De Vries y colaboradores<sup>31</sup>, la obtuvieron como subproducto de la fermentación de la Neomicina.

Su contenido en cobalto es cercano a 3,64% y el de fósforo de 2%.

Su espectro de absorción es similar al de la vitamina B-12a, no existiendo en ambos la banda de absorción a 2.140  $\text{cm}^{-1}$  que se observa en la vitamina B-12.

Al igual que la vitamina B-12a difiere de la Cianocobalamina por la ausencia del grupo nitrilo, conteniendo un grupo hidroxilo en su lugar. Basándose en las características físicas, ha sido demostrado que las vitaminas B-12a y B-12b, son idénticas, pudiendo estos dos factores ser fácilmente transformados en Cianocobalamina por tratamiento con cianuro de potasio.

Lang y Chow<sup>32</sup>, estudiaron la inestabilidad de la vitamina B-12 al ser calentada en presencia de agentes reductores.

Frost y colaboradores<sup>33</sup>, demostraron la estabilidad diferencial entre la Cianocobalamina y la Hidroxicobalamina en presencia de ácido ascórbico, proponiendo su uso como medio de diferenciación de la Hidroxicobalamina. En tales condiciones ésta fue destruida completamente, no siendo afectada la vitamina B-12 pura. En los concentrados comerciales, la relación Hidroxicobalamina/Cianocobalamina, se encontró que varía ampliamente.

Anslow y colaboradores<sup>34-38</sup> (1950), al efectuar estudios en el grupo de la vitamina B-12, aislaron por adsorción cromatográfica de los líquidos de fermentación del *Streptomyces griseus*, las vitaminas B-12c y B-12d.

Se diferencian de las vitaminas B-12a y B-12b por sus propiedades físicas y químicas. Entre las propiedades físicas que han permitido su identificación citaremos el espectro de absorción y la partición cromatográfica.

La vitamina B-12d posee un espectro de absorción idéntico al de la vitamina B-12b, pudiendo separarse de ésta por vía cromatográfica.

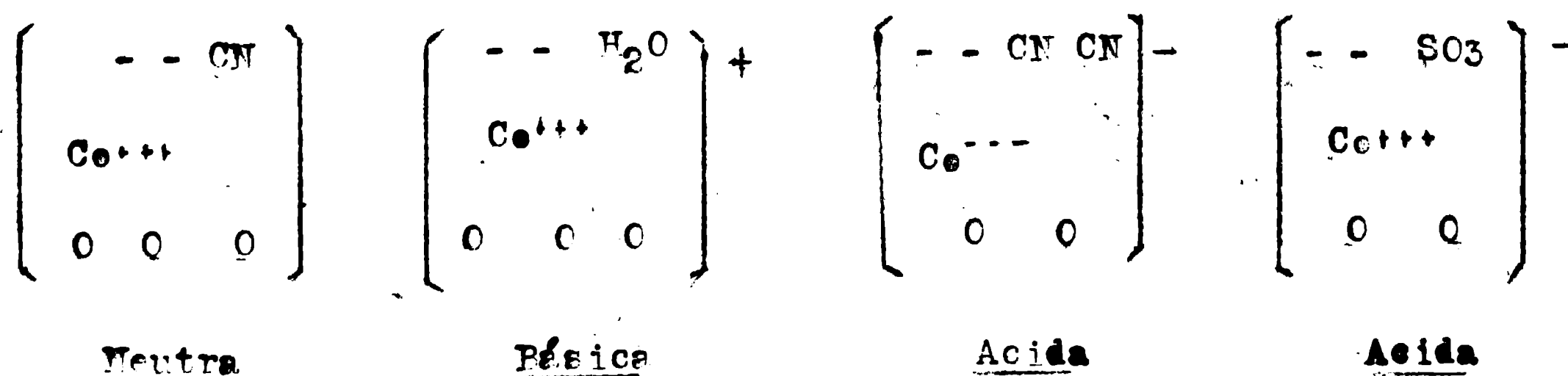
Estos nuevos factores resultarían derivados de modificaciones químicas no profundas en la molécula de la vitamina B-12.

La vitamina B-12c se obtiene tratando con ácido nitroso la vitamina B-12b y se diferencia de la Cianocobalamina por tener un grupo nitro en lugar del grupo nitrilo.

La vitamina B-12d se obtiene eliminando de la vitamina B-12c el grupo nítrico comportándose como la vitamina B-12b de la que se diferencia por su constitución química.

La actividad antiperniciosa de las vitaminas B-12c y B-12d ha dado iguales resultados que las vitaminas B-12a y B-12b y que la vitamina B-12 cristalizada, desde el punto de vista cuali y cuantitativo. Por lo tanto para la cura de la anemia perniciosa, los constituyentes individualizados del "grupo B-12", son terapéuticamente equivalentes.

Lester Smith y colaboradores<sup>3r</sup>, al estudiar la estructura y la estabilidad de una serie de cobalaminas por medición del espectro de absorción y los coeficientes de absorción, demostraron que además de las cobalaminas neutras y básicas hay una tercera serie de cobalaminas que son ácidas que contienen dos iones ácidos que pueden ser iguales ó no ó bien un ión bivalente como el ión sulfito. Estas cobalaminas ácidas son inestables y solo persisten en soluciones que contienen exceso del ión de coordinación.





Heathcote,<sup>36</sup> investigó la presencia posible de otros cuerpos parecidos a la vitamina B-12 en muestras comerciales de cobalaminas de acuerdo a los ensayos de pureza de U.S.P., determinando el coeficiente de partición de cobalamina entre los sistemas solvente/agua.

Señala el valor de la distribución de esta vitamina entre los sistemas: alcohol/agua, butanol/agua etc.

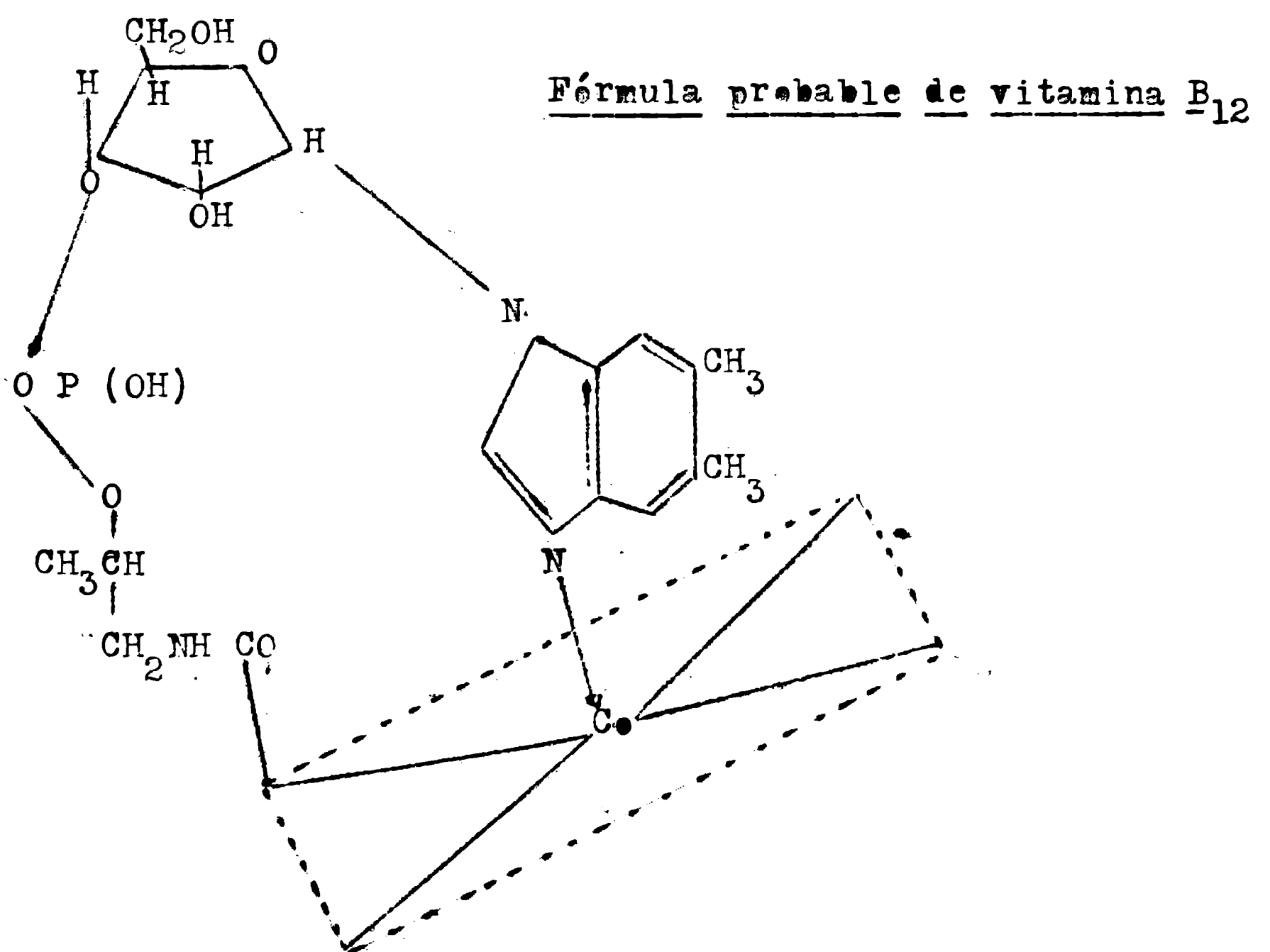
Todd y colaboradores en 1951<sup>37</sup>, señalaron los progresos en el estudio de la estructura química de la vitamina B-12.

a) Una parte de la molécula individualizada como 5-6 dimetilbencimidazol está unida con un puente glucosídico a una molécula de ribosa fosforilada, en C-2 o en C-3.

b) La porción conteniendo cobalto está unida a la restante porción de la molécula a través del grupo fosfórico y representa las 2/3 partes de la molécula misma y su estructura no está todavía aclarada.

c) Además han sido aisladas: 1 molécula de amoníaco y 2 moléculas de 1-d amino 2-propanol.

Su fórmula, basada en los estudios espectroscópicos de Beaven, Holyday, Johnson, Ellis y Petrow,<sup>38</sup> sería la siguiente:



El grupo de vitamina B<sub>12</sub> Aislamiento de nuevos factores

Ford, Holdsworth y Porter<sup>73</sup> en 1953, demostraron que en los extractos del contenido intestinal de ternera y sus heces, existen junto con la cianocobalamina, 4 formas relacionadas: factores A, B, C y pseudovitamina B<sub>12</sub>.

Gant, Lester<sup>74</sup> Smith y Parker (1954), revelaron que la hidrólisis ácida, produce la eliminación del nucleótido en la cianocobalamina, en el factor A y en la pseudovitamina B<sub>12</sub>.

Tanto el factor A como la pseudovitamina B<sub>12</sub> difieren solamente de la cianocobalamina en la naturaleza del nucleótido.

En la cianocobalamina el nucleótido es el fosfato de 5-6 dimetilbencimidazol D-ribofuranosa. (Buchanan, Johnson, Mills, Todd<sup>77</sup>, 1954).

En la pseudovitamina B<sub>12</sub> el nucleótido ha sido identificado como adenina. (Dion, Calkins y Pfiffner<sup>75</sup>, 1952); y la 2-metil adenina en el factor A. (Brown, Lester Smith<sup>74</sup>, 1954) (Dion, Calkins y Pfiffner<sup>75</sup>, 1954).

La sustancia resultante de la eliminación del nucleótido en la cianocobalamina en el factor A y en la pseudovitamina B<sub>12</sub> ha sido identificada como factor B. No se sabe que nucleótido, si existe, está presente en el factor C.

La actividad microbiológica del factor A y de la pseudovitamina B<sub>12</sub> es del mismo orden que la cianocobalamina para microorganismos como *Escherichia coli* 113-3, pero menor para el *Lactobacillus leichmannii*.

Ford y Holdsworth<sup>76</sup> en 1954, realizaron estudios sobre la biosíntesis de la vitamina B<sub>12</sub>. Observaron los compuestos que se formaban cuando se agregaba al medio de cultivo necesario para el desarrollo de *Escherichia coli*, purinas, pirimidina y vitaminas. La pseudovitamina B<sub>12</sub> se produ-

cía cuando al sistema se agregaba adenina y se formaba cianocobalamina cuando se agregaba riboflavina ó sustancias relacionadas como por ej. 1-diamino-3-4 dimetil 6-D-ribitil amino benceno, 4-5 dimetil o-fenilendiamina y 5-6 dimetilbencimidazol.

Los compuestos resultantes eran microbiológicamente activos para el Bacterium coli, Lactobacillus leichmannii y para un protozoario Ochromonas malhamensis.

Woolley (1950-1951), emitió la teoría de que la riboflavina y la cianocobalamina están íntimamente relacionadas ya que ambas tendrían como precursor común del nucleótido al 4-5 dimetil 1-2diamino benceno el cual sería capaz de sintetizar, en un medio biológico adecuado, la cianocobalamina.

Cooperman, Talenkin y Drucker (1952), Hartman, Dryden y Cary (1951), observaron que en dietas deficientes de vitamina B<sub>12</sub>, los bencimidazoles sustituidos promoverían una intensa síntesis intestinal de distintas formas de vitamina B<sub>12</sub>, activa para los animales superiores.



Estructura molecular de la vitamina B<sub>12</sub> y su producto de degradación el ácido hexacarboxílico

La deducción de la estructura molecular de la vitamina B<sub>12</sub> ha sido lograda por el estudio combinado del análisis químico y el análisis cristalográfico con los rayos X.

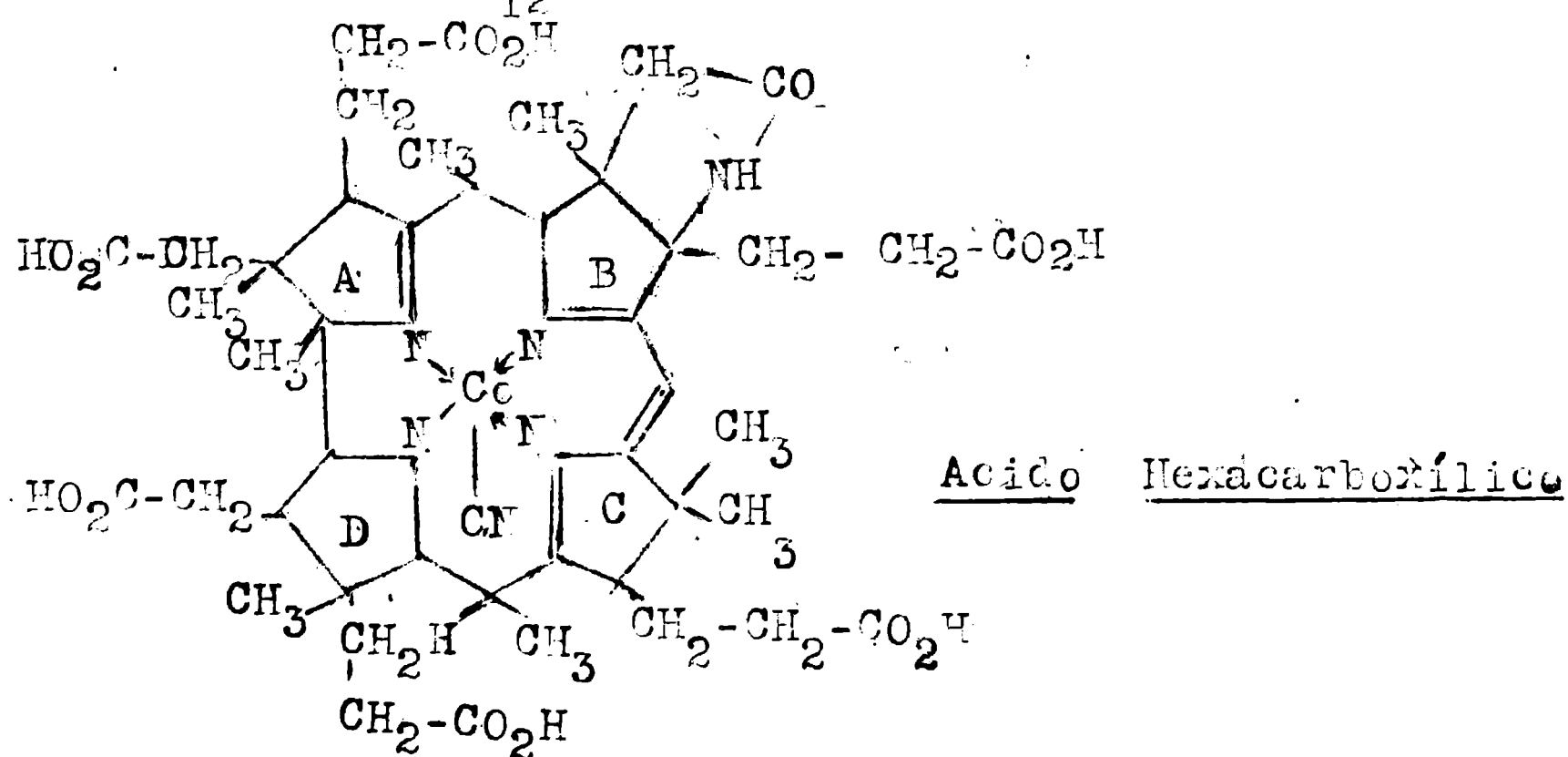
En la parte química se destacaron Armitage, Cannon, Johnson, Lester Smith y Todd de la Universidad de Cambridge y en la química cristalográfica, Crowfoot y Hodgkin, de la Universidad de Oxford.

Se estableció que el peso molecular de la vitamina B<sub>12</sub> es 1357, conteniendo su molécula 183 átomos y su fórmula química es: C<sub>63</sub>H<sub>90</sub>O<sub>14</sub>N<sub>14</sub>PCo

El cromóforo de esta vitamina es la porción responsable del color de la molécula y contiene el ácido hexacarboxílico, de estructura semejante a una porfirina.

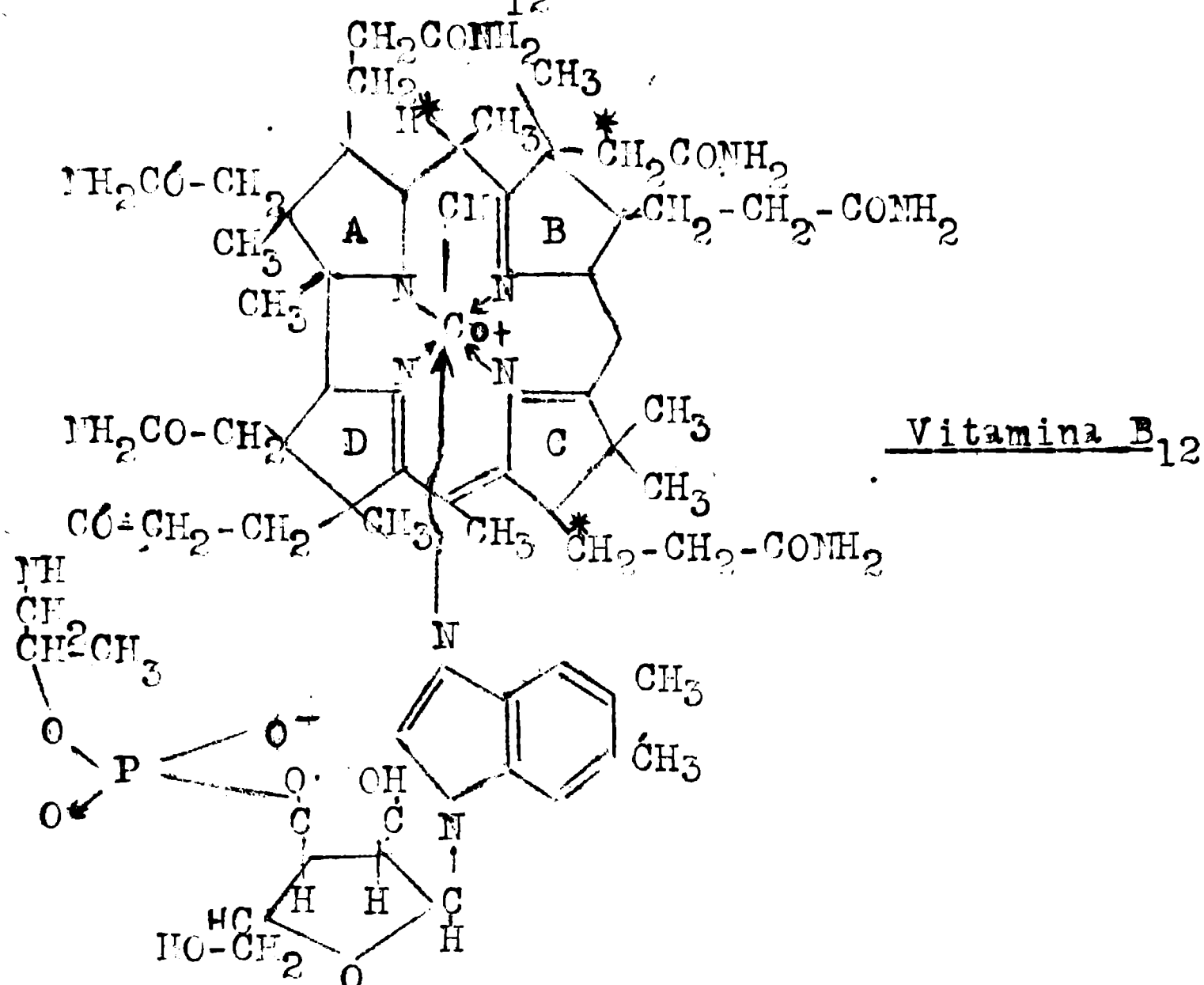
El ácido hexacarboxílico se libera cuando se hace actuar sobre la vitamina B<sub>12</sub> a 120°C, hidróxido de sodio al 30%. Contiene 6 grupos ácidos carboxílicos, pero carece de la cadena bencimidazol-ribosa-fosfato-propanol-amina.

Este ácido que ha sido aislado en estado cristalino por electroforesis sobre papel y cromatografía, resultó altamente satisfactorio para demostrar la existencia en la molécula de vitamina B<sub>12</sub> de una estructura modificada de tipo porfirina.



El análisis cristalográfico con rayos X, de muestras del ácido hexacarboxílico, permitió identificarlo como el cromóforo de la vitamina B<sub>12</sub>, confirmándose así la estructura de esta parte de la molécula, con lo cual se completó la dilucidación de la molécula completa.

La fórmula completa de la vitamina B<sub>12</sub> es:



De acuerdo con esta estructura la vitamina B<sub>12</sub> posee:

- 1) 4 núcleos pirrólicos con cadenas laterales de ácido acético y propiónico sustituido
- 2) 6 grupos amida primarios y 1 grupo amida secundario, uniendo el resto de amino propanol al ácido propiónico agrupado en el anillo D.
- 3) Se observa también que esta vitamina es un diéster del ácido fosfórico, siendo neutralizado el grupo ácido libre del fosfato por una carga positiva sobre el átomo de cobalto.

La aceptación como sistema conjugado en su estructura no solamente se ha demostrado por los datos resultantes de los estudios por rayos X, sino también por el comportamiento de la vitamina B<sub>12</sub> a la cloruración con N-cloramida, consumiendo 3 moléculas de reactivo. El ácido hexacarboxílico, en cambio, sometido al mismo tratamiento, consume 2 moléculas del citado reactivo. La cloruración se hace en cada una de las 3 posiciones activadas señaladas en la fórmula con asteriscos.



d) Métodos de valoración

1) Químicos:

Los métodos publicados de valoración química de la vitamina B-12, incluyen la determinación colorimétrica del ácido cianhídrico liberado de la vitamina B-12 por fotólisis y la del pigmento rojo formado por tratamiento ácido de la vitamina B-12.

Boxer y Rickards, de los Laboratorios Merck, efectuaron la determinación química de la vitamina B-12 por liberación cuantitativa del ciano grupo por la luz visible con el subsiguiente aislamiento y determinación colorimétrica del ácido cianhídrico liberado. Para ello, la muestra con un contenido de 2 a 20 microgramos de vitamina B-12, se homogeiniza con 10 ml de agua y 1 ml de Tween 80 en un recipiente de acero ó metal Monel. La solución se pasa al tubo de reacción, se agrega solución normal de ácido sulfúrico gota a gota hasta que el pH esté por debajo de 5. Se conecta el tubo de reacción con el equipo de aereación y se elimina el ácido cianhídrico libre de

la solución por corriente de nitrógeno en la proporción mínima de 500 ml por minuto. Durante la operación el recipiente de reacción debe mantenerse al abrigo de la luz. Se continua la aereación hasta tener resultado negativo de ácido cianhídrico. Se procede entonces a la liberación del ciano grupo de la vitamina B-12 colocando el tubo de reacción dentro de la cámara de iluminación y haciendo pasar nitrógeno durante  $2\frac{1}{2}$  horas.

El ácido cianhídrico liberado por iluminación se determina en el contenido de un tubo colector que es enfriado en baño de hielo y se agrega 0,2 ml de solución reactivo de Fosfato de cloramina T (1) y 3 ml de solución reactivo de Pirazolona-Piridina.

Se extrae el tubo del baño de hielo y se deja a la temperatura ambiente durante 1 hora hasta la aparición de una intensa coloración que se mide por un espectrofotómetro modelo Coleman 14 a 620 m $\mu$  usando en filtro P.C.5.

(1) Solución reactivo de Fosfato de Cloramina T

Preparación: Se agrega a una parte de la solución de Cloramina T al 0,25%, 3 partes de una solución de fosfato monosódico 1M. El reactivo se usa cuando no hay más separación de flóculos, lo que sucede luego de 15-30 minutos.

(2) Solución reactivo de Pirazolona-Piridina

Preparación: 5 partes de una solución acuosa saturada de metil-fenil-pirazolona se mezclan con una parte de la solución de bis-metil-fenil-pirazolona en piridina.

Este reactivo debe protegerse de la luz y ser desechado cuando aparece un color rosado.

Lester Smith (1948)<sup>40</sup>, observó que el producto rojo de hidrólisis ácida de la vitamina B-12, se extraía por butanol.

Fantes y Ireland<sup>41</sup> (1950), ensayaron un método colorimétrico cuantitativo para la vitamina B-12, midiendo la intensidad del color rojo del producto de hidrólisis ácida y luego de extracciones repetidas para separarla de sus impurezas. La hidrólisis se hace con HCl N10 en tubos cerrados y a la temperatura de 100°C durante algunas horas. El hidrolizado se agita con igual volumen de alcohol n-octílico durante 2-3 horas. Se decanta una cantidad alícuota de la capa alcohol n-octílico y se diluye con 7 volúmenes de éter de petróleo: se lava con una mezcla de 4 partes de metanol y 1 parte de HCl N. La intensidad del color rojo de la capa alcohol n-octílico-éter de petróleo se lee en una microcélula de un fotómetro Hilger usando un filtro Ilford 604. Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por medición microbiológica.

Este método fue aplicado para la medición de vitamina B-12 en los líquidos de fermentación del *Streptomyces griseus*, parcialmente purificados y en los extractos de hígado comerciales con un contenido de 0,2% de vitamina B-12 sobre el total de sólidos.

La mínima cantidad de vitamina B-12 que puede ser medida es de alrededor de 40 microgramos en no más de 2 ml.

Rudkin y Taylor<sup>42</sup> (1952), describen un método químico de valoración basado en la diferencia entre el espectro visible de la vitamina B12 y el espectro del complejo dicianúrico formado en soluciones que contienen exceso de ión cianuro. La diferencia de los dos espectros es máxima a 528 m $\mu$

con  $\Delta E = 54$ .  
 $\frac{1\%}{1\text{cm}}$



Utilizando esta diferencia en el análisis de la vitamina B-12 se corrige automáticamente en mucho la interferencia de absorción hallada en las preparaciones crudas. Sin embargo es aún impracticable determinar vitamina B-12 directamente de los caldos de fermentación a causa del bajo nivel de vitamina B-12 activa y la gran cantidad de impurezas coloreadas en la región roja del espectro.

A fin de efectuar una concentración de la actividad y una purificación parcial se incorpora al presente método una extracción con un solvente altamente selectivo que elimina más del 90% de la absorción extraña en la región roja del espectro y al mismo tiempo eleva cerca de 8 veces la concentración de vitamina B-12 de manera de tener en el espectrofotómetro lecturas exactas.

Pereira Forjaz<sup>44</sup> (1949), hizo la determinación espectrofotométrica de la vitamina B-12, con un filtro para el ultravioleta teniendo que esta sustancia tiene en el campo del ultravioleta a 361 m $\mu$  su máximo de absorción. A tal absorción le corresponde un coeficiente de extinción =

$$\Delta E = \frac{1\%}{1\text{cm}} \cdot 361 \cdot 207.$$

Se determina primero la desviación del rayo luminoso para el agua destilada luego para la solución de vitamina B-12 cuya concentración se desea conocer. Relacionando la densidad óptica correspondiente a esta desviación con el coeficiente de extinción, se tendrá directamente el título de vitamina B-12 en la solución.

Francois Patte<sup>44</sup> (1951), valora la vitamina B-12 por cromatografía ascendente. Esta técnica consiste en depositar sobre una misma hoja de papel de filtro, dos gotas de una solución tipo de vitamina B-12 de concentración conocida y dos gotas de la solución a titular. Se efectúa una

cromatografía ascendente rápida al butanol que tiene por objeto separar los derivados del ácido desoxiribonucleico que también provocan el crecimiento de diversos *Lactobacillus* (*L. leichmannii*, *L. lactis* Dorner.)

El cromatograma se revela sobre gelosa sembrada con *Lactobacillus leichmannii* y se compara las zonas de crecimiento de las muestras a titular de vitamina B-12 con las de la solución tipo.

Patte, señala que este método puede ser también empleado para líquidos de cultivos complejos que contienen junto con la vitamina B-12 uno ó más antibióticos, haciendo una cromatografía sobre papel impregnado de KCN en una atmósfera de HCN. El solvente de ampliación usado es el isopropanol al 30%. La revelación del cromatograma se hace por difusión en gelosa sembrada con *Escherichia coli*.

## 2) Microbiológicos:

Los métodos microbiológicos de medición de la vitamina B-12 se basan en el efecto acelerador de esta vitamina, sobre el crecimiento de ciertos tipos de microorganismos como bacilos ácidos lácticos ó flagelados verdes. Ese crecimiento se evalúa por turbidimetría ó por acidimetría.

Para efectuar la medición microbiológica de la vitamina B-12, debe tenerse en cuenta:

- 1) El germen test
- 2) Mantenimiento de la cepa
- 3) El medio de medición
- 4) Preparación del material a medir
- 5) La siembra
- 6) La lectura e interpretación de los resultados

### 1) El germen test:

En el método microbiológico original, Shorb<sup>"</sup> (1947), empleó el *Lactobacillus lactis* Dorner (A.T.C.C. 8.000), como germen de control. Este método permitió determinar la concentración del entonces denominado factor L.L.D. en los preparados hepáticos así como establecer su relación con la potencia antianémica. Pero el *Lactobacillus lactis* Dorner dio resultados dudosos en la medición de preparados poco purificados, lo cual Shorb atribuyó a dos motivos: disociación de la cepa en los repiques y la presencia en los extractos de sustancias inhibitoras como serina, ácido p-amino benzoico, xantina, sulfato de manganeso, cloruro de sodio, sulfato ferroso y altas concentraciones de ácido fólico.



A estas causas pueden agregarse otros factores tales como: presencia en el medio de timidina, ácido ascórbico y aire en el agua del medio.

El desarrollo del *L. lactis* Dorner puede mantenerse en un medio sin vitamina B-12, tal como lo demostró Shive<sup>v1</sup> (1948), por el agregado de 1-3 gamas de timidina ó 1 mg de ácido ascórbico en agua destilada aireada.

Green, Brook y Mc. Cormack<sup>v1</sup> (1949), encuentran en el ensayo del factor antianémico respuestas muy irregulares al utilizar un medio conteniendo caseína hidrolizada en medio ácido y jugo de tomates y como germen testigo el *L. lactis* Dorner.

Al estudiar los factores que afectan las mediciones de B-12 con este germen, encuentran que operando al vacío y con el agregado de cisteína ó tioglicocolato de sodio puede obtenerse un máximo desarrollo sin la incorporación de vitamina B-12.

Koditschek y colaboradores<sup>v1</sup> (1949), demostraron que el *L. lactis* Dorner no se desarrolla en ausencia de CO<sub>2</sub> aunque esté presente en el medio el factor de crecimiento L.L.D. Observaron además que el *L. lactis* se desarrolla en presencia de CO<sub>2</sub> y en las condiciones de anaerobiosis producidas por el agregado de sustancias reductoras, vacío u otras sustancias que descenden el potencial de oxidación del medio.

Para evitar todos estos inconvenientes se buscaron otros microorganismos de mayor selectividad y estabilidad ya que los requerimientos complejos para el crecimiento del *L. lactis* corrientemente usados en los métodos de medición microbiológicos de vitamina B-12, lo hacen dificultoso e impracticable.

Skeggs, Ruff y Wright (1948)<sup>o</sup>, propusieron el empleo del *Lactobacillus leichmannii* (A.T.C.C. 4797) , que originariamente fue usado para controlar la prepa-

ración y purificación de "Animal Protein Factor".

Cuando las publicaciones de Ott, Rickes y Wood<sup>61</sup> (1948), señalaron que el "Animal Protein Factor" es idéntico ó está estrechamente relacionado con la vitamina B-12, consideraron al *L. leichmannii* como el germen de elección para la determinación de vitamina B-12.

El ácido ascórbico y el aire tienen también influencia en el desarrollo del *L. leichmannii*, pero sus efectos pueden ser mínimos esterilizando el material en autoclave durante 15 minutos a 120°C. Debe ser tenida en cuenta la presencia de timidina especialmente en el caso de materiales poco purificados, pues puede conducir a resultados dudosos.

Hoffman, Skeggs y colaboradores<sup>62</sup> (1948), propusieron también el *L. leichmannii*, empleando la cepa 313 y el medio de cultivo de Snell, haciendo las lecturas a las 14 horas. Indican que el germen no responde al agregado de vitamina B-12 cuando el medio no contiene ácido pteroilglutámico ni ácido p-amino benzoico y que cuando el ácido pteroilglutámico llega a 50 gamas actúa como inhibidor.

Winsten y Eigen<sup>63</sup> (1948), realizaron el estudio de cromatogramas de diversas preparaciones de reconocida actividad antianémica, revelando que por lo menos seis especies químicas son capaces de mantener el desarrollo del *L. leichmannii* 313, en ausencia de vitamina B-12, con lo que se demuestra su falta de especificidad.

Capps, Fox y Hobbs<sup>64</sup> (1949), emplearon la cepa de *L. leichmannii* (A.T.C.C. 4797) que presenta las mismas necesidades nutritivas que el *L. lactis* Dorner, pero que es más estable y exhibe menor tendencia a la disociación.

Burholder (1951)<sup>65</sup>, describe un método de medición de la vitamina B-12, usando como germen test una cepa de mutación de la *Escherichia coli*.

La cepa mutante fue obtenida de los cultivos de la *Escherichia coli* W. (A.T.C.C. 9637), sometida a la irradiación con rayos ultravioletas.

Se obtuvieron así dos cepas de mutación: la cepa 113-3, que daba respuestas positivas a la metionina y a la vitamina B-12 y la cepa 26-18, que era estimulada por la metionina pero no por la vitamina B-12.

La cepa que se usa es la 113-3 por la gran sensibilidad para las concentraciones relativamente bajas de vitamina B-12 en comparación con el requerimiento mayor de metionina.

La posibilidad de usar la cepa 113-3 en los ensayos específicos de vitamina B-12, fue señalada por Davis y Mingioli, que observaron que el crecimiento de esa bacteria en ausencia de vitamina B-12, no quedaba satisfecho por una variedad de compuestos que incluye ciertos ácidos aminados, vitaminas, purinas, pirimidinas, ribonucleósidos, timidina e intermediarios de la molécula de vitamina B-12.

## 2) Mantenimiento de la cepa:

Cuando se usa el *Lactobacillus leichmannii* cepa A.T.C.C. 4797, que es la adoptada por la mayor parte de los investigadores, se consigue conservar su sensibilidad a la vitamina B-12 haciendo repique mensuales en medio sólido constituido por agar al 2% con agregado de 1% de glucosa, 0,50% de extracto de levadura, 2% de prensado de tomates y vitamina B-12 de una preparación de hígado con aproximadamente 0,01 microgramos por ml de solución.

### 3) El medio de cultivo:

Es un medio básico que contiene ácidos aminados, vitaminas y sales minerales.

Snell, Skeggs y Capps, prepararon medios con caseína hidrolizada(1) por ácidos, como fuente de ácidos aminados con lo que se evita la dificultad de incorporar los ácidos aminados por separado.

Davis y Mingioli, usan para la cepa 113-3 de la *Escherichia coli* un medio básico constituido por fosfato mono y dipotásico, citrato de sodio, sulfatos de magnesio y de amonio, asparagina, ácido glutámico, glicina, histidina, prolina, triptofano, y tioglicocolato de sodio.

Hoffman, observó el efecto estimulante de las sustancias reductoras como el ácido ascórbico en la concentración de 0,5%, sobre el crecimiento del germen test y además protege la vitamina de la destrucción durante la esterilización. Este mismo efecto lo ejerce el tioglicocolato de sodio en el medio de Davis y Mingioli para la medición de la vitamina B-12 usando la cepa 113-3 de la *Escherichia coli*.

#### (1) Caseína hidrolizada libre de vitaminas

Preparación: Hidrolizar 200 gr de caseína libre de vitaminas, con 1.000 ml de HCl al 20% por ebullición a reflujo durante 8 horas. Destilar al vacío hasta concentración siruposa, adicionar 750 ml de agua destilada, y repetir la destilación. Disolver el residuo en agua destilada, ajustar la solución a pH 3 con hidróxido de sodio y diluir a 2 litros. Agitar la solución con 40 gr de "Norit A" a 50-60°C durante 1 hora y filtrar. Ajustar el filtrado a pH 8 con hidróxido de sodio y completar nuevamente a 2 litros. Conservar en solución bajo tolueno.



4) Preparación del material a medir:

Con el material cuya medición se desea efectuar, se preparan diluciones en las concentraciones siguientes: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000.

Dilución 1:10

Se mide en un tubo de ensayos 4,5 ml de agua destilada y se agrega 0,5 ml de la solución del material a medir. Se agita bien.

Dilución 1:100

A 0,5 ml de la dilución 1:10 se agrega 4,5 ml de agua destilada y se agita bien.

Dilución 1:1.000

A 0,5 ml de la dilución 1:100 se agrega 4,5 ml de agua destilada y se agita bien.

Dilución 1:10.000

A 0,5 ml de la dilución 1:1.000 se agrega 4,5 ml de agua destilada y se agita bien.

Dilución 1:100.000

A 0,5 ml de la dilución 1:10.000 se agrega 4,5 ml de agua destilada y se agita bien.

Con estas diluciones se prepara la escala de ensayo como se detalla a continuación:

| Tubos            | 1 | 2   | 3   | 4 | 5   | 6   | 7 | 8   | 9   |
|------------------|---|-----|-----|---|-----|-----|---|-----|-----|
| Dil. 1:100       | 1 | 0,5 | 0,2 |   |     |     |   |     |     |
| Dil. 1:1.000     |   |     |     | 1 | 0,5 | 0,2 |   |     |     |
| Dil 1:10.000     |   |     |     |   |     |     | 1 | 0,5 | 0,2 |
| Agua destilada   | 1 | 1,5 | 1,8 | 1 | 1,5 | 1,8 | 1 | 1,5 | 1,8 |
| Medio de cultivo | 2 | 2   | 2   | 2 | 2   | 2   | 2 | 2   | 2   |

Se esteriliza calentando 5 minutos a vapor fluente y 40 minutos a  $\frac{3}{4}$  de atmósfera.

Junto con la escala de ensayo se esteriliza la escala de comparación constituida por:

| Tubos            | 1 | 2   | 3   | 4 | 5 | 6   | 7   | 8   | 9   | T |
|------------------|---|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|---|
| Sol. tipo Nº1    | 1 | 0,5 | 0,2 |   |   |     |     |     |     |   |
| Sol. tipo Nº2    |   |     |     | 1 | 1 | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,2 |   |
| Agua destilada   | 1 | 1,5 | 1,8 | 1 | 1 | 1,5 | 1,5 | 1,8 | 1,8 | 2 |
| Medio de cultivo | 2 | 2   | 2   | 2 | 2 | 2   | 2   | 2   | 2   | 2 |

Cada ml de la solución tipo Nº1 corresponde a 0,1 milimicrogramo de vitamina B<sub>12</sub> cristalizada.

Cada ml de la solución tipo Nº2 corresponde a 0,01 milimicrogramo de vitamina B<sub>12</sub> cristalizada.

Estas soluciones deben ser preparadas extemporaneamente para cada ensayo.

5) La siembra:

Esterilizadas las escalas de ensayo y comparación se procede a sembrarlas agregando a cada tubo 0,0001 cc de un cultivo de 24 horas de *Lactobacillus leichmannii*.

Se incuba a 36°C durante 48 horas y se hace la lectura.

6) La lectura:

Se hace la lectura de la turbidez ó de la acidez. En los dos casos se emplea como referencia el tubo control que contiene 1 unidad de vitamina B<sub>12</sub> cristalizada.

1 <sup>12</sup>unidad de vitamina B<sub>12</sub> cristalizada es la mínima cantidad capaz de permitir el desarrollo del *Lactobacillus casei* ó *leichmannii*, en un medio de cultivo exento de vitamina B<sub>12</sub> y es igual a 0.000013 microgramos por centímetro cúbico de medio de cultivo.

d) Métodos de producción:

Estando la vitamina B-12 distribuida en la naturaleza en productos de origen vegetal y animal y originándose también en las fermentaciones de microorganismos, debemos distinguir dos fuentes de extracción:

- 1) Por extracción de fuentes naturales
- 2) Por fermentación

1) Por extracción de fuentes naturales:

Lester Smith y Parker<sup>49</sup>, parten de extracto de hígado de buey que luego de desproteínizado es adsorbido por carbón y eluido por etanol al 65% en caliente. Se procede luego a la purificación por cromatografía en columnas de silicato usando como solvente el n-butanol a 2/3 de saturación en agua ó en fenol. Las columnas revelan zonas de color amarillo pardo y rosado. La zona rosada que es la dotada de actividad antianémica se

somete a un proceso de purificación con sulfato de amonio  $11/3$  ó  $2/3$  de saturación y nueva cromatografía sobre almidón de donde se extrae por acetona, solvente en el cual cristaliza en agujas rojas.

Borsook y Deasy<sup>60</sup>, obtienen concentrados de vitamina B-12 partiendo de hígado homogeneizado que someten a ebullición a pH 5 para coagular las proteínas. El filtrado se cromatografía sobre columnas de almidón usando como solvente una mezcla de 1 p. HCl N/10, 2 p. de n-propanol y 1 p. de n-butanol, dando las primeras fracciones del eluyente color rojo parduzco. El comportamiento y el color de esta fracción sugirió a estos autores una posible relación con la vitamina B-12, que fue demostrado como sigue:

0,5 ml de solución inyectable de hígado U.S.P. fueron secados en corriente de aire a la temperatura ambiente. Al residuo se agregó 0,1 ml de HCl N/1 y 0,5 ml de una mezcla formada por HCl N/10, n-propanol y n-butanol en las proporciones de 1:2:1. La solución fue cromatografiada sobre 25 gr de almidón en columnas de 10 mm x 300 mm con la mezcla 1:2:1 como solvente. Los primeros 4,2 ml eluidos fueron incoloros; la segunda fracción de 1,8 ml fue de color rojo pardo intenso; la tercera fracción de 1,8 ml fue apenas coloreada. El análisis de estas fracciones reveló que el color acompaña la actividad vitamínica B-12, así la primera fracción resultó tener 80 unidades microbiológicas por mg, la segunda 2.000 unidades microbiológicas por mg y la tercera 240 unidades microbiológicas por mg.

Lewis y colaboradores<sup>61</sup>, describen el aislamiento de un material activo en vitamina B-12, presente en las materias fecales de las ratas. Las heces secadas se extraen con agua hirviendo, el extracto resultante se filtra y se evapora a presión reducida hasta consistencia espesa.



Se precipitan las proteínas con etanol. La fracción activa se adsorbe con carbón del cual se eluye con etanol caliente al 65%. El extracto es luego purificado por adsorción sobre alúmina y cromatografiado en columnas de silicatos usando solución acuosa de n-butanol como solvente, obteniéndose un producto cristalino que tiene la propiedad de acelerar el crecimiento del *Lactobacillus leichmannii* de manera comparable a la vitamina B<sub>12</sub> cristalizada.

## 2) Por fermentación:

Rickes y colaboradores<sup>61</sup>, informaron el aislamiento de vitamina B<sub>12</sub> cristalizada a partir de los caldos de cultivo del *Streptomyces griseus*.

Otros microorganismos como el *Mycobacterium smegmatis*, *Lactobacillus arabinosus*, *Bacillus subtilis* y algunas especies de *Streptomyces* como el *S. roseochromogenus*, *S. antibioticus* etc. sintetizan esta vitamina que promueve al crecimiento del *Lactobacillus leichmannii*.

El medio de síntesis microbiológica de vitamina B<sub>12</sub> usado por Rickes y colaboradores<sup>61</sup>, está compuesto: por caseína hidrolizada por enzima 1%, extracto de carne 0,3% y agua destilada hasta volumen.

El medio se ajusta a pH 6,8-7 con hidróxido de sodio y se fracciona en cantidades alícuotas de 40 ml en Erlenmeyer de 250 ml esterilizándose a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Luego de 48 horas se procede a sembrar el *Streptomyces griseus* en suspensión acuosa.

Se incuba a 28°C durante 5 días con una agitación de 220 revoluciones por minuto procediéndose entonces a ajustar el pH del caldo de fermentación a 7 y a di-

luir con agua destilada para que contenga un equivalente de 0,5 unidades de vitamina B<sub>12</sub> por ml.

Mündel y Lugones<sup>4</sup>, describen un método de producción de vitamina B<sub>12</sub> por fermentación con *Bacillus brevis*, usando técnicas de fermentación en superficie ó en profundidad.

En el primer caso el medio de cultivo empleado está constituido por: 1,5% de peptona, 0,10% de fosfato monopotásico, 0,02% de fosfato bipo-  
tásico, 4% de glucosa, 0,10% de cloruro de calcio, 0,0003% de sulfato de hierro, 0,10% de sulfato de magnesio, 0,001% de sulfato de cinc, 0,002% de sulfato de cobalto, 0,003% de sulfato de manganeso y agua destilada c.s.p. 100 ml.

Para fermentación en profundidad se usó un medio similar al empleado para la fermentación en superficie con algunas variables en su composición, así, lleva ácido glutámico en lugar de peptona como fuente de nitrógeno, pues permite obtener simultaneamente tirotricina, lo cual no se consigue usando los medios peptonados. Lleva además cloruro de sodio en vez de cloruro de calcio.

La técnica de fermentación en superficie es la de mayor rendimiento y se efectúa sembrando un cultivo de *Bacillus brevis* de 24 horas en el medio ya descrito, repartido en botellas y esterilizado a 120°C durante 1 hora.

El desarrollo bacteriano se inicia a las 24 horas de la siembra y llega al máximo a los 10-12 días. Se procede entonces a la separación por centrifugación, de un precipitado que lleva la tirotricina y de un líquido de donde se extrae la vitamina B<sub>12</sub> por adsorción con carbón activado.

El adsorbato se eluye con solventes adecuados a distintas concentraciones y pH. El producto de elución se concentra y luego se liofiliza obteniéndose un polvo rojo muy higroscópico cuya purificación se continua.

2) Producción de vitamina B-12 por fermentación con Bacillus brevis

Una vitamina del grupo B-12, puede ser producida por fermentación empleando el *Bacillus brevis* cepa A.T.C.C. 10.068, como lo demostraron O.Mündel y Z.Lugones.<sup>14</sup>

Los sistemas de fermentación en superficie y en profundidad son aptos para la producción de ese factor.

Para la técnica de fermentación en superficie el medio de cultivo siguiente es el de mayores rendimientos:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Peptona.....           | 15 grs. |
| Fosfato monopotásico.. | 1 "     |
| Fosfato bipotásico.... | 0,2     |
| Glucosa.....           | 40 "    |
| Cloruro de calcio..... | 1 "     |
| Sulfato de hierro....  | 0,003   |

|                           |      |       |
|---------------------------|------|-------|
| Sulfato de manganeso..... | 0,03 | grs.  |
| Sulfato de magnesio.....  | 1    | "     |
| Sulfato de cinc.....      | 0,01 | "     |
| Sulfato de cobalto.....   | 0,02 | "     |
| Agua destilada.....c.s.p. | 1    | litro |

El medio de cultivo fraccionado en botellas se esteriliza a 120°C durante 1 hora. Se siembra el *Bacillus brevis* cepa A.T.C.C. 10.068, observándose a las 24 horas de la siembra, desarrollo microbiano; a las 48 horas se forma una película que cubre toda la superficie y a los 5 días esa película es suficientemente gruesa y forma arrugas. El máximo rendimiento se observa a los 10-12 días.

Para la técnica de fermentación en profundidad los mejores rendimientos se lograron con el siguiente medio de cultivo:

|                           |       |       |
|---------------------------|-------|-------|
| Fosfato monopotásico..... | 1     | gr    |
| Fosfato bipotásico.....   | 0,2   | "     |
| Glucosa.....              | 20    | "     |
| Acido glutámico.....      | 4     | "     |
| Sulfato ferroso.....      | 0,003 |       |
| Sulfato de magnesio.....  | 1     | "     |
| Sulfato de cinc.....      | 0,01  | "     |
| Sulfato de cobalto.....   | 0,02  | "     |
| Sulfato de manganeso..... | 0,003 |       |
| Cloruro de sodio.....     | 0,05  | "     |
| Agua destilada c.s.p..... | 1     | litro |

Este medio se ajustó a pH 7,5 y se esterilizó a 120°C durante 1 hora.

Los equipos de fermentación usados fueron balones de 5 litros de capacidad con 3 bocas, provistos de agitación mecánica, entrada y salida de aire.

En escala mayor, la fermentación se realiza en tanques de acero vertical, fijo, de 200 litros de capacidad, provistos de accesorios para el control de la presión, temperatura de esterilización y temperatura de fermentación.

El medio de cultivo se vierte en los balones ó tanques hasta llenar la mitad de su capacidad y se esteriliza a 120°C durante 1 hora.

Se siembra con 10 cc. de un cultivo de *Bacillus brevis* de 24 horas, se mantiene el medio a 37°C y se hace pasar aire burbujeando a través de la masa líquida, manteniendo el líquido en movimiento por medio de un agitador mecánico.

Para la extracción de la vitamina B-12, el caldo crudo de fermentación en superficie, cuyo título en vitamina B-12 es aproximadamente 5.000 unidades, se lleva a pH 4,5 y se centrifuga. Se obtiene un precipitado y una solución. El precipitado corresponde a la tirotricina y la solución lleva vitamina B-12 con un título aproximado de 5.000 unidades. *por ml.*

De la solución se adsorbe la vitamina B-12 con 5% de carbón activado, se agita durante 12 horas y se centrifuga. Del adsorbato en carbón se eluye la vitamina B-12 con distintos solventes, obteniendo los mejores resultados con el fenol líquido y solución alcohólica de fenol al 50%.

La solución fenol-alcohólica de elución se concentra por precipitación con éter ó con acetona. Se elimina el exceso de solvente y se liofiliza a una presión de 20 - 30 micrones, obteniéndose un polvo rojizo muy higroscópico cuya purificación se continua.



P A R T E    E X P E R I M E N T A L

1) Valoración por el método microbiológico:

La valoración por el método microbiológico comprende las siguientes etapas: “

- a) Selección de la cepa
- b) Puesta a punto de la técnica de medición
- c) Medio de cultivo
- d) Lectura de los resultados
- e) Interpretación

a) Selección de la cepa:

El *Lactobacillus leichmannii*, cepa A.T.C.C.4797 es la adoptada por la mayor parte de los investigadores por ser la que da mejores resultados.

Esta cepa se mantiene en un medio constituido por agar al 2%, glucosa 1%, extracto de levadura 0,5%, prensado de tomates 2% y vitamina B-12 de una preparación de hígado con aproximadamente 100 unidades por cc. de medio.

Con el fin de lavar los gérmenes testigos, los autores americanos, transplantan el cultivo en tubos estériles que contienen 10 ml de medio de cultivo y se incuban a 30-37°C durante 16-24 horas.

El cultivo obtenido se centrifuga con técnica aséptica, se decanta el líquido, se suspende el residuo constituido por células en 10 ml de medio de cultivo estéril, se centrifuga y se decanta, repitiéndose esta operación 3 veces.

El residuo de la última centrifugación se suspende en 10 ml de medio de cultivo y se mezcla.

Para O. Mündel y Z. Lugones<sup>4</sup>, este lavado de los gérmenes antes de sembrarlos puede ser suprimido pues la pequeñísima cantidad de vitamina que puede ser llevada por los reactivos usados junto con los gérmenes no puede influir sobre el desarrollo de éste, además dicho lavado incluye un peligro de infección del germen testigo.

Como estos autores han estudiado el lavado de los gérmenes para probar si tiene en la práctica alguna influencia sobre el crecimiento del "control" y han llegado a la conclusión de que aún lavando hasta 5 veces no se ha observado ninguna ventaja apreciable, hemos empleado el germen testigo sin lavado.

b) Puesta a punto de la técnica de medición

Comprende:

- 1) Preparación del cultivo stock
- 2) Preparación del inoculum
- 3) Preparación de las muestras
- 4) Preparación de la escala de comparación
- 5) Preparación de la escala de ensayo
- 6) Esterilización
- 7) Inoculación e incubación

1) Preparación del cultivo stock

El *Lactobacillus leichmannii* (A.T.C.C. 4797) se mantiene en agar al 2% con agregado de glucosa 1%, extracto de levadura 0,5%, prensado de tomates 2% y vitamina B-12 de una preparación de hígado con aproximadamente 0,01 microgramo por ml de solución.

2) Preparación del inoculum

Se siembra el germen testigo *Lactobacillus leichmannii* (A.T.C.C. 4797) en un tubo de ensayo que contiene 2 ml de medio de cultivo y 2 ml de agua destilada. Se incuba a 37°C durante 24 horas, efectuándose entonces las siguientes diluciones:

Dilución A: Se pasan 0,2 ml de la solución anterior a un tubo de ensayo que contiene 5 ml de agua destilada y se mezcla muy bien.

Dilución B: Medir 0,2 ml de la dilución A y pasarlo a un tubo de ensayo que contiene 5 ml de agua destilada. Mezclar bien. Esta dilución es la que se usará en la siembra.

### 3) Preparación de las muestras

Las muestras, representadas por los líquidos de solución del adsorbato, son sometidas a las diluciones que a continuación se detalla:

#### Solución Nº1 : Dilución 1:10

En un tubo de ensayo se coloca 4,5 ml de agua destilada y se agrega 0,5 ml de la muestra cuya medición microbiológica se quiere efectuar. Se mezcla muy bien.

#### Solución Nº2 : Dilución 1:100

Solución Nº1 ..... 0,5 ml

Agua destilada ..... 4,5 "

Mezclar bien

#### Solución Nº3 : Dilución 1:1.000

Solución Nº2 ..... 0,5 ml

Agua destilada ..... 4,5 "

Mezclar bien

#### Solución Nº4 : Dilución 1:10.000

Solución Nº3 ..... 0,5 ml

Agua destilada ..... 4,5 "

Mezclar bien.



#### 4) Preparación de la escala de comparación

Para la preparación de la escala de comparación se debe disponer de una solución patrón concentrada de vitamina B-12 y de una solución patrón diluida de vitamina B-12.

##### Solución patrón concentrada de vitamina B-12

Una cantidad exactamente pesada de vitamina B-12 cristalizada se disuelve en alcohol al 25%, de manera que cada ml. de la solución así preparada contenga 1 milimicrogramo de vitamina B-12 cristalizada.

Se conserva en lugar fresco y se emplea dentro de los 60 días.

##### Solución patrón diluida de vitamina B-12

###### Solución tipo Nº1

10 ml. de la solución patrón concentrada de vitamina B-12 se diluyen con agua destilada a 100 ml. Cada ml. corresponde a 0,1 milimicrogramo de vitamina B-12 cristalizada.

Esta solución debe ser preparada extemporaneamente para cada ensayo.

###### Solución tipo Nº2

10 ml. de la solución tipo Nº1 de vitamina B-12 cristalizada se diluyen con agua destilada a 100 ml. ; cada ml. corresponde a 0,01 milimicrogramo de vitamina B-12 cristalizada.

Como la anterior debe ser preparada en el momento de uso.

Para preparar la escala de comparación se dispone una serie de tubos (20 x 150 mm) en la siguiente forma:

| Tubo             | 1 | 2   | 3   | 4 | 5 | 6   | 7   | 8   | 9   | T |
|------------------|---|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|---|
| Sol.tipo Nº1     | 1 | 0,5 | 0,2 | - | - | -   | -   | -   | -   | - |
| Sol.tipo Nº2     | - | -   | -   | 1 | 1 | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | - |
| Agua destilada   | 1 | 1,5 | 1,8 | 1 | 1 | 1,5 | 1,5 | 1,8 | 1,8 | 2 |
| Medio de cultivo | 2 | 2   | 2   | 2 | 2 | 2   | 2   | 2   | 2   | 2 |

5) Preparación de la escala de ensayo

En el cuadro que va a continuación se consignan las cantidades que debe medirse de las diluciones, medio de cultivo y agua destilada para la preparación de la escala de ensayo.

| Tubo              | 1 | 2   | 3   | 4 | 5   | 6   | 7 | 8   | 9   |
|-------------------|---|-----|-----|---|-----|-----|---|-----|-----|
| Dilución 1:100    | 1 | 0,5 | 0,2 | - | -   | -   | - | -   | -   |
| Dilución 1:1.000  | - | -   | -   | 1 | 0,5 | 0,2 | - | -   | -   |
| Dilución 1:10.000 | - | -   | -   | - | -   | -   | 1 | 0,5 | 0,2 |
| Agua destilada    | 1 | 1,5 | 1,8 | 1 | 1,5 | 1,8 | 1 | 1,5 | 1,8 |
| Medio de cultivo  | 2 | 2   | 2   | 2 | 2   | 2   | 2 | 2   | 2   |

a) Mezclar el contenido de cada tubo por vigorosa rotación en la palma de la mano.

b) Tapar los tubos por algodón recubierto con gasa.

## 6) Esterilización

La esterilización se realiza a vapor fluente durante 5 minutos y luego a  $\frac{2}{3}$  de atmósfera durante 40 minutos. El control de la esterilización debe ser estricto tomando todas las precauciones posibles para mantener la uniformidad de la temperatura durante todo el proceso. En efecto, tal como lo indican O. Mündel y Z. Lugones, la forma de esterilizar el medio es de importancia fundamental, porque durante la operación se pueden formar sustancias que afectan la sensibilidad del germen. Si se efectúa una rápida esterilización por ejemplo a vapor corriente 15 minutos, el desarrollo del germen test es muy débil y el material para investigar manifiesta hasta 10 veces menos actividad que cuando se lo ha esterilizado a  $\frac{1}{2}$  atmósfera; lo mismo ocurre al agregar glucosa asepticamente. Por otra parte, la esterilización prolongada ó repetida del medio, no permite el desarrollo del germen debido posiblemente a la destrucción de sustancias termolábiles ó a la variación de la concentración de gases disueltos en el mismo ( $O_2$  y  $CO_2$ ), aunque en algunos casos puede producirse resultados contradictorios. Esta diferente sensibilidad del germen se debe a factores físico-químicos en donde juega un papel muy importante la glucosa, pues es necesario que sufra un cierto grado de descomposición para dar lugar a la formación de algunas sustancias reductoras cuya presencia en el medio esterilizado estimula la asimilación de la vitamina B-12. En la práctica se guía en general por el grado de caramelización del azúcar y según indican los autores, se logran óptimos resultados al esterilizar el medio calentándolo 5 minutos a vapor fluente y acto seguido 40 minutos a  $\frac{2}{3}$  de atmósfera.

## 7) Inoculación e incubación

a) Enfriar todos los tubos a la temperatura ambiente.

Es fundamental que todos los tubos esten a la misma temperatura, por lo que se aconseja mantenerlos al ambiente hasta que la temperatura descienda a los límites indicados.

Esta precaución es especialmente necesaria cuando se efectuan medidas turbidimétricas, en donde se mide más bien el ritmo de crecimiento que la intensidad del mismo.

b) Inocular asepticamente cada tubo con 0,1 ml de la Dilución B del germen (visto en el capítulo de la preparación del Inoculum)

c) Incubar durante 48 horas a 37°C, temperatura que se mantendrá constante. El tiempo de incubación puede ser ampliado hasta 96 horas ó acortado en 24 horas sin afectar sensiblemente los resultados.

c) Medio de cultivo

Como medio de cultivo hemos utilizado el medio básico, indicado por Capps, que contiene como fuente de aminoácidos, caseína hidrolizada que evita la dificultad de agregar los aminoácidos por separado.

Su fórmula es la siguiente:

|   |         |
|---|---------|
| 1- Caseína hidrolizada<br>libre de vitaminas..... | 12 g    |
| 2- Dextrosa.....                                  | 40 "    |
| 3- Acetato de sodio.....                          | 20 "    |
| 4- Cistina.....                                   | 200 mg  |
| 5- Triptofano.....                                | 200 "   |
| 6- Adenina.....                                   | 10 "    |
| 7- Guanina.....                                   | 10 "    |
| 8- Uracilo.....                                   | 10 "    |
| 9- Xantina.....                                   | 1 "     |
| 10- Tiamina clorhidrato.....                      | 2 "     |
| 11- Riboflavina.....                              | 2 "     |
| 12- Niacina.....                                  | 2 "     |
| 13- Piridoxina clorhidrato.....                   | 4 "     |
| 14- d-Pantotenato de calcio.....                  | 0,2 mg  |
| 15- Acido fólico.....                             | 0,1 "   |
| 16- Biotina.....                                  | 0,01"   |
| 17- Acido p-amino benzoico.....                   | 0,2 "   |
| 18- Tween 80.....                                 | 0,25 ml |
| 19- Fosfato dipotásico.....                       | 100 mg  |
| 20- Fosfato monopotásico.....                     | 100 "   |



|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| 21- Sulfato de magnesio.....  | 400 mg   |
| 22- Cloruro de sodio.....     | 20 "     |
| 23- Sulfato ferroso.....      | 20 "     |
| 24- Sulfato de manganeso..... | 20 "     |
| 25- Agua destilada.....       | 1.000 ml |

### Preparación

Disolver la caseína hidrolizada libre de vitaminas, la dextrosa y el ácido ascórbico en aproximadamente 500 ml de agua destilada; agregar los demás componentes mezclando las soluciones que se han detallado en la proporción indicada. Adicionar el Tween 80, ajustar a pH 6,8-6,9 por adición de Na OH 0,1 N y completar a 1.000 ml con agua destilada.

d) Lectura de los resultados

- 1) Agitar los tubos para suspender los gérmenes, evitando la formación de burbujas de aire.
- 2) Se mide la turbidez de los tubos que constituyen la escala de ensayo por comparación con la que produce la escala de comparación.  
Como referencia se toma el tubo de igual turbidez que el tubo control que contiene 1 unidad de vitamina B-12 cristalizada.

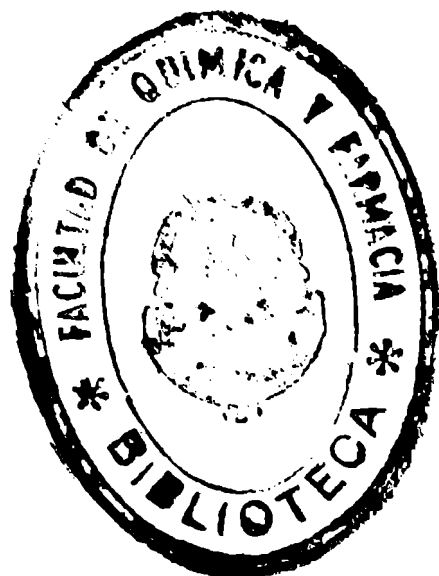
Ejemplos de algunas determinacionesEscala de comparación

| Tubo               | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10   |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Nº cm <sup>3</sup> | 1,0 | 0,5 | 0,2 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0    |
| Lectura            | 1½  | 1½  | 1¼  | 1   | 1   | ¾   | ¾   | ½   | ½   | 1/10 |

Escala de la muestra ensayada

| Tubo               | 1   | 2   | 3   | 4     | 5     | 6     | 7      | 8      | 9      |
|--------------------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Unidades           | 100 | 200 | 500 | 1.000 | 2.000 | 5.000 | 10.000 | 20.000 | 50.000 |
| Nº cm <sup>3</sup> | 1,0 | 0,5 | 0,2 | 1,0   | 0,5   | 0,2   | 1,0    | 0,5    | 0,2    |
| Lectura            | 1½  | 1½  | 1½  | 1¼    | 1 1/5 | 1     | ¾      | ½      | ¼      |

Contiene 5.000 unidades de vitamina B-12



3) Extracción de la vitamina B-12 de los caldos crudos de cultivo

a) Adsorción del material con carbón:

Para la extracción de la vitamina B-12 de los caldos crudos de cultivo, se utilizó como adsorbente el carbón activado habiendo previamente ensayado la alúmina, el ácido benzoico en solución alcohólica, el supercel y el terrafil, que dieron resultados menos satisfactorios. La concentración de carbón aconsejada se adoptó de acuerdo con los siguientes resultados obtenidos titulando el líquido filtrado después de agitar durante 2 horas con la concentración de carbón indicada.

Título en vitamina B-12 del caldo crudo de cultivo

Se determina el título en vitamina B-12 del caldo crudo de cultivo antes y después de centrifugarlo, obteniéndose los siguientes resultados:

| Volumen caldo | u.L.L.D./cc. caldo<br>antes de centrifugar | u.L.L.D./cc. caldo<br>después de centrifugar |
|---------------|--|--|
| 1.000         | 5.000                                      | 5.000  |

Cuadro de los ensayos efectuados para determinar la mínima concentración de carbón activado como adsorbente

| Adsorbente | Volumen caldo | u.L.L.D./cc caldo<br>antes de agregar<br>carbón | u.L.L.D./cc cal-<br>do después de<br>agregar carbón |
|------------|---------------|---|---|
| Carbón 1%  | 1.000 cc.     | 5.000   | 600   |
| " 2%       | "             | "   | 500   |
| " 3%       | "             | "   | 200   |
| " 4%       | "             | "   | 150   |
| " 5%       | "             | "   | 100   |
| " 6%       | "             | "   | 90  |
| " 7%       | "             | "   | 80  |
| " 8%       | "             | "   | 80  |
| " 9%       | "             | "   | 50  |
| " 10%      | "             | "   | 50  |

Preparación del adsorbato stock

Se preparó un adsorbato stock usando una concentración mínima de 4% de carbón activado. Para ello a 100 litros de caldo crudo de cultivo centrifugado, se le agregó 4 kilos de carbón activado, se mezcló bien, se dejó decantar y se filtró. El precipitado se lavó con solución alcohólica, se secó en cámara desecadora con corriente de aire a la temperatura de 40°C aproximadamente y se pesó luego.

El adsorbato obtenido pesó Kgs. 4,255

Con este adsorbato se efectuaron los ensayos de elución de la vitamina B-12 usando distintos solventes.



b) Elución de la vitamina B-12 de los adsorbato1) Estudio de los disolventes

Varios disolventes fueron ensayados para la elución de los adsorbato en carbón: en algunos se varió el pH de elución con el objeto de aumentar su utilidad.

Los ensayos se realizaron a la temperatura ambiente, agitando el adsorbato con el eluyente durante 30 minutos, se dejó decantar y se filtró.

a) Etanol

1) Se ensayo la elución del adsorbato de carbón con alcohol etílico en las concentraciones del 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% y 96% con los siguientes resultados:

| Disolvente | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc solución | Volumen filtrado | u.L.L.D. total |
|------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|----------------|
| Etanol 30% | 100 grs.            | 200 cc.            | 150                  | 100 cc.          | 15.000         |
| " 40%      | "                   | "                  | 1.000                | "                | 100.000        |
| " 60%      | "                   | "                  | 2.000                | "                | 200.000        |
| " 70%      | "                   | "                  | 3.500                | "                | 350.000        |
| " 80%      | "                   | "                  | 5.000                | "                | 500.000        |
| " 90%      | "                   | "                  | 10.000               | "                | 1.000.000      |
| " 96%      | "                   | "                  | 10.000               | "                | 1.000.000      |

Etanol y lavados consecutivos

2) Se eluyó el adsorbato de carbón con alcohol etílico del 70% y 80% y a fin de determinar la cantidad de vitamina B-12 que aún retiene el adsorbato, se lo lavó por 3 veces consecutivas con cantidades dobles de disolvente.

Los resultados obtenidos fueron:

| Disolvente | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc solución | Volumen filtrado | u.L.L.D. total |
|------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|----------------|
| Etanol 70% | 100 grs.            | 200cc.             | 3.500                | 100 cc.          | 350.000        |
| 1er.lavado |                     | 400                | 500                  | 250              | 125.000        |
| 2º "       |                     | 800                | 200                  | 500              | 100.000        |
| 3er. "     |                     | 1.600              | 100                  | 850              | 85.000         |
| Etanol 80% | 100 grs.            | 200                | 5.000                | 100              | 500.000        |
| 1er.lavado |                     | 400                | 1.000                | 275              | 275.000        |
| 2º "       |                     | 800                | 500                  | 500              | 250.000        |
| 3er. "     |                     | 1.600              | 100                  | 900              | 90.000         |

3) Etanol en medio amoniaco

En los ensayos de elución del adsorbato de carbón con alcohol etílico en las concentraciones de 70%, 80%, 90% y 96%, se estudió la influencia del agregado de una solución de amoníaco al 1%, 2%, 5% y 10% respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

| Disolvente                 | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D/cc. solución |
|----------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| Etanol 70%                 | 100 grs.            | 200 cc.            | 3.500                |
| " " con NH <sub>3</sub> 1% | "                   | "                  | 2.000                |
| " " " 2%                   | "                   | "                  | 1.000                |
| " " " 5%                   | "                   | "                  | 500                  |
| " " " 10%                  | "                   | "                  | 200                  |
| Etanol 80%                 | "                   | "                  | 5.000                |
| " " con 1% NH <sub>3</sub> | "                   | "                  | 3.500                |
| " " " 2%                   | "                   | "                  | 2.000                |
| " " " 5%                   | "                   | "                  | 1.000                |
| " " " 10%                  | "                   | "                  | 500                  |
| Etanol 90%                 | "                   | "                  | 10.000               |
| " " con 1% NH <sub>3</sub> | "                   | "                  | 4.000                |
| " " " 2%                   | "                   | "                  | 2.000                |
| " " " 5%                   | "                   | "                  | 1.000                |
| " " " 10%                  | "                   | "                  | 400                  |
| Etanol 96%                 | "                   | "                  | 10.000               |
| " " con 1% NH <sub>3</sub> | "                   | "                  | 5.000                |
| " " " 2%                   | "                   | "                  | 3.500                |
| " " " 5%                   | "                   | "                  | 1.000                |
| " " " 10%                  | "                   | "                  | 500                  |

4) Influencia de la variación del pH

Para estudiar la influencia de la variación del pH en la extracción de vitamina B<sub>12</sub>, se procedió de la siguiente manera:

Muestras de 100 grs del adsorbato de carbón se eluyeron con 200 cc de alcohol etílico de 70°, 80°, 90° y 96°. Los líquidos de elución acusaron un pH: 5,1

El siguiente cuadro indica la variación del pH inicial de 5,1

Variación del pH inicial

| Disolvente                                | Adsorbato en carbón | volumen disolvente | pH líquido eluido |
|---|---------------------|--------------------|-------------------|
| Etil de 70°, 80°, 90° ó 96° + 1cc HCl 10% | 100 grs.            | 200 cc.            | pH:3              |
| " " " " " + 0,5 " "                       | "                   | "                  | pH:4              |
| " " " " " + 0,4 NaOH"                     | "                   | "                  | pH:6              |
| " " " " " + 1 " "                         | "                   | "                  | pH:7              |
| " " " " " + 1,3 " "                       | "                   | "                  | pH:8              |

Conseguida la variación del pH del eluyente se procedió a la medición microbiológica de las unidades de vitamina B<sub>12</sub> extraída. El resultado se comprueba en el cuadro siguiente:

Influencia de la variación del pH en la extracción de vitamina B  
12

| Disolvente        | Adsorbato<br>en carbón | Volumen<br>disolvente | u.L.L.D./cc.<br>de solución eluida |
|-------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Etanol 70º a pH 3 | 200 grs.               | 400 cc.               | 1.500                              |
| " " " " 4         | "                      | "                     | 2.000                              |
| " " " " 5,1       | "                      | "                     | 3.500                              |
| " " " " 6         | "                      | "                     | 3.500                              |
| " " " " 7         | "                      | "                     | 3.000                              |
| " " " " 8         | "                      | "                     | 2.000                              |
| " 80º " " 3       | "                      | "                     | 2.000                              |
| " " " " 4         | "                      | "                     | 3.500                              |
| " " " " 5,1       | "                      | "                     | 5.000                              |
| " " " " 6         | "                      | "                     | 5.000                              |
| " " " " 7         | "                      | "                     | 4.000                              |
| " " " " 8         | "                      | "                     | 3.000                              |
| " 90º " " 3       | "                      | "                     | 4.500                              |
| " " " " 4         | "                      | "                     | 5.000                              |
| " " " " 5,1       | "                      | "                     | 10.000                             |
| " " " " 6         | "                      | "                     | 10.000                             |
| " " " " 7         | "                      | "                     | 9.000                              |
| " " " " 8         | "                      | "                     | 5.000                              |
| " 96º " " 3       | "                      | "                     | 5.000                              |
| " " " " 4         | "                      | "                     | 5.000                              |
| " " " " 5,1       | "                      | "                     | 10.000                             |
| " " " " 6         | "                      | "                     | 10.000                             |
| " " " " 7         | "                      | "                     | 9.000                              |
| " " " " 8         | "                      | "                     | 4.000                              |

b) Acetona

El adsorbato de carbón fue eluido por una solución acuosa de acetona al 30%, 50%, 70%, 90% y acetona pura.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

| Disolvente     | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc solución | Volumen filtrado | u.L.L.D totales |
|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| Acetona al 30% | 100 grs.            | 200 cc.            | 50                   | 100 cc.          | 5.000           |
| " " 50%        | "                   | "                  | 2.000                | "                | 200.000         |
| " " 70%        | "                   | "                  | 3.500                | "                | 350.000         |
| " " 90%        | "                   | "                  | 5.000                | "                | 500.000         |
| " pura         | "                   | "                  | 5.000                | "                | 500.000         |

Elución con acetona pura y triple lavado del adsorbato

Hecha la elución del adsorbato de carbón con acetona pura, se practican 3 lavados consecutivos del mismo con cantidades dobles de disolvente para determinar las unidades de vitamina B-12 que aún retiene.

Se obtienen los resultados siguientes:

| Disolvente    | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc. solución |
|---------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Acetona pura  | 100 grs.            | 200 cc.            | 5.000                 |
| " 1er. lavado |                     | 400                | 500                   |
| " 2º "        |                     | 800                | 200                   |
| " 3er. "      |                     | 1.600              | 100                   |



c) Butanold) Isopropanol

La elución del adsorbato de carbón con butanol e isopropanol dio los resultados siguientes:

| Disolvente  | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc. solución | Volumen filtrado | u.L.L.D. totales |
|-------------|---------------------|--------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| Butanol     | 100 grs.            | 200 cc.            | 500                   | 100 cc.          | 50.000           |
| Isopropanol | "                   | "                  | 2.000                 | "                | 200.000          |

e) Metanol

Se ensayó el alcohol metílico en las concentraciones del 40%, 60%, 80% y puro, como eluyente del adsorbato de carbón, obteniéndose los siguientes resultados:

| Disolvente     | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc. solución | Volumen filtrado | u.L.L.D. totales |
|----------------|---------------------|--------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| Metanol al 40% | 200 grs.            | 400 cc.            | 100                   | 300 cc.          | 30.000           |
| " " 60%        | "                   | "                  | 5.000                 | "                | 1.500.000        |
| " " 80%        | "                   | "                  | 2.000                 | "                | 60.000           |
| " puro         | "                   | "                  | 50                    | "                | 1.500            |

f) Dioxano

g) Acetato de butilo

h) Acetato de etilo

ensayada la elución del adsorbato de carbón con dioxano, acetato de butilo y acetato de etilo respectivamente, se obtuvieron los resultados que se indican:

| Disolvente     | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc solución | Volumen filtrado | u.L.L.D. totales |
|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|------------------|
| Dioxano        | 100 grs.            | 200 cc.            | 200                  | 100              | 20.000           |
| Acetato butilo | "                   | "                  | 100                  | "                | 10.000           |
| Acetato etilo  | "                   | "                  | 50                   | "                | 5.000            |

i) Tricresol

El resultado que se obtiene al eluir el adsorbato de carbón con tricresol es el siguiente:

| Disolvente | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc solución | Volumen filtrado | u.L.L. totales |
|------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|----------------|
| Tricresol  | 100 grs.            | 200 cc.            | 15.000               | 50cc.            | 750.000        |

j) Fenol-alcohol:

Se efectua la elución del adsorbato de carbón con solución fenol-alcohol al 50%. Se procede luego a la concentración de la solución alcohólica-fenólica con éter ó acetona de la siguiente manera: la solución fenol-alcohólica de elución se trata por 3 veces su volumen de acetona ó éter, agitando a la temperatura ambiente.

Cuando se precipita por acetona el precipitado es coherente, blando y de color castaño-rojizo. Se lo separa por decantación y filtración y se suspende en agua en la que no es totalmente soluble. Se filtra y el filtrado se lava con poca agua, obteniéndose así una solución color rojo intenso.

En el caso de precipitar por éter se separan dos capas: una acuosa roja y otra etero-alcohólica amarillenta que se separa por decantación.

Resultados de la concentración:

| Fracción                         | Volumen | u.L.L.D./cc. | u.L.L.D. totales |
|----------------------------------|---------|--------------|------------------|
| Sol.fenol-alcohol de elución     | 100 cc. | 12.000       | 1.200.000        |
| Fracción acuo.de ppt.por acetona | 10 "    | 40.000       | 400.000          |
| Sol.fenol-alcohol-acetona        | 285 "   | 100          | 28.500           |
| Fracción ac.de ppt.por éter      | 15 "    | 50.000       | 750.000          |
| Sol.fenol-alcohol-éter           | 250 "   | 100          | 25.000           |

Elución con sol.fenol-alcohol al 50% y lavado del adsorbato

El adsorbato de carbón se eluye con solución de fenol-alcohol al 50% y se filtra por Büchner. Se efectúan 3 lavados consecutivos del adsorbato con cantidades dobles de la solución fenol-alcohólica al 50%, para determinar las unidades de vitamina B-12 que aún retiene el adsorbato.

Los resultados obtenidos son los que siguen:

| Disolvente    | Adsorbato en carbón | Volumen disolvente | u.L.L.D./cc. solución | Volumen filtrado | u.L.L.D. total |
|---------------|---------------------|--------------------|-----------------------|------------------|----------------|
| Fenol-alcohol | 100 grs.            | 200 cc.            | 12.000                | 100 cc.          | 1.200.000      |
| 1er.lavado    |                     | 400 "              | 2.500                 | 275 "            | 687.500        |
| 2º "          |                     | 800 "              | 250                   | 600 "            | 150.000        |
| 3er. "        |                     | 1.600 "            | 50                    | 1.000 "          | 50.000         |

### Resumen

- 1- Se efectua la medición microbiológica de las vitaminas del grupo B<sub>12</sub>, producidas en los caldos fermentados por Bacillus brevis, cepa A.T.C.C.10.068 y en los concentrados obtenidos por adsorción.
- 2- Se prepara un adsorbato "stock" en muestras del cual se efectuan los ensayos de elución de la vitamina B<sub>12</sub> utilizando distintos disolventes que revelan su grado de extracción de este factor.
- 3- La medición de las unidades del factor con propiedades de vitamina B<sub>12</sub> en los líquidos eluidos, se hace por la técnica microbiológica, empleando como germen test el Lactobacillus leichmannii, cepa A.T.C.C.4.797 y el medio de cultivo de Capps. Se describe detalladamente el método empleado.

### Conclusiones

- 1- La centrifugación de los caldos de fermentación para clarificarlos, no modifica su título en vitamina B<sub>12</sub>.
- 2- El citado factor vitamínico es adsorbido por carbón activado determinandose la mínima concentración necesaria de adsorbente, siendo para el tipo de carbón descrito de un 4%.
- 3- Se estudia la influencia de la variación del pH y de la concentración para cada disolvente, estando el máximo en la zona de pH ácido de 5,1 a 6.
- 4- Se destaca que en el ensayo de elución por acetona se obtienen resultados superiores a lo esperado lo que hace pensar en la posibilidad de la extracción de una sustancia con propiedades biológicas similares a la vitamina B<sub>12</sub> en su actividad sobre el Lactobacillus leichmannii, pero no idéntica a esta.
- 5- Teniendo en cuenta las condiciones locales en cuanto a la existencia de solventes, el etanol en la concentración del 90%, resultó conveniente por su poder extractivo, por ser económico y de fácil manipuleo.

*Regina Lechner*

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

- 1 Minot G.R. y Murphy W.P.: J. Am. Med. Ass., 1926, 87, 470
- 2 Cohn E. J. y Minot G.R.: J. Biol. Chem., 1928, 77, 325
- 3 Dakin H.D. y West R.: J. Biol. Chem., 1935, 109, 489
- 4 Subbarow Y. y Jacobsen B.: Jour. Clin. Invest., 1937, 16, 573
- 5 Snell E.E. y Peterson W.H.: J. Bact., 1940, 39, 273
- 6 Hutchings B.L., Behrens N. y Peterson W.H.: J. Biol. Chem., 1941, 144, 621
- 7 Mitchell H.K., Snell E.E. y Williams R.J.: J. Am. Chem. Soc., 1941, 63, 2248
- 8 Pfiffner J.J. y col.: Science, 1943, 97, 404
- 9 Shorb M.: J. Bact., 1947, 53, 669
- 10 Shorb M.: J. Biol. Chem., 1947, 169, 455
- 11 Rickes E.L., Brink M.G., Koniuszy F.R., Wood R.T. y Folkers K.: Science, 1948, 107, 396
- 12 Lester Smith E. y Parker L.: Biochem. J., 1948, 43, Proc. VIII
- 13 Ellis B., Petrow W. y Sneek G.F.: J. Pharm. and Pharmacol., 1949, 1, 60
- 14 Shorb M.: Science, 1948, 107, 397
- 15 Gakenheimer W.C. y Feller B.A.: J. Am. Pharm. Ass. Sc. Ed., 1949, 38, 660
- 16 Ungley C.C.: Brit. Med. J., 1948, 154
- 17 Brink N.G., Wolf D.E., Kaczka E., Rickes E.L., Koniuszy F.R., Wood T.R. y Folkers K.:  
J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2951
- 18 Ellis B., Petrow W. y Sneek G.F.: J. Pharm. and Pharmacol. 1949, 1, 287
- 19 Ellis, B., Petrow W. y Sneek G.F.: J. Pharm. and Pharmacol. 1953, 5, 60
- 20 Lester Smith E.: Biochem. J., 1950, 50, XXXVI
- 21 Lester Smith E.: Biochem J., 1952, 52, 384
- 22 Brink N.G. y Kuehl F.: Science 1950, 112, 354



- 33 Brink N.G., Wolf D.E. y Kaczka E.A.: J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 1854
- 35 Brink N.G. y Folkers K.: J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2951
- 37 Brink N.G. y Holly F.: J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1866
- 38 Holly F.W., Emerson G. y Shunk C.H.: J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1069
- 39 Shive W., Sibley and M. y Rogers L.: J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 867
- 40 Kaczka E.A., Wolf D.E. y Folkers K.: J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 1541
- 41 Pierce J.V., Page A.C., Stokstad E.L. y Jukes T.H.: J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2615
- 42 Jackson W.C., Whiteild G.B. y De Vries W.: J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 335
- 43 Campbell J.A., Mc Laughlan J.M. y Chapman D.C.: J. Am. Pharm. Ass. Sc. Ed., 1952, 41, 479
- 44 Anslow y col.: Il Farmace, 1951, 6, 752
- 45 Lester Smith E.: Biochem. J., 1952, 52, 395
- 46 Heathcote G.H.: J. Pharm. and Pharmacol., 1952, 4, 641
- 47 Cooley G., Ellis B., Petrow W., Beaven G.H. y col.: J. Pharm. and Pharmacol., 1951, 3, 271
- 48 Boxer G.E. y Rickards J.C.: Research Lab. Merck and Co. Inc.
- 49 Lester Smith E. y Parker L.: Biochem. J., 1948, 43, VIII
- 50 Fantes K.H. y Ireland D.M.: Biochem. J., 1950, 46, XXXIV
- 51 Rudkin G.O. y Taylor R.J.: Analytical Chem., 1952, 24, 1155
- 52 Pereira Ferjaz: Anais Azevedo, 1949, 1, 163
- 53 Patte F.: Annales Pharm. Franc., 1951, 11, 660
- 54 Patte F.: Annales Pharm. Franc., 1953, 11, 73
- 55 Sherb M. y Briggs G.M.: J. Biol. Chem., 1948, 176, 1463
- 56 Greene R.D., Breck A.J. y Mc Cormack R.B.: J. Biol. Chem., 1949, 178, 999
- 57 Koditschek L.K., Hendlin D. y Boyd Woodruff H.: J. Biol. Chem., 1949, 179, 1093
- 58 Skeggs H.A., Huff J.H., Wright D.D. y Bosshardt D.: J. Biol. Chem., 1948, 176, 1459
- 59 Hoffman C.E., Stokstad E., Franklin A. y Jukes T.: J. Biol. Chem., 1948, 176, 1465

- 53 Winsten W.A.y Eigen E.J.:J.Biol.Chem.,1949,177,989
- 53 Winsten W.A.y Eigen E.J.:Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,1948,67,513
- 54 Capps B.F.,Hobbs N.L.y Serek H.:J.Biol.Chem.,1949,178,517
- 55 Burholder Paul :Science,1951,114,459
- 56 Davis y Mingioli:Science,1951,114,459
- 57 Snell E.E.,Kitay E.y Mc Nutt W.S.:J.Biol.Chem.,1948,175,475
- 60 Sherb Mary:Science,1948,107,397
- 61 Berseck H.,Deasy C.y Haagen A.J.:Science,1949,110,528
- 64 Lewis U.J.:J.Biol.Chem.,1952,194,539
- 62 Riekes E.L.,Brink N.G.,Koniuszy F.R.,Wood R.T.y Folkers K.:Science,'48,108,634
- 62 Riekes E.L.,Brink N.G.,Koniuszy F.R.y col.:Science,1948,108,2797
- 63 Mündel O.y Lugones Z.M.:La Prensa Médica Argentina,1951,nº14,38
- 64 Mündel O y Lugones Z.M.:Revista Farmacéutica,1950,nº1,2 y 3,año XCII
- 64 Chaiet L.,Rosenblum C.y Woodbury D.T.:Science,1950,111,601
- 59 Rocchietta S.:Bollet.Chimico Farm.,1950,89,25
- 62 Conn J.B.,Norman S.L.y Watman S.T.:Science,1950,3,658
- 64 Cuthbertson W.F.y Lloyd J.P. J.Pharm.and Pharmacol.,1949,1,705
- 64 Wallmann J.C.,Cunnigham B.B.y Calviné M.:Science,1951,113,55
- 67 Hall Harlow H. Chemical Abstracts,1951,45,9813
- 68 Baserga A.:Il Farmace,1951,46,525
- 67 Girardet R.H.:Biochem.J.,1952,52,58
- 69 Beneist P.J.y Patte F.:Boll.Chimico Farm.,1952,91,375
- 70 Griffenhagen G.B.:J.An.Pharm.Ass.Sc.Ed.,1952,41,181
- 9 Ware P.A.y Crenheim G.:J.An.Pharm.Ass.Sc.Ed.,1950,39,95

- 41 Petrow V. y Ellis B.: Pharm. J., 1955, nº4791, vol. 175, pag. 158
- 42 Petrow V. y Ellis B.: Pharm. J., 1955, nº4790, vol. 175, pag. 140
- 43 Ford J.E., Holdsworth E.S. y Porter J.W.: Biochem. J., 1952, pag. viii
- 44 Gant B., Lester Smith E. y Parker F.J.: Biochem. J., 1954, pag. xxxiv y xxxv
- 45 Dien H.W., Calkins D. y Pfiffner J.J.: J. of the A. Chem. Soc., 1952, 74, 1108
- 46 Ford J.E., Holdsworth E.S. y For S.F.: Inst. Nac. Invest. Prod. Lacteos  
Univ. de Reading (1954)
- 47 Woolley D.W.: J. Exp. Med., 1951, 93, 13
- 48 Armitage J.B., Cannon J.R., Johnson S.W. y col. J. Chem. Soc., 1953, 3849
- 49 Armitage J.B., Johnson A.W., Lester Smith E., Todd A.R. y Crawford Hosgkin D.:  
Nature, 1955, pag. 325, nº176
- 50 Angier R.B. y col.: Science, 1945, 25, 393
- 51 Moglia M.R.: "Contribución al estudio analítico y tipificación de los extractos hepáticos" (1952)
- 52 Callender J.T. y Lajtha L.G.: Revista Clínica Española, tomo LI, nº4, pag. 274, 1955
- 53 Castle W.B.: J. Clin. Med., 1949, 54, 1502
- 54 Glass G.B., Boyd L.J. y Svigals C.S.: Bull. N.Y. Med. Coll., 15-15, 1950
- 55 Sauberlich H.E. y Baumann C.A.: J. Biol. Chem., 1948, 176, 165
- 56 Nichol C.A. y Welch A.D.: Proc. Sec. Exp. Biol. and Med., 74, 52-55, Mayo 1950
- 57 Bond y col.: Il Farmaco, 1951, vol. VI, nº4, pag. 525
- 58 Frost y col.: Proc. Sec. Biol. Med., 72, 102, 1949
- 59 Girdeed R.H.: Blood, 8, 75-95, Enero 1952
- 60 Editorial: Intrinsic Factor, Brit. Med. J., 498, 1953
- 61 Soldi A. y Pratesi P.: Il Farmaco, nº2, pag. 236, 1952
- 62 Tastaldi E.: Anais Farm. Quim., nº4, pag. 12, 1953
- 63 Tastaldi E.: Anais Farm. Quim., nº1, pag. 11, 1953

*Pegues /ukawini*

Lista de correcciones

Aclaración del título:

El título aprobado es el que figura en el plan de tesis "Métodos de extracción de vitamina B<sub>12</sub> producida por fermentación . Su medición microbiológica ".

La impresión:

Todos los ejemplares han sido escritos directamente y no por copias, de ahí que en algunos la numeración varíe, pero en todos el texto es absolutamente idéntico.

En la Introducción:

En el renglón nº17 debe decir: "...en los caldos crudos de fermentación por Bacillus brevis, referida a las condiciones de industrialización en nuestro país.

Pag. nº3, debe decir en el renglón nº17:

"....por haber demostrado su capacidad de estimular la producción de glóbulos rojos etc.etc.

Pag. nº6, debe decir el renglón nº13:

"....pudiendo durante 20 minutos.

Pag. nº8, debe decir en el renglón nº4:

"La vitamina B<sub>12</sub> cristalizada es de una gran pureza y de mayor estabilidad que el concentrado de la vitamina misma"

Pag. nº8, en el renglón nº17 debe decir:

"La medición de vitamina B<sub>12</sub> , por el método microbiológico indicó que más del 50% de la vitamina cristalizada es como la de la solución de concentrado de vitamina B<sub>12</sub> se había descompuesto

Pag. nº12, en el renglón nº3:

La expresión "cantidad de sustancia activa del Lactobacillus lactis Dörner", es la empleada por el autor y se refiere al

contenido en vitamina B<sub>12</sub>, valorado por el método microbiológico

Pag. nº29, debe decir en el renglón nº6:

"Davis y Mingioli, usan para la cepa 113-3 de *Escherichia coli*...."

Pag. nº29, en el renglón nº15 debe decir:

"usando la cepa 113-3 de *Escherichia coli*."

Pag. nº31, debe decir en el renglón nº2 de la Siembra:

"....agregando a cada tubo 0,5 ml de medio de cultivo de 24 horas de *Lactobacillus leichmannii*."

Pag. nº33, en el renglón nº3 debe decir:

"....se extrae por acetona-alcohol, solvente en el cual cristaliza en agujas rojas."

Pag. nº36

Para la técnica de fermentación en superficie, las sales que entran en la composición del medio de cultivo tienen el siguiente número de moléculas de agua de cristalización:

|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| Cloruro de calcio    | 2 H <sub>2</sub> O |
| Sulfato de hierro    | 7 H <sub>2</sub> O |
| Sulfato de manganeso | 4 H <sub>2</sub> O |
| Sulfato de magnesio  | 7 H <sub>2</sub> O |
| Sulfato de cinc      | 7 H <sub>2</sub> O |
| Sulfato de cobalto   | H <sub>2</sub> O   |

Pag. nº38, el renglón nº10, debe decir:

El flujo de aire fue de 1 litro por litro de medio por minuto con una agitación de 250 revoluciones por minuto.

Pag. 38, los renglones nº13 y nº16 deben decir:

"....5.000 unidades por ml."

Pag. nº50:

La lectura se hace midiendo la turbidez de los tubos de las escalas

de ensayo y comparación en el espectrofotómetro de Fisher modelo A.C. filtro 50 A.

Pag. nº57:

1) -El carbón activado usado es el F.M.N 50 de Ceca Barbet.  
 2) - El renglón nº4 debe decir: "El precipitado se lavó con una solución hidroalcohólica al 30% de etanol. La medición microbiológica de las aguas de lavado no acusó presencia de vitamina B<sub>12</sub>".

Pag. nº58, el renglón nº3 debe decir:

".....obteniéndose los siguientes resultados correspondientes a un promedio de 10 determinaciones".

Pag. nº55, el renglón nº2 debe decir:

".....a fin de determinar la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> que retiene el adsorbato...."

Pag. nº59, en el párrafo de Elución con acetona pura y triple lavado del adsorbato, el renglón nº3, debe decir:

".....para determinar las unidades de vitamina B<sub>12</sub> que puede recuperarse".

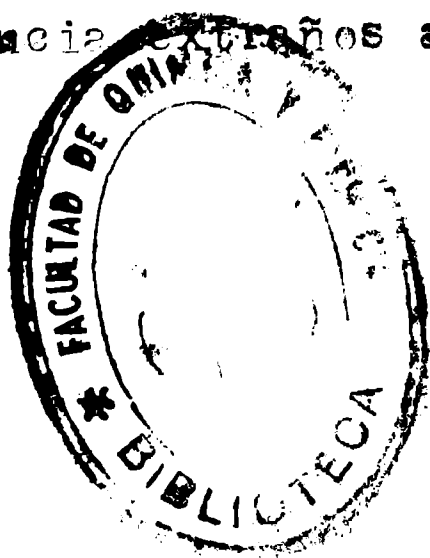
Pag. nº62, el renglón nº8 debe decir:

"....Se filtra y el residuo se lava con agua"....

#### Unidades *Lactobacillus lactis* Dörner

Aunque hemos empleado como germen test el *Lactobacillus leichmannii*, la expresión L.L.D. (*Lactobacillus lactis* Dörner) la hemos conservado porque para el *Lactobacillus leichmannii*, no existe definición acentada.

No hemos expresado microgramos de vitamina B<sub>12</sub> ó unidades de vitamina B<sub>12</sub> porque la valoración ha sido exclusivamente microbiológica y pudieran existir factores de influencia extraños a la misma.



*Regina Sukowic*







