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-18977

№ 340 (2)

MINISTERIO DE EDUCACION DE LA NACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EVA PERON

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

"OBTENCION DE RIBOFLAVINA POR FERMENTACION .
SU TITULACION MICROBIOLOGICA"

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

Bethy Lyda Ayerra
1953

(043.2)
TESIS
00340

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-18977

Padrino de Tesis

Dr. ZENON MARIANO LUGONES

OBTENCION DE RIBOFLAVINA POR FERMENTACION .

SU TITULACION MICROBIOLOGICA.

Introducción.

Riboflavina.

1.-Consideraciones generales.

2.-Métodos generales de preparación.

3.-Métodos biológicos de preparación.

4.-Métodos de valoración:químicos,físico-químicos
y biológicos.

5.-Parte experimental.

I.Fermentación.

a)Selección de la cepa de producción.

b)Selección de un medio básico.

c)Variables para aumentar el rendimiento en Ribo-
flavina.

1)Físicas:pH;temperatura;agitación.

2)Fuente de Carbono.

3)Fuente de Nitrógeno.

4)Factores minerales.

5)Factores accesorios:P.A.B.A.;ácido naftilacéti-
co;ácido nicotínico.

II.Titulación microbiológica

Puesta a punto del método de titulación con Lac-
tobacillus casei.

III.Purificación y concentración de Riboflavina.

a) Ensayos de adsorción.

1) con Carbon.

2) con Bentonita.

3) con solución saturada de ácido benzoico en etanol.

b) Elución de los adsorbatos por diferentes disolventes.

Alcohol-agua; acetona agua; piridina agua; ácido cítrico a distintos pH y otros.

6.-Conclusiones.

7.-Bibliografía.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

En cumplimiento de disposiciones vigentes para optar al grado de Dr. en Bioquímica y Farmacia, me es grato elevar a la consideración del Sr. Decano y los Sres. Profesores, la presente Tesis, fruto de mi labor desarrollada en el Laboratorio Tecnológico de esta Facultad y en los laboratorios O.C.E.F.A. de Buenos Aires.

La elección del tema, así como la dirección del trabajo pertenecen al Profesor Dr. Zenón M. Lugones, quien me brindara en todo momento su inestimable apoyo científico y moral con sin igual empeño. Sea mi más sincera expresión de reconocimiento a su saber y dotes de maestro, a su cordialidad y caballerosidad.

Me complace también dejar constancia de mi agradecimiento a los laboratorios O.C.E.F.A., generosamente ofrecidos para realizar en ellos gran parte de mi trabajo, y donde conté con la amable colaboración de los Dres. Oscar Mundel en la Sección bacteriológica y Mario Moglia en la Sección Contralor.

En esta Facultad, el Dr. Manuel Escalante se brindó gentilmente a secundarme en la Sistemática de hongos, y en cuanto a la fotografía debo agradecer su amabilidad al Dr. Jorge Gascón.

A todos y cada uno de los que conmigo compartieron los altibajos del camino hasta llegar a la meta: muchas gracias.

-1.-

CONSIDERACIONES GENERALES

RIBOFLAVINA

1.-Consideraciones generales.

Riboflavina o d-Riboflavina, denominación sugerida por el "Council on Pharmacy and Chemistry"(1937)(1) y aprobada por el "Committee on Vitamin Standards" de la Sociedad Americana de Químicos Biológicos, y por el "Committee on Vitamin Nomenclature" del Instituto Americano de Nutrición.

(Abril 1937)

Sinonimia.

Vitamina B₂:Sugerido por Kuhn.

Lactoflavina.Ovoflavina.Hepatoflavina:Denominaciones primitivas relacionadas con la fuente de origen.

Vitamina G:Denominación histórica sugerida por Sherman.

Fórmula.

- 6,7-dimetil-9-(d-1 ribitil)isoalloxazina.
- 6 6,7-dimetil-9-d-riboflavina.

Peso molecular. 376,36.

HISTORIA

La Riboflavina, pigmento hidrosoluble perteneciente al grupo de los xicromos, es conocida ya en el año 1879, fecha en que Blyth aisla una flavina impura del suero de la leche. (157)

En 1913, Osborne y Mendel(2), descubren en la leche la presencia de una sustancia hidrosoluble y promotora de crecimiento.

En 1917, Emmett y Mackin(3), diferencian la acción fisiológica de la vitamina B₁ y la vitamina B₂; pero aún se cree en la identidad entre la porción antineurítica y la porción promotora de crecimiento.

En 1919, Mitchell(4), analiza críticamente los puntos en que se apoya esta creencia y que son los siguientes:

- 1.- Distribución similar de ambos factores en productos naturales.
- 2.- Síntomas de degeneración nerviosa y parálisis, por carencia de hidrosoluble B en distintas dietas.
- 3.- Eficaz acción de extractos de alimentos naturales con propiedades promotoras de crecimiento, para suplir una dieta

sin otra fuente antineurítica.

4.- Solubilidades idénticas en solventes comunes.

5.- Igualdad de adsorbentes y precipitantes.

6.- Estabilidades similares, sino idénticas, frente a ácidos, álcalis y temperaturas elevadas.

Por el análisis de estos puntos llega a la conclusión de que en los ensayos hasta entonces realizados, existen pruebas para refutar cada uno de ellos, siendo pues posible, dudar de la identidad de las dos vitaminas hasta tanto experimentos cuantitativos aclaren la situación.

En 1920, Emmett y Luros (5), presentan los resultados de una investigación relativa a la estabilidad al calor de la vitamina, trabajo que ahonda más la duda acerca de la no identidad.

En 1921, Funk y Dubin (6), comentan muy sucintamente, una separación por adsorción fraccionada de levadura, de dos vitaminas tipo B, que parecen ser ambas necesarias para las ratas.

En 1925, Bleyer y Kallman (7), obtienen de la leche un pigmento amarillo, lactocromo, y anuncian sus propiedades químicas más notables.

Mc Collum, Simmonds y Bekker, en el mismo año, comparan la acción protectora de la levadura con la de germen de trigo, como única fuente de vitamina B, sobre ratas alimentadas con dietas salinas deficientes; resultando la levadura aparentemente inferior, se piensa en la existencia de dos factores en la vitamina B, los que aparecerían en distintas concentraciones en los diversos materiales.

En 1926, Hauge y Carriek (9), realizan ensayos empleando pollitos como animales de experimentación, y una dieta completa en proteínas, sales y vitaminas liposolubles, a la que agregan cantidades variables de maíz y levadura. De los resultados obtenidos deducen la no identidad entre vitamina B₁ y B₂ y su distribución en distintas proporciones en los diversos materiales alimenticios.

Las investigaciones prosiguen. Smith y Hendrick (10) en un intento para determinar la naturaleza de la deficiencia de crecimiento en ratas, agregan a la dieta un 5-6% de levadura de cerveza autoclavada, procedimiento con el cual se creía destruir la vitamina B, y no obstante ello, se consigue el crecimiento deseado.

Goldberger, Wheeler, Lillie y Rogers (11) en 1926, sugieren que la sustancia de la levadura estable al calor, está relacionada con la prevención y cura de la pelagra, sobre la cual Goldberger, Waring y Willets habían realizado una larga investigación, que había conducido a la aseveración de la existencia de un factor PP. (Goldberger y Tanner. 1925) presente en levadura y leche.

En 1927, los estudios de Salmon (12) sobre comparación de valor antineurítico y promotor de crecimiento en distintos productos vegetales; los de Hassan y Drummond (13) sobre acción promotora del crecimiento de extractos de levadura autoclavada a 120° C una hora, a pH fuertemente alcalino, y los de Chick y Roscoe (14) sobre ensayos preventivos y curativos de distintos extractos y preparaciones de levadura y embrión de trigo, acumulan más eviden-

cias sobre la existencia de los dos factores.

Hogan y Hunter(15) en 1928, comentan que la exposición a la luz ultravioleta de materiales conteniendo el complejo B no afecta aparentemente sus propiedades antineuríticas; pero destruye la actividad promotora de crecimiento.

Experimentos de Williams y Waternman(16) años 1927 y 1928, conducen a postular la naturaleza tripartita de la vitamina B y se concluye que por lo menos dos factores son necesarios para el crecimiento y bienestar de ratas jóvenes: un factor termolábil, B, y uno termoestable C, incluidos anteriormente bajo el concepto de vitamina B. Un tercer factor que se halla en el trigo entero no tratado y en la levadura, pero no en la levadura autoclavada, ni en algunas preparaciones antineuríticas, es requerido en cambio por las pulonas, que no parecen necesitar el factor termoestable.

Poco a poco las distintas investigaciones agregan datos que conducen a aclarar la identidad de la Riboflavina; pero los estudios que llevan finalmente a su aislamiento, se originan en el terreno de las enzimas y no en el de la nutrición.

Banga y Szent-György, reconocen un cofermento respiratorio que aíslan de músculo de corazón y cuya parte coloreada denominan "cytoflav", en el año 1932. Casi simultáneamente, Warburg y Christian(17) describen una enzima oxidante nueva obtenida de extractos acuosos de levadura, que en solución acuosa presenta color amarillo con fluorescencia verdosa. Esta enzima, junto con una segunda obtenida de levadura y una coenzima de glóbulos ro-

jos de caballo, constituye un sistema enzimático capaz de oxidar el ester hexosa monofosfórico de Robinson.

Durante el proceso la enzima amarilla es reducida a su forma leuco y para regenerar la forma coloreada, basta agitar la solución con oxígeno molecular. En el sistema de oxidación reducción, la enzima amarilla actúa como transportador de oxígeno molecular al sustrato.

Según Warburg y Christian (18) (1933), esta enzima está presente en toda célula viva, o al menos en las células de todas las formas superiores de vida. Estos autores consiguieron escindir la enzima en un componente proteico y un pigmento, por tratamiento de una solución acuosa con 3 volúmenes de alcohol metílico a 38°C; la proteína precipita y el pigmento queda en solución. Ninguno de los componentes es catalíticamente activo en ausencia del otro. Este brillante hallazgo constituye la primera separación e identificación del grupo prostético o químicamente activo de una enzima.

Irradiando las soluciones alcalinas del pigmento separado y procediendo a una posterior acidificación, se obtiene un fotoderivado amarillo, soluble en cloroformo, y los estudios acerca de la naturaleza química de este fotoderivado que también puede obtenerse fácilmente a partir de la Riboflavina, conducen a la determinación de la estructura química de la vitamina y del grupo prostético de la enzima.

Mientras tanto, en 1933, aparecen publicaciones casi simul-

táneas de varios laboratorios, apoyando la relación y probable identidad, entre los pigmentos hidrosolubles con fluorescencia amarillo verdosa ampliamente distribuidos en productos animales y vegetales y la vitamina B₂.

Ellinger y Koschura(19), en 1933, llaman la atención sobre un grupo de pigmentos de fluorescencia amarillo verdosa, presente en leche, hígado, riñón, orina músculo, levadura y vegetales, para el cual sugieren el nombre de liocromos. Postulan su probable relación con la enzima amarilla de Warburg y Christian.

Bocher(20) en 1933, aisla del suero de la leche unos concentrados promotores de crecimiento, que actuando como suplementos de la dieta Bourquin Sherman deficiente en vitamina G demuestran poseer potencia vitamínica paralela a la intensidad de su coloración amarilla.

Kuhn y col.(21), en el mismo año, aislan un pigmento amarillo de la albúmina de huevo seco (ovoflavina) y comunican que el producto cristalino es promotor de crecimiento como suplemento de la dieta Bourquin Sherman en ratas (22).

Poco después, Kuhn y col.(23) aislan de leche una lactoflavina, de fórmula empírica igual a la ovoflavina, con un punto de fusión, con descomposición, a 267°C y con una curva de absorción extraordinariamente similar a la de ovoflavina.

Estos autores sugieren el nombre químico de flavinas para el grupo de estos pigmentos amarillos hidrosolubles; en esta denominación, la terminación in significa que los pigmentos tie-

nen Nitrógeno en su molécula. Dado que parecen existir diferencias entre las actividades vitamínicas relativas de las distintas flavinas aisladas, se piensa que ellas se deben a diferencias en la naturaleza química, asociadas a la variedad de sus fuentes de origen, y por lo tanto se propone el uso de prefijos para diferenciarlas. Surgen así las denominaciones de: ovoflavina, lactoflavina, hepatoflavina. Ulteriores investigaciones demuestran que todas corresponden a la misma flavina, con un residuo d-ribosa unido al característico núcleo cromóforo tricíclico de las flavinas.

Una vez aislada la Riboflavina en forma cristalina, su estructura es dilucidada por el estudio de sus productos de foto-descomposición.

Ya hemos mencionado los trabajos de Warburg y Christian sobre la lumiflavina, compuesto de fórmula $C_{13}H_{12}N_4O_2$, soluble en cloroformo pero no en agua, y que posee propiedades espectrales similares a las del componente de la enzima amarilla, con dos bandas de absorción características en la zona ultravioleta y una en la zona visible.

Kuhn, Rudy y Wagner-Jauregg (24), encuentran, en 1933, que la irradiación de soluciones alcalinas de Riboflavina, da por resultado la separación de una cadena lateral, rica en oxhidrilos, que es responsable de la solubilidad de la vitamina en agua. Como la composición elemental de la vitamina es $C_{17}H_{20}N_4O_6$ y la del foto-derivado $C_{13}H_{12}N_4O_2$, la diferencia entre ambas:

$C_4H_8O_4$ corresponde a la porción separada por irradiación.

Además la acetilación de Riboflavina, origina un derivado tetraacetilado; y un proceso adecuado de oxidación da por resultado la formación de aldehído fórmico, productos ambos que no se obtienen a partir de lumiflavina. De esto se infiere que la cadena lateral $C_4H_8O_4$ debe corresponder a una estructura:

Kuhn y Rudy (25) en 1934, realizan posteriores estudios sobre los productos de hidrólisis alcalina de Riboflavina y su foto-derivado. Por calentamiento de soluciones alcalinas de ambas, obtienen urea y un ácido orgánico $C_{12}H_{12}N_2O_3$ que es monobásico y que forma una sal de plata amarilla. Como son necesarias dos moléculas de agua para la separación de urea por hidrólisis alcalina de lumiflavina, se infiere que el grupo generador de urea pertenece a un sistema cíclico y no a una cadena lateral ureido o guanidina, en cuyo caso sólo se hubiera requerido una molécula de agua. Reuniendo ambas observaciones se deduce que los átomos de oxígeno de lumiflavina pertenecen a un anillo éter lábil que al romperse forma una urea y el otro el grupo $+COOH$ del ácido orgánico.

Otros estudios (26) conducen al descubrimiento de que tanto la lumiflavina como el ácido orgánico $C_{12}H_{12}N_2O_3$, contienen un grupo alquilado, $-NCH_3$, lo que no sucede en la vitamina B_2 ; aparentemente entonces, la cadena lateral glucídica separada por fotolisis, es reemplazada por un grupo alkilo.

Como resultado de estos estudios, Kuhn sugiere la siguiente

estructura para la lumiflavina:

y para la Riboflavina:

Esta estructura propuesta, que es más tarde confirmada por síntesis (Karrer y col., 1934; Kuhn y col., 1934.), relaciona ya definitivamente estos dos compuestos, con la serie de las alloxazinas, descubiertas en 1891 por Kühling (27) y que poseen muchas propiedades similares a esta flavinas.

Las estructuras de aloxazina (A) y su tautómero isaloxazina (B), son:

Riboflavina y lumiflavina, son derivados de isaloxazina, ya que ambos poseen solamente un átomo de hidrógeno activo en posición 3. En riboflavina, el H unido al N₉ se reemplaza por un resto pentosa y en lumiflavina por un grupo metilo.

ESTADO NATURAL

La Riboflavina se encuentra muy distribuida en todo el reino animal y vegetal.(Ver Tabla I.)

No existe célula viva que no la contenga, y la cantidad presente es directamente proporcional a la respiración aeróbica, e inversamente proporcional a la glicólisis anaeróbica que tenga lugar en el tejido que se encuentre.

Un índice de su importancia biológica reside en el hecho de que hasta los seres vivos más inferiores: bacterias, hongos y levaduras, tienen la facultad de sintetizarla de acuerdo con sus necesidades, y algunos muy por encima de ellas, lo que da origen a importantes procesos de fermentación industrial.

Por otra parte, los microorganismos que no son capaces de sintetizarla, la requieren como factor de crecimiento (ej. *Lactobacillus casei*) y esto constituye la base de interesantes métodos de titulación microbiológica.

Entre las mejores fuentes de vitamina B₂ tenemos la levadura, leche, clara de huevo, hígado, riñón y corazón de mamíferos(29). En cambio el pescado, la carne de vacunos y la de aves de corral constituyen fuentes regulares, en menor canti-

dad aún la contienen los granos y legumbres, y durante la germinación el contenido aumenta en pocos días (Muller-Dahl).

En los vegetales verdes, las partes más ricas son las hojas y especialmente las que están en crecimiento; luego a medida que envejecen y se secan, su contenido en flavina disminuye.

En los órganos el contenido decrece en la forma siguiente: riñón, hígado, corazón, sustancia gris, bazo, sustancia blanca. (Gourevitsch).

Es muy interesante el hecho de que la cantidad de riboflavina sea siempre menor en los tejidos cancerosos que en los tejidos normales. (30).

La vitamina B₂ puede encontrarse en los tejidos en forma libre o combinada. Se encuentra libre en lugares donde no se realizan o son muy escasos los procesos de fermentación, como sucede en la retina y en orina.

Combinada se encuentra formando parte de numerosas enzimas, que juegan un papel muy importante como mediadores en las oxidaciones iniciadas por los nucleótidos piridínicos, y por medio de las cuales intervienen en procesos parciales muy diversos del metabolismo.

Según Williams, estas enzimas son las llaves maestras que ponen en libertad las reservas de energía vital acumuladas en glucosa y otros alimentos.

Se conocen unas diez enzimas flavoproteicas. Las distintas reacciones por ellas catalizadas se dan en la tabla II

Por su composición química, las enzimas flavoproteicas son proteínas conjugadas formadas por una proteína específica unida a un grupo prostético, que consiste en un mononucleótido: fosfato de riboflavin, (como es el caso de la enzima amarilla de Warbyrg y citocromo c reductasa) o en un dinucleótido: riboflavin-adenina-fosfórico (en las demás enzimas).

La reducción y oxidación de la flavoproteína que tiene lugar en las reacciones que cataliza, se supone que se realiza por un mecanismo de adición 1-4; por incorporación y eliminación de H de las posiciones 1 y 10 del anillo isoaloxazina.

Un esquema general de la oxidación de un metabolito por intermedio de las enzimas flavoproteicas es el siguiente: (29)

- 1.-Sustrato + enzima + coenzima $\rightarrow$ Sustrato oxidado + enzima + coenzima reducida.
 - 2.-Coenzima reducida + flavoproteína $\rightarrow$ Coenzima + flavoproteína reducida.
 - 3.-Flavoproteína reducida + X $\rightarrow$ Flavoproteína + X reducido.
- (X :aceptor de H:citocromo).

El número de veces por minuto que la enzima puede aceptar hidrógeno y transportarlo al acceptor siguiente en el ciclo,

se denomina "número de turnover".

La primera enzima flavoproteica descubierta es la enzima amarilla de Warburg, obtenida por Warburg y Christian de levadura (17) y aislada luego por Theorell (31)(32) quien la purifica por cataforésis a pH 4,3-4,5 y por fraccionamiento con sulfato de amonio a pH 5,2. Su peso molecular es de 80.000, según Keriwick y Pedersen; y contiene un 0.45-0.47% de Riboflavina y 15% de Nitrógeno.

Kuhn y Rudy (1936) y Theorell (1937) creen que la unión entre la parte proteica y el fosfato de Riboflavina, se realiza de la siguiente forma (33,34):

La parte proteica contiene arginina, histidina, lisina, ácido glutámico y aspártico (Kuhn y Desmuelle, 1938)

La reacción catalizada por la enzima de Warburg es la siguiente:

- 1.- Hexosa monofosfato + Coenzima 3 → fosfohexonato + dihidrocoenzima 2.
- 2.- Dihidrocoenzima 2 + Enzima amarilla → coenzima 2 + enzima amarilla reducida.
- 3.- Enzima amarilla reducida + O_2 → enzima amarilla + H_2O_2

El número de turnover de esta enzima es muy bajo: 50,10

que sugiere que desempeña un papel muy pequeño en la respiración tisular, comparado con la diaforasa por ej., que posee un número de 8.500.

La diaforasa, o factor coenzima, es descubierta por Dewan y Green (1937) e independientemente por Euler y Hellström (1938). (55, 56, 57)

Según Abraham y Adler (1940) existen dos diaforasas, de las cuales una reacciona con dihidrocoenzima 1 y la otra con dihidrocoenzima 2. La reacción que cataliza puede esquematizarse así: (58)

- 1.-Dihidrocoenzima 1 + diaforasa $\rightarrow$ coenzima 1 + diaforasa reducida.
- 2.-Diaforasa reducida + azul de metileno $\rightarrow$ diaforasa + leuco derivado de azul de metileno.
- 3.-Leucoderivado de azul de metileno + $O_2 \rightarrow$ Azul de metileno + H_2O_2 .

La citocromo c reductasa se ha hallado solamente en levadura, tiene un peso molecular de unos 75.000 y su descubrimiento ha tornado incierto el rol de la enzima de Warburg y la diaforasa, pues cataliza la reducción del citocromo c por coenzima reducida 2.

La existencia de la d-amino ácido oxidasa, es un tema que se ha discutido bastante, y los trabajos que más contribuyeron a su conocimiento se deben a Krebs (1933, 1935). (41)

Su rol es altamente específico, ataca solamente a los d- α aminoácidos, lo que llama la atención, siendo que los aminoáci-

dos naturales pertenecen a la serie l; se cree que su función sea destruir los d-aminoácidos que puedan formarse por racemización de los aminoácidos naturales.

La xantino-oxidasa, o aldehidrasa, se considera que deshidrogena las formas hidratadas de hipoxantina y xantina a xantina y ácido úrico; pero no es específica, pues también oxida a otras purinas y a varios aldehídos alifáticos y aromáticos. (42)

La aldehído oxidasa de hígado parece diferir de ella, oxida tanto a los aldehídos alifáticos como a los aromáticos a ácidos, usando oxígeno molecular. El azul de metileno puede actuar como aceptor de hidrógeno. (43)

La ácido fumárico dehidrogenasa (Summer) es descrita por Fischer en 1937 y 1939; se presenta como impureza en las preparaciones de enzima amarilla, de la que puede separarse por repetidos tratamientos con sulfato de amonio, seguidos por diálisis prolongada. (44)

Cataliza la reducción de ácido fumárico a succínico en presencia de colorantes reducidos.

T A B L A I

Contenido de alimentos en Riboflavina (28)

Carnes:

γ vit. B₂/100 g.

Carne cruda de vaca.....	200
Carne cocida de vaca	-
Hígado de vaca	2500
Bife estofado; seso de vaca.....	-
Lengua de vaca cocida, tripa	-
Carne cocida de ternera	350
Riñones de ternera	2500
Timo de ternera	1200
Carne cruda de cerdo; carne asada de cerdo; hígado de cerdo	-
Riñones de cerdo	3500
Jamón crudo	-
Jamón ahumado	300
Jamón cocido	200
Tocino	90
Carne de cordero	270
Riñones de cordero	-
Carne de conejo estofada	200
Hígado de aves	-
Salchichas de carne de cerdo	-

Pescados y mariscos:

Bacalao	150
Hígado de bacalao	650
Huevas de bacalao	1000
Merluza	165
Abadejo; salmón salado; atún.....	-
Hipoglosus	185
Filete de caballa	660
Anguila de mar; arenque ahumado.....	-
Arenque	360
Anchoa entera	400
Anchoa ahumada	-
Sardina en conserva	500
Camarones	160
Langosta	130
Ostra; mejillones	-

Verduras:

y vit. B₂/100g.

Repollo blanco, crudo	150
Repollo " , cocido, saltado.....	-
Repollo colorado, crudo	-
Coliflor crudo	140
Coliflor cocido	-
Acelga	330
Espinaca cruda	200
Espinaca cocida	-
Cebolla, alcachofa, puerro, perejil	-
Tomate	20
Papas crudas	70
Papas hervidas	60
Zanahoria	60
Lechuga	150
Nabos, rábano, escarola	-
Remolacha	110
Rabanitos	20
Hongos	50
Batatas	60

Legumbres:

Judías verdes, crudas	280
" " , cocidas	-
Alubias, habichuelas	240
Guisantes verdes	160
" " cocidos	-
Guisantes secos	250
Lentejas	-
Haba de soja cruda	300

Frutas:

Manzana	35
Pera	70
Membrillo, mandarina	-
Ciruela azul	40
" amarilla	50
" sega	550
Banana, limón	10
Melocotones	65
Albaricoque	120
Naranja	40
Melón	50
Higo seco	60
Grosellas, frambuesa, zarzamora, uva	-
Avellana, nuez, coco, almendras, castaña.....	-

Lecche, productos lácteos, huevos:

	vit. B ₂ /100g
Lecche materna	160
Lecche materna, calostro	-
Lecche devaca, verano	200
" " " , invierno	200
" " " , calostro	475
Sucro	150
Lecche condensada	-
Crema	10
Mantequilla de cabra	-
Huevo de gallina	275
Yema	250-300
Clara	400
Huevo de pato	400
Queso con poca grasa	450
Queso con mucha grasa	150

Cereales, harina, productos derivados:

Grano y gérmenes de cebada	-
Grano entero de maíz amarillo	200
Gérmenes de maíz amarillo	-
Harina " " " "	-
Grano de mijo	-
Harina de avena, avena arrollada	-
Grano entero de centeno	400
Gérmenes de centeno	1750
Harina de centeno	400
Pan integral de centeno	280
Grano entero de trigo	350
Gérmenes de trigo	1750
Harina de trigo	280
Pan integral de trigo	245
Sémola de trigo	-
Arroz pulido	80
Arroz integral	110
Tapioca; fideos	-
Levadura de cerveza	800

TABLA II (29)

Enzima	Dador de H	Aceptor de H.
Enzima amarilla de Warburg.	Codehidrogenasas reducidas I y II	Oxígeno molecular.
Citocromo c reductasa	Codehidrogenasa reducida II	Citocromo c
Diaforasa I	Codehidrogenasa reducida I	Citocromo a y b
Diaforasa II	Codehidrogenasa reducida II	?
Diaforasa	Codehidrogenasas reducidas I y II	?
d-amino ácido oxidasa.	d-amino ácidos	Oxígeno.
Aldéhido oxidasa	Aldéhidos	Oxígeno (de azul de metileno)
Xantino oxidasa	Xantina	Oxígeno.
Glucosa oxidasa	Glucosa	?
Dehidrogenasa succínica	Acido succínico	?
Acido fumárico oxidasa.	Colorantes reducidos	Acido fumárico.

PROPIEDADES

La Riboflavina cristaliza en agujas amarillas muy pequeñas.

Funde a 250°C con descomposición a los 280°C si la velocidad de calentamiento es de 5°C por minuto.

Solubilidad: Debido a la presencia de la cadena d-ribitilo, es un compuesto típicamente hidrosoluble.

En literatura se encuentran datos diversos referentes a su solubilidad en agua.

Rosenberg (45) cita:

12 mg. en 100 ml. de agua a 27,5°C.
y 19 " " " " " " " 40°C.

Gupta y Gupta (46) comentan

13 mg. en 100 ml de agua a 30°C.
200 " " " " " " " 100°C.

Otros autores citan 25mg% a temperatura ambiente.

Runt(1952)(47) refiere haber encontrado una solubilidad del 3% a 15°C.

Chie Chien Tzong(1950) (48) encuentra que la solubilidad de Riboflavina aislada de cultivos de *Xenothecium*

ashbyi es de 0,01% (95-105 γ /cm²).

La temperatura tiene gran influencia sobre la solubilidad de Riboflavina y así se cita:

50 γ /ml.	a 7°C
140 γ /ml.	a 30°C
370 γ /ml.	a 50°C
1200 γ /ml.	a 80°C
2300 γ /ml.	a 100°C.

Hanson y Weiss(49) comentan una solubilidad que puede llegar hasta 50 partes por millón.

Los diversos datos contrastantes se deben al hecho repetidamente observado, de que los preparados no perfectamente puros son sensiblemente más solubles en agua que los puros.

Un pH ácido no tiene acción sobre el aumento de la solubilidad. Un pH alcalino provoca aumento de solubilidad; pero altera la estructura, especialmente durante la esterilización. En este caso, según Surrey y Nachod(50) se produce la escisión en urea y ácido 1,2-dihidro-6,7-dimetil-2 ceto-1-d-ribitol quinoxalin-3-carboxílico.

La Riboflavina es ligeramente más soluble en soluciones de Cloruro de sodio que en agua.

Es menos soluble en alcohol que en agua (4,5mg. por 100 ml. a 27,5°C/

Ligeramente soluble en ciclohexanol y acetato de anilo. Insoluble en éter, cloroformo y benceno. Formali-

na y ácido fórmico son buenos solventes(48).El último disuelve más de 1%.Frost(1942)(51)describe la preparación de complejos riboflavin-boro solubles,conteniendo hasta 0,3% de vitamina,es decir.unas 50 veces la solubilidad natural.

Auerbach(1944)(52) patentó un compuesto en el cual la solubilidad excede los 12mg.en 100 ml de agua a temperatura ambiente,y que está formado por Riboflavina y un borato de un metal alcalino.

Jurist(1944)(53) obtiene soluciones concentradas de Riboflavina en acetanidina-HCl.Una solución al 20% disuelve 1900-2000 γ /ml;y soluciones al 5 y 12-15% disuelven 300-400 y 1000 γ B₂/ml.Son adecuadas para uso parenteral.

Preiswerck(1944)(54),patenta como buenos solubilizantes,las soluciones acuosas de sales de ácido 2,4-dihidroxibenzoico o su éter monoalkilado. Por ej. una solución al 6% de 2,4-dihidroxibenzoato de sodio disuelve aproximadamente 0,5% B₂.Una solución 25% de 2,4 dihidroxibenzoato de litio disuelve más de 3%. Una solución 10% de 2hidroxi-4 etoxibenzoato de sodio disuelve hasta 1,8% y una solución 25% de 2 hidroxi-4 metoxibenzoato de sodio ,disuelve más de 3%.

Dale (1944)(55) patenta como solventes adecuados para recuperar Riboflavina de varios adsorbentes, los alcoholes polihídricos y sus éteres parciales. Los mejores son los alcoholes polihídricos con 2-4 átomos de carbono y sus éteres inferiores, tales como: etilen glicol; propilen trimetilen, α butilen, β butilen y dietilen glicol; glicerol, monometil y monoetil éteres de dietilenglicol. Las mezclas más ventajosas resultan las de alcoholes monohídricos inferiores y cetonas alifáticas inferiores. .

Una patente danesa, (1945)(56) cita aumento de solubilidad por agregado de una sal de ácido monohidroxibenzoico

Bird y Kuna (1946)(57) patentan la solubilización rápida de Riboflavina con ácido gálico o sus sales alcalinas: 10cc de ácido gálico al 10% en etanol acuoso al 50% disuelven 14 mg. de vitamina B₂; 10cc. de galato de sodio en solución acuosa al 10% disuelven 58mg. a 24,5°C; en igualdad de condiciones galato de potasio disuelve 73mg. y galato de litio 60mg.

Haas (1946)(58) presenta una patente de nuevos derivados de Riboflavina, muy solubles en agua y solventes hidroxilados. Estos derivados se preparan por esterificación con cloruros o anhídridos de ácidos halogenados y reempla-

zo posterior de los átomos de halógenos de los ésteres resultantes, con grupos dialkilamino que luego se salifican.

Miller(1946)(59) usa como agentes solubilizantes de Riboflavina, las sales hidrosolubles de ácido benzóico y sus derivados aminados o hidroxilados.

Frost(51) que en 1942 cita preparaciones riboflavinoboro solubles, describe en 1946(60) complejos de Riboflavina con ácido bórico y borax, adecuados para ser inyectados. También en 1946 (61) patenta soluciones estables de riboflavina-nicotinamida, y en 1947 (62) estudia la acción de la nicotinamida sobre la solubilidad de B₂ en agua, la que parece estar relacionada con su composición química, actuando favorablemente el grupo piridina y el amido. La solubilidad aumenta en solución de pH 5, de 0,1% a 2,5% con un incremento de 5-5 0% en la concentración de nicotinamida, y decrece progresivamente, a pH menores de 5/

Zentener(1947)(63) convierte Riboflavina en un complejo soluble, por tratamiento con ácido gálico en presencia de agua y un ácido inorgánico.

Furter y Hoffer (1948)(64) obtiene soluciones concentradas de la vitamina, a pH 4-5, usando ácido gentí-

sico y su sal de sodio.

Charney (1943) (65), presenta dos patentes para solubilizar Riboflavina; una alcanza hasta concentraciones de 0,015% empleando tirosin anida a pH 5-5,5 con HCl. La otra alcanza una solubilidad de 0,15-0,30% con una solución de vainillina al 1% en agua o propilen glicol.

Moos y Upham (1948) (66) preparan ésteres hidrosolubles estables a pH 5,5-7,5 y adecuados para uso parenteral. Ellos son: citrato, malato y tartrato ácido de Riboflavina.

Knauf y Kirschmeyer (67) prepara soluciones conteniendo de 0,1-0,3% de vitamina B₂, usando agua y alcohol veratrico al 1-4% como solventes.

Leal (1950) (68) prepara soluciones empleando antipirina como solvente. Una solución al 20% solubiliza 0,2% de Riboflavina; una solución al 40% solubiliza 0,5%.

N.H.H. (1950) (69) menciona metilol riboflavina, una mezcla de derivados metilólicos formados por acción de formaldehído sobre Riboflavina en solución débilmente alcalina. La hidrosolubilidad del derivado depende del número de residuos de aldehído fijados en la cadena lateral ribitílica; los términos más altos tienen una tendencia marcada a formar soluciones sobresaturadas estables; pero la actividad vitamínica que es perfecta en los términos más

bajos, disminuye gradualmente con el aumento de los grupos metilo.

Stone(1950)(70) cita un derivado hidrosoluble de Riboflavina, preparado solubilizando 50g. de la vitamina en 200ml de ácido sulfúrico concentrado. El compuesto es estable al aire y se han preparado soluciones acuosas al 10% P/V.

Hoffmann, La Roche y Co.(1951)(71) presenta una patente empleando ácido 2,5-dihidroxibenzoico y sus sales, como solubilizantes.

Arnold y Coll (1952)(72) obtienen una solución de vitamina B₂ con 3-hidroxi 2-naftoato de sodio, que permanece estable a 37° por un período de tres meses, sin pérdida de actividad.

Yamashita y Nakamoto(73) obtienen un producto con 100 de Riboflavina por cm³., empleando anhídrido fosfórico y etanol.

Runti (1952)(47) estudia la naturaleza del proceso de solubilización de Riboflavina, dividiendo los distintos agentes empleados hasta entonces en series. Llega a las siguientes conclusiones:

1) Derivados de ácido benzoico: Activos, sobre todo los compuestos con función amina y oxhidrilo libre.

2) Derivados de serie piridínica y quinolínica: Parti-

cularmente interesante el ácido 2-fenil-quinolin carboxílico.

3) Aminoácidos naturales: Poco activos.

4) Varios: Urea, la de acción más marcada.

La Riboflavina pura es estable en soluciones de ácidos minerales fuertes y frente a los agentes oxidantes fuertes como agua oxigenada, agua de bromo, ácido nítrico concentrado; aunque estudios recientes (74) señalan que el sistema es menos resistente a ciertos reactivos como agua oxigenada y permanganato de potasio, que lo que se había admitido hasta entonces.

Según Leviton (75) en soluciones puras es muy estable a la acción del agua oxigenada; pero se descompone rápidamente con soluciones diluidas de este reactivo, en presencia de trazas de ión ferroso.

Es relativamente estable al calor en soluciones ácidas y su velocidad de destrucción es rápidamente aumentada por una mayor alcalinidad. (Roscoe, 76).

Es oxidada por ácido crómico dando amoníaco, anhídrido carbónico y un residuo libre de nitrógeno.

Es oxidada regularmente por el ácido periódico, dando origen a dos moléculas de ácido fórmico, una de formaldehído y una de dimetil-6,7-isoxaloxazina-9-acetaldehído, compuesto sumamente lábil que se descompone en lu-

microno y lumiflavina (74).

Es destruida por permanganato de potasio en ácido acético 0.1 N en 10 minutos de calentamiento a temperatura ambiente; a pH 4,5 hay una destrucción menor del 10% en 10 minutos. (77)

A 27°C la descomposición de soluciones buffereadas a pH 5 se realiza con una velocidad de 1,2% por mes.

Es reducida reversiblemente por H_2 (Pd ó Pt e H_2 ; Zn en presencia de ácido); por tiosulfato de sodio; por ácido sulfhídrico en solución alcalina, y por cloruro titanoso.

La riboflavina no es apreciablemente afectada por la luz difusa cuando se encuentra al estado de polvo seco; pero en solución es muy sensible a la luz visible y ultravioleta. La temperatura y el pH afectan la reacción fotoquímica. Williams y Cheldelin (78) dan los siguientes datos a este respecto.

Tiempo de exposición Temperatura menor de 100°C.	% de destrucción		
	pH 3	pH 4,5	pH 6,5
5 minutos	16	28	42
15 "	42	62	72
30 "	60	84	91
45 "	--	90	99
60 "	95	97	+99

Tiempo de exposición 1 hora	Temperatura			% destruido
	32°C	75°C	100°C	
pH 3	-	-	95	
pH 4,5	16	66	97	
pH 6,5	51	+99	+99	

De Morre y Brown (1944) (79) comunican que la exposición a la luz solar directa aún durante un breve período, es suficiente para producir una destrucción considerable de la molécula; la luz natural difusa de una intensidad no mayor de 6 Unidades Weston no tiene acción perjudicial. Con luz artificial de 150 watt, las soluciones acuosas a un pH de 3-4, son estables a una distancia mínima de un metro y por un período de 4 horas. A un pH cercano a la neutralidad, se observa una ligera inestabilidad y es decididamente inestable en una mezcla de n-butyl alcohol, piridina y ácido acético. La luz ultravioleta la destruye muy rápidamente. Cualquiera tiempo de exposición a esa longitud de onda produce más destrucción que a cualquier otra.

Malley y Sievert disminuyen la destrucción de Riboflavina manteniéndola reducida con hidrosulfito de sodio, durante la exposición a la luz y reoxidándola luego por acción del aire.

La irradiación de soluciones ácidas o neutras, según

Karrer y col (80) da por resultado la formación de lumicromo: 6,7 dimetil aloxazina, de intensa fluorescencia azul. La irradiación de soluciones alcalinas da lumiflavina: 6,7,9-trimetil isoaloxazina.

Lumicromo.

Lumiflavina.

Una de las propiedades más características de la Riboflavina es su fluorescencia amarillo verdosa en soluciones neutras, que alcanza un máximo a pH 6,7-6,8 y decrece hacia un pH ácido o alcalino, lo que indicaría que la vitamina es anfótera y que la molécula eléctricamente neutra es responsable de la fluorescencia.

Kuhn y Moruzzi (1934) (81) realizan una serie de medidas fluorométricas de soluciones de Riboflavina, con valores graduales de pH y hallan que la fluorescencia es un 50% del máximo a pH 1,7 y a pH 10,2. Con estos datos se calculan las constantes de disociación ácida y básica y el punto isoeléctrico, obteniéndose los siguientes resultados:

$$K_{\text{ácido}}: 63 \times 10^{-12}$$

$$K_{\text{base}}: 0,5 \times 10^{-5}$$

Punto isoeléctrico; pH 6

33

Para las determinaciones emplean luz ultravioleta y confirman la opinión de que en la región de λ óptimo (fluorescencia máxima a 565 μ) la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de vitamina presente. Este concepto resulta sumamente interesante, pues es la base de un método de determinación cuantitativa de Riboflavinina.

Karrer y Fritzsche (1935) (82) estudian las curvas de fluorescencia de Riboflavinina y de flavinas sintéticas, comparándolas con fluoresceína, y hallan los siguientes resultados:

Concentración % $\times 10^{-3}$	Intensidad de fluorescencia.
12	34,8
6	61
3	76,9
2	71,4
1,5	62,7
1,0	52,9

Es decir que la máxima fluorescencia de las soluciones de vitamina B₂ en buffer fosfato, aparece con concentraciones de 0,03%, decreciendo con un aumento o disminución de dicha concentración.

Las medidas de fluorescencia para lumiflavina, dan prácticamente las mismas constantes de disociación ácida y básica, lo que indica que la cadena lateral tiene poca influencia sobre las propiedades eléctricas de la molécula (81)

Según Euler y Adler (1943)(83), las retinas de los ojos de muchos peces, poseen cantidades relativamente altas de flavina, correspondientes a concentraciones muy próximas a aquellas en que se alcanza la máxima fluorescencia. Esto apoya la hipótesis de que las flavinas son particularmente importantes en la púrpura visual, lo que hace al ojo más sensible a la luz difusa.

La actividad óptica de la riboflavina es excesivamente pequeña, en soluciones neutras o ácidas en las cuales existe como un ión cargado positivamente. En soluciones alcalinas no fluorescentes, la *levo*-rotación máxima es observada cuando un mol de vitamina está en presencia de un mol de OHNa . (Kuhn y Rudy, 1935)(84). El valor hallado es de: $\alpha_D^{20} = -114^\circ$ (en NaOH N 0,1).

Karrer y Fritzsche (1935)(85) confirman la dependencia entre la rotación específica y las concentraciones relativas de vitamina y álcali, puesto que habiendo realizado mediciones en solución de NaOH N 0,05, hallan valores diferentes a los obtenidos por Kuhn y Rudy, en tanto que trabajando con solución de NaOH N 0,1 los nuevos valores concuerdan con los anteriores.

Con respecto al potencial de óxido-reducción, se puede decir que el potencial normal de la Riboflavina, referido al

electrodo normal de hidrógeno, está en la región de $-0,21$ Volts (pH 7). Se ha demostrado que este potencial no se ve materialmente afectado por una acetilación o metilación de la molécula, ni por pérdida de la cadena lateral. (Kuhn y Moruzzi, 1934) (86).

Las flavinas representan sistemas de óxido reducción muy estables, únicos y complicados; se dice que la flavina celular está en su posición de equilibrio, bajo el potencial general de reducción anaeróbica de las células vivas. (Stern, 1934) (87).

Tratando Riboflavina con un oxidante adecuado, a pH graduales, aparece a pH menor de 5 un compuesto rojo intermedio citado por primera vez por Kuhn y co. (1934) (88) y que se torna más pronunciado a medida que se acerca a pH 0,4.

Kuhn y Ströbele (1937) (89) establecen que en la conversión de Riboflavina a su leucoderivado, intervienen no menos de tres intermedios distintos de reducción, los que se distinguen por sus coloraciones y su composición definida. Ellos son: Flavina $\longrightarrow$ Verdoflavina $\longrightarrow$ Cloroflavina $\longrightarrow$ Rodoflavina $\longrightarrow$ Leucoflavina.

Todos los compuestos reducidos originan reversiblemente Riboflavina, por agitación con oxígeno en $0.1N$ NaOH, pH 0,1, pue

diendo establecerse el grado de reducción ,determinando manométricamente el oxígeno absorbido.

El espectro de absorción de la Riboflavina ha sido estudiado por Kuhn y col (1933) (23); Kuhn y Rudy (1934) (25) y Kuhn y col (1935).

Se caracteriza por una máxima marcada cerca de los 2200 y 2700 Å y otra máxima menos pronunciada cerca de 3700 y 4500 Å. Holiday y Sterne (1934) (91) establecen que la absorción se debe al núcleo aloxazina. Rudy (1936) (92) comunica que el espectro no se ve marcadamente influido por el pH, siendo el efecto principal, sólo un ligero desplazamiento de las bandas de 3650 y 4450 Å hacia longitudes mayores, debido a un aumento del pH hacia la alcalinidad.

humana, observaciones que apoyan también Koehn y Elvehjem (1936) (102), Sebrell y co. (103) y otros.

En 1938, cuando ya ha sido obtenida la síntesis de la vitamina B₂, Sebrell y Butler (95, 104) pueden producir una deficiencia experimental en el hombre, y como consecuencia de ella describen síntomas, de lo que denominaron ariboflavinosi, caracterizados por manifestaciones orales y de la piel. Fisuras generalmente bilaterales en las comisuras de la boca (estomatitis angular de Stannus); labios anormalmente rojos con un aumento marcado de fisuras verticales; dermatitis seborreica con suave base eritematosa en los pliegues nasolabiales, alas nasales, vestíbulo de la nariz y en las orejas. Un tipo específico de glositis caracterizado por lengua suave, papilas planas, y color purpúreo, no escarlata como sucede en casos de deficiencia de ácido nicotínico.

Estas lesiones que no pueden ser prevenidas ni curadas por tiamina o por ácido nicotínico, ceden rápidamente por acción de Riboflavina.

En 1939, Spies y co. (105) observan en pacientes mal alimentados una lesión ocular, que cede por administración de vitamina B₂. Al mismo tiempo Sydenstricker y co. (106) describen como síntomas de deficiencia riboflavínica, las manifestaciones oculares caracterizadas por ardor y aspe-

reza en los ojos acompañada de suave fotorobia, que a veces se torna severa; visión nublada y ceguera parcial.

Estos autores realizan las primeras observaciones con la tras-iluminación y describen lo siguiente:

"Proliferación marcada y engrosamiento del plexo límbico, con formación de gran número de rizados capilares muy estrechos, que circundan el margen extremo de las digitaciones de la esclerótica y obliteran la zona avascular estrecha entre el plexo y la unión esclerocorneal. Estos capilares yacen debajo del epitelio y se anastomosan rápidamente para formar una hilera de rizados, de la cual surgen capilares simples que se extienden centripetamente."

Bessey y Wolbach en 1939, también describen síntomas de vascularización corneal en ratas, sometidas a ariboflavinosis experimental. En 1943, Tisdall, Mc Creary y Pearce comunican que una vascularización corneal extensa entre miembros de la Royal Canadian Air Force, cede por administración de vitamina B₂; estos autores fotografían la unión esclero corneal con cámara oftálmica y admiten que sus resultados no difieren mucho de la examinación con tras-iluminación (107).

Estudios posteriores tratando de reproducir los ensayos de Sebrell y Butler no dan los resultados esperados, pues no se observan signos dermatológicos definidos a pe-

sar de que la excreción urinaria se reduce a niveles mínimos. Debido a esto Hibbs y co(1951)(94) hacen una revisión de las distintas dietas y circunstancias bajo las cuales se han llevado a cabo los diversos ensayos, y sugieren que en ellos están incluidas otras deficiencias vitamínicas y de aminoácidos. Según Hibbs y co. una deficiencia pura de Riborriavina puede tener otra sintomatología y hasta puede no existir como entidad clínica. Para comprobar su hipótesis realizan ensayos tratando de emplear una dieta completa adecuada y mantener a todas las personas sujetas a la experimentación, en igualdad de condiciones ambientales. Estudian especialmente modificaciones de la piel, lengua, ojos, lecho capilar, sistema nervioso periférico y valores bioquímicos de sangre y orina.

Los resultados obtenidos son: estomatitis angular periódica, dermatitis seborreica y lesiones de la piel de escroto. En ratas, retardo de la curación de heridas. No se observa evidencia de inyección circuncorneal o vascularización de córnea; no hay signos de glositis o lengua magenta. No hay indicios de diskinesia capilar, sugerido por Stannus como un cambio patológico fundamental de hiporiboflavinosis. Tampoco aparecen anomalías neurológicas.

Como corolario de sus observaciones admiten que: existiendo muchos casos de estomatitis angular, vascularización de córnea y dermatitis de escroto que no se deben a

falta de vitamina B₂, puede suponerse que en algunos casos ciertas anomalías dermatológicas tienen predilección por personas con hiporiboflavinosis o bien, como su gieren Stern y Landan(108) la keratitis es producida por ariboflavinosis, pero existe en los individuos una disposición constitucional(alérgicos).

Por otra parte, se sabe que la Riboflavina es necesaria para el crecimiento; dado que cualquier trauma local debe ser reemplazado por un crecimiento nuevo, faltando la vitamina este crecimiento no se realiza, de modo que esos desórdenes locales de la capa dérmica pueden depender de la existencia de irritaciones locales, infecciones, u otros traumas, que no pueden mejorarse, precisamente, por la carencia de Riboflavina.

Es muy interesante, también, la relación que puede existir entre Riboflavina y cáncer.

Varios autores(109,110) establecen la acción protectora de vitamina B₂ contra los hepatomas provocados por la administración oral de p-dimetil amino azobenceno; sin embargo existe poca evidencia de que la Riboflavina también tenga la misma acción contra otros tipos de tumores animales, y más bien se cree lo contrario. En efecto, Norris y Robertson estudian la acción de dietas deficientes en B₂ sobre el crecimiento y aparición de tumores mamarios espontáneos en ratones adultos y encuentran que la velocidad de creci-

miento de los tumores se ve retardada por una dieta deficiente. Otra observación, tal vez más importante es que tumores altos de Riboflavina causan después de cuatro semanas, un promedio anormalmente alto de tumores espontáneos en ratones adultos; pero al mismo tiempo, los ratones viven considerablemente más, lo que indica que la resistencia de los animales a los efectos de los tumores, se ve de algún modo, considerablemente aumentada por la presencia de vitamina B₂.

Dado que el metabolismo del tejido del tumor se caracteriza parcialmente, por una alta flicolisis aerobia y an aerobia, y puesto que algunas enzimas flavoproteicas actúan como transportadores de hidrógeno y electrones al oxígeno molecular, se formula la sugestión de que el exceso de Riboflavina puede ser capaz de desviar el metabolismo de los tejidos cancerosos hacia un tipo de oxidación más normal. Esta hipótesis, aunque muy atrayente, no está aún confirmada.

ABSORCION, FIJACION y ELIMINACION de RIBOFLAVINA

Una vez que la Riboflavina ingresa al organismo, para que adquiera propiedades vitamínicas es necesario que sufra un proceso de fosforilación. Este tiene lugar en la pared intestinal, según Rudy, pudiendo obtenerse fosforilaciones in vitro con preparados de mucosa intestinal en presencia de fosfatos (Mübner-Verzar) (28)

Laszt y Verzar, creen que la hormona adrenal cortical es esencial para que se realice la fosforilación, pero otros investigadores demuestran que ella también puede ser normal después de practicada la adrenalectomía. (111, 112).

Según Klein y Kohn, (1940) (113), la fosforilación ocurre probablemente en el hígado y las células de la sangre son capaces de sintetizar tanto el fosfato de Riboflavina, como el dinucleótido flavin-adenina-fosfórico.

Después de su absorción en la célula animal, el fosfato de Riboflavina se fija a un grupo proteico y se acumula en los órganos en forma de fermento amarillo (Theorell y co)

Cuando la vitamina se administra por vía venosa, luego de una acumulación transitoria en el hígado, se elimina por

bilis, pasando al duodeno, donde se reabsorbe la mayor parte, solamente una pequeña porción se absorbe en las células de Kupfer, después de fijarse a la proteína (114).

Cuando se administra por vía oral, se fija al grupo proteico en el retículo endotelio de la pared intestinal, eliminándose sólo una pequeña parte por la bilis.

Casos de deficiencia de vitamina B₂ provocan una mayor acumulación de Riboflavina en hígado (115) lo que también se observa durante la digestión y asimilación, siendo la vitamina movilizada desde otros tejidos. (116)

En general, el contenido de los órganos en Riboflavina depende relativamente poco de la cantidad administrada. Según Kuhn y co., aportando cantidades diez veces mayores que lo normal, no se observa casi aumento del valor corriente en hígado, lo que se debe a que la cantidad disponible de proteína a la cual se fija, limita la capacidad acumuladora del órgano.

Por otra parte, la concentración de Riboflavina en los tejidos disminuye sólo ligeramente, aún en estados de carencia prolongada y según Kuhn y co., la muerte sobreviene aún cuando existen cantidades grandes de vitamina en el organismo. (127).

La eliminación de Riboflavina se realiza por la orina y heces en forma libre, según Vivanco. En el adulto la

cantidad eliminada por las heces es el doble de la eliminada por orina; pero en el instante las heces están prácticamente libres de vitamina.

Según Kemerle(1936)(117) la cantidad eliminada por orina es de 819-1250 μ g. diarias. Strong(1941)(118) calcula de 500 a 800 μ g. por día para una dieta normal, y de 50 a 150 μ g. para un ingreso de 1-2 mg. diarios.

Varios factores influyen sobre la excreción urinaria. Kopy co.(1943)(119) comunican que en hombres, la administración de grandes dosis de vitamina B₁ aumenta su excreción; en ratas en cambio, una deficiencia crónica de tiamina provoca una mayor eliminación. Un mayor ingreso proteico disminuye la excreción(128). El hipertiroidismo experimental en ratas albino adultas, provoca la eliminación de grandes cantidades de Riboflavina(120), lo que se cree puede deberse al catabolismo de los tejidos del organismo, ya que este estado va acompañado de grandes pérdidas de peso.

Estudios de la excreción renal diaria en pacientes que han sufrido fracturas y quemaduras y a los cuales se les administra 5 mg. diarios de vitamina, muestran un fenómeno característico de retención, notable durante los primeros tres a cinco días, y seguido por un período de igual duración en el cual aumenta la pérdida de Riboflavina, nar

realizándose el balance recién a los diez días. (121)

En enfermos con infecciones agudas y enfermedades crónicas varias, también se observa que la cantidad excretada es mayor que en los controles sanos. (Cayer y Co-ay, 1948) (122).

La Riboflavina es también excretada por el sudor, aunque en cantidades muy pequeñas, estimadas en 5-120 γ /l y 10 γ /hora (123, 124, 125).

Bargent y Robinson (1944) (126) opinan en cambio que no existe Riboflavina libre en sudor.

NECESIDADES DIARIAS

Se calculan de varias formas:

- 1) Por el análisis de dietas normales.
- 2) Por la cantidad ingerida por sujetos que sufren de ariboflavinosis o hiporiboflavinosis.
- 3) Por ensayo con dietas experimentales.
- 4) Por estudios de excreción de riboflavina.

En 1937, Stiebeling(129) calcula las siguientes cifras empleando el primer método:

Niños menores de 6 años	1 mg.
Niñas menores de 7 años	
Niños de 7-10 años	1,2 mg.
Niñas de 8-13 años	
Jóvenes y adultos	1,32 "

En el mismo año Rose estima que las necesidades para niños de hasta 10 años son 0,38 mg., y para adultos 1,1mg. por 2500 calorías.(29)

Algunos investigadores observan síntomas de deficiencia en personas que reciben de 0,3-0,5mg. diarios de vitamina y otros no descubren ningún signo con dietas de 0,47

mg.(130).

Por estudios de excreción, *Samerie*(1939)(117) considera que el ingreso diario debe ser de 2-3 mg. y *Strong* (1941)(131) da de 1-2 mg. como cifra mínima y de 2-5 como óptima.

Macrae y co (1944)(132) no observan signos de arriboflavinosis en personas con un ingreso diario de 1,5-2,6mg.y por lo tanto consideran que las necesidades no exceden los 2 mg.

También en 1944, trabajos de *Najjar*, *Holt* y co., sobre la biosíntesis de Riboflavina en el intestino humano, hacen creer que la vitamina no fuera esencial en la dieta(133).

En 1946, *Levenson*, *Green* y *Taylor*(121) consideran que en casos de heridas graves, hemorragias e infecciones clínicas agudas, pueden ser de mucha utilidad grandes dosis de Riboflavina; participan de esta opinión *Cayer* y *Cody* (1948) quienes creen que también resulta ventajoso su empleo en caso de enfermedades crónicas, donde las reservas se liberan, tal vez incidentalmente, o tal vez como un mecanismo de protección por la fiebre y por un aumento de metabolismo y destrucción celular.

En 1951, *Hibbs* y co(94) basándose en la correlación entre excreción urinaria, dieta diaria y síntomas de arriboflavinosis, establecen la cantidad de 1,1-1,6mg. como re-

querimiento diario para un adulto masculino que subsiste con 2200 calorías. Según sus investigaciones, un sujeto desprovisto de vitamina, puede asimilar 6 mg. de una vez, siendo necesarios 15 días para saturar un organismo en esas condiciones y con ese nivel de ingreso.

Yountans (1951) (134, 135) sugiere un ingreso de 5-10 mg diarios para el tratamiento de pacientes con débil grado de ariboflavinosis.

Everson, Pearson y Matteson (136) comentan que la falta de digestibilidad total de ciertos alimentos puede reducir la disponibilidad de vitamina.

Cualquiera sea en realidad la dosis mínima necesaria se deduce que ella varía según el sexo, edad, actividad física e ingreso calórico; debiendo ella ser aumentada durante el embarazo, lactancia y fiebre.

ACTIVIDAD VITAMÍNICA Y ESTRUCTURA

Es muy interesante señalar la relación que existe entre la actividad vitamínica de la Riboflavina y su estructura molecular; pues es muy limitada la alteración molecular que resulta compatible con dicha actividad. (137)

En tanto que el núcleo cromóforo tricíclico es común a todas las flavinas, la acción vitamínica se relaciona con la clase y posición de los sustituyentes del anillo bencénico y la naturaleza de la cadena glucídica unida al átomo de N en posición 9.

Las siguientes flavinas tienen acción vitamínica limitada, además de la Riboflavina:

6,7-dimetil-9-(1-l'-arabitol)isoaloxazina. (138)

7-monometil-9-(d-l'-ribitol)isoaloxazina.

6-monometil-9-(d-l'-ribitol)isoaloxazina.

6-etil-7-metil-9-(d-l'-ribitol)isoaloxazina. (139)

Es esencial la presencia de un grupo metilo, por lo menos, en posición 6 ó 7 para que se mantenga la actividad vitamínica.

La ausencia de grupos metilo, parece estar acompañada de toxicidad. (140).

En cuanto a la cadena glucídica, los residuos d-ribosa ó d-arabinosa son los únicos compatibles con la acción vitamínica.

METODOS GENERALES
de
PREPARACION

2.-Métodos generales de preparación.

La obtención de Riboflavina, puede lograrse por tres vías distintas:

- 1.-Aislamiento de productos naturales.
- 2.-Síntesis orgánica.
- 3.-Métodos biológicos.

Las dos últimas posibilidades son las que actualmente resultan más interesantes del punto de vista comercial puesto que ellas se relacionan directamente con los dos grandes usos a que se destina esta vitamina: inclusión en regímenes humanos y alimentación animal.

En efecto, el producto sintético, con un óptimo grado de pureza, se emplea en el enriquecimiento de algunos alimentos como pan y harina, y también en diversas formas farmacéuticas como elixires, tabletas, cápsulas y en general toda clase de preparaciones polivitamínicas, cuya demanda aumenta día a día, a medida que con el perfeccionamiento de los métodos de síntesis, se consigue disminuir el costo del producto.

En cambio, el obtenido por fermentación, se destina más generalmente a la alimentación de animales, con lo que se logra una gran mejora de los mismos, acompañada de una re-

ducción en su costo. Esto redundará en beneficio de la alimentación humana, puesto que el hombre ha de seguir prefiriendo para su subsistencia las fuentes naturales que resultan gratas al paladar, por sobre los productos sintéticos que no lo son.

No se requiere en este caso, que el producto obtenido por fermentación se presente en un estado de máxima pureza y así se emplean concentrados de levaduras o de fermentaciones varias y residuos de fermentación anaeróbica de butanol.

En los últimos años, sin embargo, las investigaciones se han orientado hacia la obtención de la vitamina como producto principal de fermentación, y existiendo organismos que son capaces de producirla en cantidades hasta ahora insospechadas, y sobre substratos económicos, la elaboración por vía biológica se ha visto muy intensificada.

Aislamiento de productos naturales

La Riboflavina ha sido aislada de una gran cantidad de productos naturales: vegetales y animales. Entre ellos tenemos: blanco de huevo (21); hígado (141); orina (142); malta (143); amarillo de huevo (144); flores de "diente de león" (145); retinas de ojos de pescado (83); leche (24); pasto (146).

El aislamiento de una vitamina a partir de una sustancia natural, es esencialmente un problema químico caracterizado por encontrarse la sustancia buscada en cantidades pequeñísimas, lo que hace necesaria una concentración previa de los productos naturales, y una serie de ensayos a lo largo de todo el aislamiento, para establecer en qué momento se produce pérdida de vitamina, durante el fraccionamiento. Por ej.: Kuhn y co. obtuvieron 100 mg. de vitamina B₂ a partir de 100 Kg. de albúmina de huevo seca, correspondiente a 33.000 huevos; y 1g. de vitamina B₂ a partir de 5.400 litros de leche.

El problema del aislamiento de la Riboflavina ha sido considerado por distintos investigadores, por lo tanto, los métodos difieren en detalles; pero no obstante, existen caracteres generales que pueden resumirse así:

1.- Extracción del material con soluciones acuosas ácidas; con mezclas hidroalcohólicas o con acetona.

- 2.-Adsorción de la vitamina en solución ácida por tierra de Fuller(147),(148) ó por sulfuro de plomo;en solución neutra por Franconita o por Carbón(149); ó por Florisil (150).
- 3.-Elución del adsorbato por medio de solventes básicos como:piridina,metanol-agua(19,21,22,23,151,152);amoníaco; soluciones cáusticas;trietanolamina;solventes orgánicos neutros como acetona 80%;y también metanol-HCl(149) y fenol líquido(153)
- 4.-Eliminación del solvente del eluato con recuperación y concentración de la flavina en agua o en solución alcohólica,seguida de eliminación de las impurezas insolubles enacetona.
- 5.-Precipitación y cristalización como sal de un metal pesado(Ag ó Ta) poco solubles y fácilmente cristalizables.
- 6.-Recuperación de la flavina libre de metal,seguida por recristalización de agua,alcoholacuoso ó soluciones ácidas diluídas(ácido acético).

Síntesis orgánica.

El estudio de los productos de descomposición, que condujo al establecimiento de la fórmula de la Riboflavina, permite a Kuhn(1935) demostrar su relación con los derivados de isoaloxazina y dar métodos para su síntesis(154). Esta la realiza condensando nitroxilidina con d-ribosa, lo que da origen a la correspondiente base de Schiff; luego por reducción catalítica, el radical ribitilo queda unido al N y el grupo nitro se transforma en amino, es decir se tiene una orto diamina, que se condensa con aloxano en forma lactónica, para obtener Riboflavina.

La reacción puede formularse así:

talíticamente para obtener la diamina. El rendimiento máximo es de 4,5% en base a la ribosa empleada.

3.-Karrer, Schöpp y col (1935)(159) condensan N-mono-acil o.fenilen diaminas con el glúcido correspondiente para obtener la base de Schiff que se reduce luego a N-(o.acil amino fenil)ribamina. Este compuesto se condensa directamente en solución ácida con aloxana, saponificándose automáticamente los grupos acilo, durante la reacción. Es un método para proteger temporariamente un grupo amino. Los rendimientos son muy bajos.

4.-Karrer y col (1935)(160) protegen un grupo amino por medio de la introducción de un grupo carboxi. El rendimiento es de un 14-15% de la ribosa empleada.

Por su bajo rendimiento, todos estos métodos no reportan ninguna ventaja sobre los mencionados anteriormente.

En general puede decirse que los intermediarios para la síntesis son bastante asequibles, pues la aloxana puede obtenerse por oxidación del ácido úrico o barbitúrico, y el o.xileno a partir del cual se obtiene la nitroxilidina, como sub-producto en la industria del petróleo. Pero el obstáculo principal lo constituyen las limitadas fuentes de obtención de ribosa. Este glúcido es obtenido por Kuhn y

Karrer a partir del d-gluconato de calcio. Kuhn lo somete a una degradación con agua oxigenada y sulfato férrico, en presencia de acetato de bario, y obtiene a partir de 2Kg. unos 520 g de d-arabinosa pura, de la cual 50g. originan 53 g. de d-ribosa.

Según otros autores, también puede obtenerse por hidrólisis del ácido nucleínico de la levadura, o a partir de d-glucosa por ácido glucónico, d-arabinosa, ácido d-arabónico y d-ribónico. Es un proceso que resulta siempre muy costoso.

Otros investigadores han introducido, más recientemente, algunas mejoras en el método sintético.

Tishler y col. (1945) (161) hacen reaccionar derivados de o.fenilendiamina con ácido barbitúrico halogenado. Por ej. 4,5-dimetil-N-d-ribitil-o.fenilendiamina con ácido 5,5 dicloro barbitúrico. La condensación se realiza en piridina con un rendimiento del 85%.

En 1947, Tishler y Wellman, presentan una patente para obtener Riboflavina por un procedimiento similar al anterior (162). En el mismo año estudian la obtención de la vitamina por reacción entre un o.amino azo compuesto apropiado y ácido barbitúrico. (163)

En la fórmula, cuando el grupo Ar es p.nitro fenil y R corresponde a d-ribitil. el rendimiento en vit. B₂ es del 65,8%.

La síntesis de Tishler evita la preparación de d-ribosa, no necesita la reducción de un diazo compuesto y emplea el ácido barbitúrico en lugar de aloxana, todo lo cual redonda en un proceso comercial más práctico y apto para la producción continua de vitamina.

Flexser y Farkas (1948) (164), citan mayores rendimientos de isaloxazinas, cuando la condensación de la o.diamina o sus sales se lleva a cabo en presencia de aloxana y aloxantina.

Los mismos autores en 1949 (165) comunican la condensación de aminas aromáticas N-alifáticas sustituidas con un ácido violúrico para obtener isaloxazinas en un solo paso.

En la fórmula R puede corresponder a un radical alkilo: polihidroxialkilo (ribitil); y X, Y, Z puede ser un O; S; NH o N-C-N. la condensación se realiza en presencia de un sol-

vente, preferentemente agua.

Berezorskii, Kurdyukova (1950) (100) describen una síntesis modificada de Riboflavina. Hacen reaccionar 3,4-xilidina con d-arabinosa y luego de hidrogenar obtienen 3,4-dimetil-fenil-d-ribanina (R:13%). Este producto lo transforman luego en 1-(d-ribitol amino-6-fenilazo-3,4-dimetil beneno (R:80%) y luego en Riboflavina pura (71%) por reacciones apropiadas y posterior purificación.

propagación;pero liberando al medio cantidades variables.

La distinta naturaleza de las melazas influye sobre el desarrollo de las levaduras,concediendo a algunas una evidente superioridad sobre otras;sin haberse determinado claramente si esa diferencia se debe a condiciones climáticas,métodos de fabricación,diversidad de composición o presencia de sustancias tóxicas.(Argawal,Singh y co.,1947)(167).

En muchos casos es necesario agregar otros nutrientes al medio para obtener resultados más favorables.

Según Pett(1935)(163) el contenido en Riboflavina de Saccharomyces cerevisiae puede elevarse,cultivándola en presencia de compuestos como cianuro de potasio,cisteína y piridina,que afectan la actividad de catalizadores conteniendo Fe.

Este investigador observa posteriormente,que las condiciones aeróbicas disminuyen el contenido de vitamina en las células de la levadura,hecho que también es sostenido por Singh y co.,quienes encuentran que las células desarrolladas sin aereación o agitación,contienen unas 100 γ de Riboflavina por gramo,en tanto que las asreadas sólo contienen de 60-65 γ/g.

Hopkins y Wiener(1945)(169)comprueban que la levadu-

ra de cerveza sintetiza vitamina B₂ durante el crecimiento y la fermentación, y pueden así encontrarse en la cerveza cantidades que varían de cero al doble de lo que se encuentra en el mosto, sin que se sepa a qué atribuir esas variaciones.

Tullo y Stringer(1945)(170) siguiendo el nivel de vitamina presente en las distintas etapas de fabricación de la cerveza, encuentran un aumento de 100% durante fermentación alta.

Según Thaysen(1943)(171), Torula utilis, var. termophyla, resulta una levadura muy apropiada para la producción de concentrado vitamínico. Posee las siguientes características: crece a altas temperaturas, lo que en el empleo de mezclas de caña ahorra operaciones costosas de enfriamiento y tiene un tamaño adecuado para separarla fácilmente del sustrato.

Una vez desarrollada la levadura se lava cuidadosamente con agua en separadores especiales y la suspensión resultante se pasa sobre secadores, de donde sale como el concentrado proteína-vitamínico final, en forma de copos livianos, color paja, de gusto agradable.

También puede emplearse un proceso de desecación por "spray", como lo indica la patente de Lewis(1935) y otra

similar (1938) pues esta técnica no altera el valor alimenticio de los materiales (172).

El rendimiento del concentrado de Torula utilis es de 60% con respecto al azúcar usado. Su contenido en Riboflavina es de 80-85 γ /g y posee también vitamina B₁ y ácido nicotínico en cantidades apreciables.

El Fe influye sobre la síntesis de vitamina B₂ por Torula utilis; pero menos marcadamente que sobre otros organismos. Lewis (1944) (173) encuentra que las células desarrolladas en un medio sintético en ausencia de Fe poseen un contenido vitamínico más alto que los que crecen en presencia del metal.

Wiley (1950) (174) realiza ensayos comparando el contenido vitamínico B₂ y establece que varía marcadamente con los distintos sustratos, aunque los datos no resultan suficientes para determinar qué afecta más: si el sustrato, la cepa o el método empleado. En general se obtiene un valor promedio del producto comercial que alcanza a 44,9 γ /g.

El mismo autor (1951) (175) hace crecer Torula utilis en licor sulfuroso, (a), en fermentador de 20.000 galones y sugiere que algunas variedades de levaduras pueden ser más adaptables al medio que otras, que no tolerarían el sulfito.

a) Solución residual de la fabricación de papel por el procedimiento del bisulfito, que contiene derivados de celulosa.

Pattie(176) y Voss(177) patentan el empleo del residuo de destilación de la fermentación alcohólica como sustrato para *Torula utilis*.

Otros autores citan resultados obtenidos con diferentes levaduras:

Leonian y Lilly(1942)(178) consiguen que por acostumbramiento, una levadura desarrollada en un medio sintético sin agregado de ninguna vitamina, sea capaz de sintetizar Riboflavina y otros miembros del complejo B.

Burkholder(1943)(179) cita que una levadura de la colección Yale produce grandes cantidades de Riboflavina en un medio sintético, anotando un rendimiento máximo de 60 por litro.

Rogosa(1943)(180) comunica que todos los cultivos de levadura que fermentan lactosa crecen en diversos medios tanto en ausencia como en presencia de Riboflavina, lo que es índice de que ellas son capaces de sintetizarla.

Kasahara y Ganno(1943)(180) encuentran las siguientes cifras del contenido en Riboflavina de distintas levaduras

<u>Torula</u>	<u>luteola</u>	<u>Salto</u>		8,58	γ/g.
"	<u>minuta</u>	"		11,00	γ"
"	<u>aurea</u>			3,57	γ"
"	<u>flava</u>			15,40	γ"
<u>Torulopsis</u>	<u>nadaensis</u>			15,00	γ"

Schulz y Kernwe(1943)(182) estudian el contenido vita-

mínico B₂ de levaduras Kefir de fermentación de suero y consignan datos de 0-1mg. de vitamina B₂ por 100 g. de levadura seca.

Otra ruta que condujo a la producción de Riboflavina en un esfuerzo para resolver el problema de utilización de residuos, arranca de la industria de fermentación butanólica.

Las melazas de destilación constituyeron siempre un serio problema en la operación industrial pues no conociéndose en ellas otro valor que el que podían tener como fertilizantes, se consideraba más económico desecharlas, ya que en ese aspecto no podían competir con productos de menos costo en el mercado.

Cuando se comprobó su valor vitamínico pudo prepararse concentrados ricos en Riboflavina, y estos productos aún se encuentran en el mercado como suplemento para la alimentación de ganado.

En las investigaciones posteriores se interesaron los grandes productores de alcohol.

Yamasaki(1939)(183) comunica que las bacterias de fermentación acetobutílica producen sobre un sustrato de arroz, en condiciones definidas, un pigmento amarillo de fluorescencia verde.

En 1940(184), publica un método para aislar ese pigmento, estableciendo su identidad con Riboflavina.

Miner(1940)(185) solicita una patente para el empleo de melazas y otras materias primas.

Yamasaki(1941)(186) llama la atención acerca del hecho de que el Fe fuera un veneno específico para el proceso.

Una patente del mismo autor(1942)(187) se refiere a la fermentación de distintos sustratos(agua de levadura, suero, productos amiláceos) por bacterias de la especie Clostridium acetobutylicum(Weizzmann) agregando al medio de 0,5-2% de carbonato o acetato de calcio, entre las 0 y 7 hs. siguientes a la siembra y manteniendo a 37° durante 48-72 hs.

Azberger (1943)(188) patenta un proceso para prevenir la acción perjudicial del Fe por purificación previa del sustrato y trabajo en tanques de Aluminio.

Legg y Beesch(1945)(189) preconizan la adición de radical sulfito para aumentar el rendimiento en vitamina B₂ de la fermentación de sustratos de trigo con Clostridium acetobutylicum. La sal más efectiva resulta el sulfito de sodio, empleado en concentraciones de 0,014 a 0,03% y agregado un poco antes de las 24hs. de iniciada la fermentación.

Mines(1945)(190) y McMillan(191) patentan procesos de

recuperación de Riboflavina, consistentes en su reducción previa a leuco derivado por acción de un agente químico.

Posteriormente Hines(192) solicita otra patente en la que describe un método interesante para reducir la flavina en el cultivo fermentado, empleando Streptococo zinogeno. El licor sobrenadante después de reducción y filtración contiene solamente 28 γ/cc.

Dale(1944)(55) presenta una serie de solventes adecuados para recuperar la vitamina de adsorbentes inorgánicos.

Walton(1945) comunica que el agregado de arroz sin pulir, a un sustrato de granos sometidos a fermentación con Clostridium acetobutylicum, provoca un aumento considerable en el rendimiento vitamínico.

Keresztesy(1944)(194) patenta un método de extracción de Riboflavina a partir del medio de fermentación por medio de butanol, precipitándola luego del extracto butanólico, por agregado de éter de petróleo.

Leviton(195) presenta una teoría para explicar la influencia de las sales ferrosas sobre el menor rendimiento de Riboflavina por Clostridium acetobutylicum. Sugiere que la destrucción de la vitamina se produce por un mecanismo de peróxido y por lo tanto se consigue

un aumento de rendimiento empleando hidrosulfito de sodio y trazas de catalasa cristalina.

Pollard y Rogers(1945)(196) patentan un aumento del contenido en riboflavina de suero o leche desnatada, por medio de una fermentación controlada de Clostridium acetobutylicum. Se controla cuidadosamente el pH y el contenido de hierro. Un agregado de xylosa de 0,1-2% provoca un aumento de la producción de vitamina.

También se presentan otras patentes para obtener mejores rendimientos. Pollard, Rodgers y Meade(1948)(197) citan así cantidades de 64-68 γ /ml. Dan detalles del proceso y llaman la atención sobre la acción de sales de amonio, magnesio y manganeso, así como condiciones de esterilización y desarrollo del cultivo.

Katagiri(1951)(198) estudia la producción de riboflavina por bacterias acetobutílicas sobre un medio conteniendo 0,5% de peptona y 1% de salvado de arroz y hace resaltar la importancia de la fitina en el arroz y de arginina y asparagina en la peptona.

Cita rendimientos de 150-170 γ /cc en un medio sintético en el cual hay siete factores esenciales: ácido fólico, ácido pantoténico, P.A.B.A, piridoxina, niacina, biotina y ácido fólico.

Por radiación de una cepa obtiene una mutante que produce mayor cantidad de Riboflavina.

En la búsqueda de organismos que produjeran la vitamina B₂ como producto principal y no lateral de una fermentación, Burkholder describe en 1943(199) una especie interesante de levadura, Candida Guilliermondia, capaz de síntesis en cantidades notables.

En un medio compuesto de glucosa:2%; sulfato de amonio:0,2%; y otras sales inorgánicas, se obtienen rendimientos de 40 γ/ml., con un aumento de un 50% por agregado de algunos aminoácidos. Así cita valores de 75 γ/ml cuando emplea asparagina y de 60 γ/ml cuando se trata de glicina (200).

Tanner y col (1945)(201) confirman estos resultados, pero comentan una considerable variación en la capacidad de síntesis bajo condiciones aparentemente idénticas. La explicación de este comportamiento, se halla en la influencia del Fe, que resulta el factor más importante. Este organismo también es susceptible a la inhibición por el Fe. Reduciendo la concentración de este ión a valores de 50 γ/l se obtienen rendimientos que alcanzan a 157 γ/ml. con Candida Guilliermondia y a 216 γ/ml. con Candida flareri.

Posteriormente, Levine(1949)(202) comunica que traba-

jando en ausencia de Fe es posible obtener rendimientos mayores, aún en ausencia de asparagina o de glúcina, que eran empleadas por los investigadores anteriormente citados, para suplementar la fuente nitrogenada, ya fuera ella urea ó sulfato de amonio.

Obtienen en planta piloto, cifras de 113 γ /ml. con Candida guilliermondia y 325 γ /ml. con Candida flareri, en medios de bajo costo y no esterilizados.

Mc Clay (1951)(203) cita otro organismo relacionado: Mycocandida riboflavina, como productor de la vitamina. Obtiene un rendimiento de 850 de Riboflavina por gramo de producto sólido desecado. Recomienda aislar previamente, un cultivo activo del organismo.

Los hongos, también son objeto de estudio, para observar sus posibilidades flavinogénicas:

Carpenter y Friedlander(1942)(204) citan que en 1935 Willstätt, extrajo Riboflavina de Lactarius deliciosus, un hongo comestible común.

Kitavin(1940)(205) publica un trabajo según el cual obtiene vitamina B₂ envenenando un cultivo de Aspergillus niger con Cl₂Hg en concentración de 20 mg%. El autor postula que el bicloruro provoca un disturbio en el hongo, que lo lleva a sintetizar la vitamina.

Seguindo esta técnica, Carpenter y Friedlander, encuentran que otras especies de hongos superiores también producen la vitamina, entre ellos: Agaricus campestris, Pezzia badia, ciertas especies de Aspergillus glaucus, algunas especies de Penicillium y otras de Fusaria.

En algunos casos no se necesita agregar sales de mercurio a los cultivos para que produzcan Riboflavina, de modo que deducen que su producción, lo mismo que la de otras vitaminas, sea una función normal del hongo.

Pontovich(1943)(206) comenta la presencia de 2,2-2,5 mg./g. de Riboflavina en el micelio seco de Aspergillus flavus y recomienda su empleo en forma de tabletas como fuente de vitamina.

Tanner(1945)(207) determina la cantidad de Riboflavina presente en la fermentación sumergida de Penicillium chrisogenum y halla un valor máximo de 1,36mg.

Peltier y Boohers(1947)(208) estudian la capacidad de síntesis de 240 hongos aislados recientemente del suelo, de residuos de cosecha, etc. y cultivados sobre sustratos de salvado de trigo. Todos los hongos aislados resultan activos, consignándose resultados superiores a 2 mg./100 g. de sustrato en 45 cultivos, y correspondiendo los mayores rendimientos a organismos del género Fusa-

actualmente, los organismos más empleados para la producción de riboflavina son dos Ascomicetas: Cremothecium ashbyii y Ashbya gossypii, ambos patógenos para las plantas; pero capaces de sintetizar la vitamina en cantidades muy superiores a las consignadas hasta ahora, por lo que proveen excelentes posibilidades para su empleo en escala industrial.

CREMOTHECIUM ASHBYI (Guill.) Routien

Routien, J. B. Mycologia 41, 183 (1949)

Cremothecium ashbyii Guilliermond C. r. Acad. Sci. 200, 153 (1935)

Cremothecium gen. nov.

Hyphis dichotome ramosis; cellulis fertilis truncato-ellipsoidalis, saepius catenatis sed interdum singularibus; pariete asci deliquescente; ascosporis saepius 8-16 inasco quoque, sed interdum paucis vel multis, irregulariter dispersis vel in fasciculis indefinitivis, clavato-acicularis, rectis vel saepe curvulis, continuis, una parte sporae vacua et fastigiata; ex sporis germinantibus oritur mycelium primigenium.

C. ashbyi (Guill.) comb. nov.

Mycelio postremo latente; hyphis 2,7-5,5 μ latis; ascis 63-87 x 14-16 μ ; sporis 29-31,8 x 2-2,8 μ . Parasito in capsulis gossypii in Sudan.

Cremothecium gen. nov.

Hifas ramificadas dicotómicamente; células esporógenas truncado elipsoidales, por lo general en cadenas más o menos solitarias; la pared de los ascos deliquescente; esporas de 8-16 en cada asco, a veces más o menos, dispuestos irregularmente o en racimos indefinidos, clavado-acicularés, derechos o curvos, simples, una parte libre de contenido, piramidal terminado en punta; germinación de esporas para producir micelio primario.

Crebrothecium ashbyi (Guill.) Bontien.

Micelio volviéndose amarillo; hifas 2,7-5,5 μ de ancho; células esporógenas 68-87 x 14-16 μ ; esporos 29-31,8 x 2-2,8 μ .

Parásito en cápsulas de algodón en Sudan.

Guilliermond describe en 1935 (2104) un hongo nuevo, Crebrothecium ashbyi, parásito de las cápsulas de algodón, aislado en Sudan por el fitopatólogo inglés Massey y cuyo estudio le es confiado por H. Ashby.

El micelio presenta el aspecto del de un Ficoniceta, crece por dicotomía y está desprovisto de tabiques; forma semitabiques que obstruyen de tanto en tanto los filamentos, dividiéndolos en segmentos plurinucleados desiguales. La sustancia que forma los semitabiques es refringente, no se colorea por el rojo de rutenio, ni por la hematoxilina; pero da un tono azul característico tratado con azul de algodón siempre que la solución colorante tenga ácido acético. En las partes del micelio donde se detiene el crecimiento, se ve aparecer un pigmento amarillo que se encuentra en solución en las vacuolas y que puede cristalizar frecuentemente en forma de agujas reunidas en haces ó al estado de esferocristales.

La reproducción se efectúa por esporangios, que aparecen en gran cantidad al cabo de 48 hs., bajo forma de pequeños glóbulos fusiformes, dispuestos en hileras en la región subterminal de los filamentos y sobre todo en las regiones intercalares. Los glóbulos encierran generalmente de 2 a 4 nudos, estos se delimitan más tarde por tabiques transversales

que luego engrosan hasta tener 65,2 a 87,5 u de longitud por 14-15 u de ancho, mientras que sus nudos sufren mitosis que parecen efectuarse por el mismo procedimiento que tiene lugar en el caso de los Ascomicetas superiores. La maduración de los esporangios se efectúa de un modo muy irregular en una misma fila, y siendo que en general los engrosamientos esporíferos aparecen en las partes más antiguas de los filamentos, no son siempre los que se desarrollan primero los que forman sus esporos. Estos esporos ocupan todo el volumen de los esporangios, dispuestos sin orden determinado, entrelazándose unos con otros, lo que hace muy difícil la tarea de contarlos en forma precisa. Su número varía de 4 a 32, tal vez existan también esporangios con más de 32 esporos y excepcionalmente algunos poseen sólo 1 ó 2; pero este es el caso de esporangios mal desarrollados.

La forma y disposición de los esporos distingue a Erethothecium ashbyi de Ashbya gossypii. Tienen una longitud de 29 a 31,8u y un grosor de 2 a 2,77u. Son más cortos y gruesos que los esporos de Ashbya. Tienen una extremidad terminada en una punta aguda muy arqueada, sin contenido y otra redondeada o tallada a bisel. En la extremidad aguda existe una saliente muy ligera de la membrana, difícil de percibir y que posee en la parte mediana espesamientos laterales de la pared, al parecer de composición péctica. En los esporos

de Ashbya gossypii no se observa nada análogo. Tienen tendencia a orientarse en haces, con las puntas en el mismo sentido y entrecruzándose siempre. Llevados sobre un medio fresco, los esporos germinan emitiendo en cualquier punto de sus superficie un tubo germinativo que se dicotomiza y reproduce el micelio portador de esporangios.

Guilliermond considera difícil situar al nuevo hongo en la clasificación. Su micelio se acerca al de los Ficomietas y sus esporangios, aunque muy semejantes a los de Ascomietas por la formación de los esporos, difieren por el hecho de derivar siempre de segmentos plurinucleados, y no parece posible considerarlos como ascos, relacionando al hongo con las Endomicetáceas.

Habiendo constatado en el laboratorio una curiosa transformación de Spermophthora gossypii, que le condujo al cabo de 8 años a la supresión de la sexualidad del esporofito y dado que tanto Eremothecium ashbyii como Ashbya gossypii presentan gran semejanza con la forma gametofítica de ese hongo, sugiere que ellos corresponden a formas vecinas de Spermophthora gossypii, que han sufrido la misma transformación. Estos géneros serían los representantes de un grupo ancestral de Ascomietas inferiores, intermedio entre los Ficomietas y los Ascomietas.

Routien(1949)(211) comunica que ha observado diferencias entre representantes del género Eremothecium debida-

mente descritos y la especie Hremothecium ashbyii, cuya publicación no se ha realizado siguiendo el artículo correspondiente de las Reglas Internacionales de Nomenclatura Botánica.

En el género Hremothecium los ascos se presentan solitarios en el ápice de las hifas, incluyendo 30 o más esporos dispuestos en grupos en los extremos del asco. En el nuevo hongo los ascos se encuentran generalmente en series de posición intermedia, y sólo ocasionalmente solitarios. Poseen de 4 a 32 esporos, generalmente 6 a 18 y muy raras veces menos de 4 o más de 32. Propone la creación de un nuevo género con el nombre de Crebrothecium que deriva de Creber: frecuente, numerosos, con referencia a las numerosas células esporógenas presentes. Hremothecium ashbyii adquiere entonces la nueva denominación Crebrothecium ashbyi (Guill) Routien.

De acuerdo con sus características fundamentales, la ubicación sistemática de este hongo es la siguiente:

Reino: Vegetal.

División: Eumicetas (sin clorofila).

Clase: Ascomycetas (con ascos).

Orden: Euascales (micelio tabicado).

Suborden: Protoascineas (sin himenio ni carpogonio).

Familia: Endomycetáceas.

Género: Crebrothecium.

Crebrothecium ashbyi se cultiva fácilmente y forma en los medios sólidos colonias de aspecto gelatinoso y color amarillo. En medios líquidos vegeta más difícilmente: sobre caldo de zanahoria crece sólo lentamente, sobre mosto de cerveza líquido produce una vegetación muy lenta en el fondo del tubo que tiende a invadir de a poco todo el líquido, sin subir nunca a la superficie, dando un velo. Comienza a licuar la gelatina después de 8 hs. y la liquefacción es completa después de 10 hs. (212)

Arragon (1946) (213) observa el desarrollo de variaciones en la pigmentación de las colonias, inducidas por repiques en distintos medios; pero esta disociación no persiste cuando los cultivos se retransfieren a coque de papa ó agar-mosto de cerveza.

Moore y de Beeze (1947) (214) consideran que la actividad flavinogénica no se pierde por repiques, siempre que sólo se emplee para las siembras las colonias de color anaranjado brillante y que se propaguen en sustratos alternados de composición variada.

Estos autores han comprobado que cultivos conservados entre 3 y 10°C y subcultivos de organismos liofilizados, pierden su poder de síntesis; éstos últimos irreversiblemente, pudiendo recuperarse, en cambio, en el primer caso si se aplican procedimientos adecuados. En medio peptona-maltosa la actividad puede mantenerse 6 meses a temperatura ambiente, sin necesidad de repiques.

Producción de Riboflavina por *Crebrothecium ashbyi*.

El interés que actualmente ofrece este hongo se debe en gran parte a la cantidad de pigmento amarillo fluorescente que produce y que es identificado como Riboflavina (215,216) como consecuencia de su estudio químico, histológico, espectroquímico y sus propiedades fisiológicas. Para este último aspecto Hle. Raffy aplica un test biológico sobre ratas jóvenes machos, que divide en dos lotes: uno testigo y otro al que adiciona el cultivo de *C. ashbyi* con flavina dosada, obteniendo un aumento de peso rápido y regular en los animales. Demuestra así que el pigmento producido por el hongo posee las propiedades promotoras del crecimiento características de Riboflavina.

La vitamina aparece en los cultivos a temperatura vecina a los 25°C, cuando el crecimiento comienza a disminuir. Se forma en abundancia, especialmente sobre gelosas de Goroedkova y Sabouraud y difunde en el medio al que confiere un tinte amarillo. También se esparce en el líquido de los tubos Roux cuando se cultiva sobre zanahoria.

Observado al microscopio, el pigmento sólo aparece en los filamentos que detienen su crecimiento y que no contienen glicógeno, falta siempre en los esporangios y esporos. Se localiza en las vacuolas, donde también se encuentran

cristales incoloros que pueden corresponder al leuco-derivado del pigmento.

Raffy y Fontaine(1937)(217) practican el dosaje fotométrico de la flavina en el curso del desarrollo de los cultivos de *Crebrothecium ashbyi* y constatan un rápido aumento de vitamina con la edad del cultivo, luego la producción decrece y se estabiliza.

Tiempo	γ B ₂
2 días	1
7 "	56.5
9 "	360.
14 "	597.
19 "	856.
23 "	550

El medio Gorodkova resulta particularmente propicio para la síntesis del pigmento, por vegetar el hongo en condiciones desfavorables ; por repiques sucesivos sobre el mismo medio la producción de flavina se hace menos intensa y es necesario regenerar el cultivo sobre medio Sabouraud. En medios líquidos se produce muy poca flavina y muy lentamente, comparado con Gorodkova.

Las cantidades relativamente importantes de pigmento producidas por este hongo, conducen a Mirimanoff y Raffy (1938)(218) a emprender su extracción al estado puro. Adoptan un método inspirado en el empleado por Karrer sobre malta y flores de *Taraxacum* y obtienen 4.5mg. de fla-

vina cristalizada a partir de 340 mg. de medio de cultivo.

Schopfer (1944) (219) estudia los requerimientos nutritivos de Crebrothecium ashbyi, y establece que puede cultivarse sobre diversos medios naturales conteniendo extractos vegetales o animales.

Entre las fuentes carbonadas resultan particularmente favorables: maltosa, sacarosa, glucosa y levulosa, siempre en presencia de extracto de levadura.

Con respecto a las fuentes nitrogenadas, las peptonas bacteriológicas Byla, Witte, Sigfried y bacto tripton Difco son las más activas para la flavinogénesis, por su contenido en aminoácidos libres y su tenor en biotina. La biotina es un factor de crecimiento esencial para el hongo, sin el cual no se tiene ningún desarrollo. La aneurina y el inositol son factores complementarios que amplían la acción de la biotina. También necesita sustancias accesorias, presentes en el filtrado de peptona tratada por norite, que manifiestan sinergismo de acción con los factores mencionados. Según Schopfer y Guilloud estas sustancias pueden ser parcialmente reemplazadas por leucina y arginina.

La constelación de factores de crecimiento necesarios para Crebrothecium ashbyi es análoga a la de Ashbya gossypii; pero más compleja. Existen diferencias bioquímicas en-

tre los dos organismos.

Moore y de Beeze(1947)(214)citan el desarrollo de Crematophyllum ashbyi en caldo Czapek sintético con sacarosa, sin mencionar el agregado de ningún otro factor y con un rendimiento de Riboflavina de 2300 γ /g de sólidos.

Arragon y col.(1940)(220)estudian la flavinogénesis con respecto al factor superficie/volumen y establecen que el rendimiento es de 3 a 4 veces mayor en cultivos en superficie sobre medios sólidos o semisólidos, que en medios líquidos sumergidos. La producción alcanza un máximo al noveno ó décimo día en medio sólido y al décimo quinto día en medio líquido.

Aunque la necesidad de condiciones aeróbicas para obtener un mayor rendimiento de vitamina, es establecida en 1939 por Raffy, no se aplican técnicas de fermentación aeróbica sumergida hasta que mayer(221)presenta un método con el cual obtiene rendimientos de 80 γ /ml., con lo cual ya se evidencia las posibilidades comerciales del microorganismo.

Se presentan a continuación varias patentes, semejantes entre sí en lo que respecta a su adaptación a condiciones sumergidas; pero difiriendo en los sustratos empleados.

Rudert(1945)(222) emplea un medio sin glucido, con un lípido metabolizable como aceite de granos o lecitina, y una sustancia proteica. Cita un rendimiento de 200-600 γ /g. de

material seco.

Piersma(1946)(223)patenta un medio líquido compuesto de:

Extracto de malta	1,5-2	%
Proteína animal	1. -5	%
Glúcido(melaza).....	0.25-1,5	%

Obtiene rendimientos de 150-200 γ B₂/ml.

Foster(1947)(224) parte de un medio de fermentación que contiene:

Glúcido(melaza)	2-10	%
Proteína(levadura)...	0.5-1	%
Sales minerales usuales.		

Trabaja a un pH de 4.6 -5.6 y una temperatura de 27-33°C

Logra rendimientos de 308-400 γ B₂/ml.

Moore y de Becze(1947)(225) obtienen buenos rendimientos por fermentación de residuos de destilación alcohólica debidamente suplementados.

Deseive(1947)(226)menciona que la producción de Riboflavina por Crebrothecium ashbyi.depende de un factor termolábil que es destruido por esterilización continua.Cita como fuentes adecuadas de carbón,glucosa o productos que la contengan en un alto porcentaje,no pudiendo emplearse etanol ni glicerina.

Como fuentes de nitrógeno:agua de levadura,mosto de cerveza.Cistina en concentraciones de 0.001% actúa reduciendo el crecimiento e inhibiendo la formación de vitamina.Se recomienda un pH de 5.5-6.4 y una aereación efi-

ciente. Según esta investigadora, la producción en gran escala se ve obstaculizada por una extrema facilidad de contaminación, y el proceso continuo es limitado por la pérdida gradual de capacidad de producción del hongo.

Kinya Nagao(227) solicita una patente para producción de Riboflavina por cultivo de Crebrothecium ashbyi en medio de germen de arroz u otros granos, previo tratamiento con agua o ácido acético 0.1%. El cultivo seco y pulverizado contiene 5000-7000 γ B₂/g.

Moss y Klein(1949)(228) patentan un método que consiste en la inoculación del hongo pregerminado en un sustrato de lentejas molidas, sacarosa oscura parcialmente invertida, succinato de amonio y cloruro de sodio.

Allen(1949)(229) presenta una modificación del medio de Piersma, que consiste en el reemplazo de la proteína animal por caseína solubilizada. Trabaja a un pH de 6.5-6.9.

Ryohei Takata(230) cita un rendimiento de 20.000 γ /g., empleando Crebrothecium ashbyi sobre medios sólidos (germen de arroz y de trigo).

Stiles(1949)(231) emplea un sustrato formado por residuos de fermentación alcohólica de granos, ajustado a pH 5.2, inoculado e incubado entre 23-24°C durante 89 horas. Obtiene un rendimiento de 223 γ /ml.

James (1950) (232) obtiene una patente con rendimientos de 1175 γ B₂/ml, empleando sustrato de trigo malteado. La cantidad de cebada empleada debe ser por lo menos un 3% de los sólidos de trigo. El pH 5,8-6,2 y la temperatura de 28-30°C.

Dulaney y Grutter (1950) (233) estudian los requerimientos nutritivos del hongo. Obtienen muy poco crecimiento con un medio básico compuesto de caseína hidrolizada y sales inorgánicas. No observan efecto estimulante por acción de biotina y tiamina; pero l-inositol solo o en combinación provoca un aumento tanto del crecimiento como de la producción. La fuente de nitrógeno debe ser compleja. Glucina sola resulta insuficiente para el desarrollo; pero se obtienen buenos resultados cuando se la sustituye por otros aminoácidos como prolina, arginina o ácido glutámico, siempre que se esté en presencia de inositol.

Dado que aún reuniendo estas condiciones se obtienen menores rendimientos que empleando medios orgánicos complejos, se concluye que para la producción de Riboflavina actúan factores aún no identificados.

En sayos realizados con glutamina, ácido pantoténico, vitamina B₁₂, ácido nicotínico, piridoxina, colina, P.A.B. y

ácido fólico no conducen a un aumento de flavinogénesis.

Chin(1950) (234) inoculando Cremothecium ashbyi en un medio sintético, encuentra que la mejor fuente nitrogenada es la peptona; pudiendo también emplearse glutamina, asparagina, alanina y sulfato de amonio. Triptofano, tirosina, cistina, cisteína, histidina y urea no son adecuados.

Como fuentes carbonadas aconseja glicerol, glucosa y sacarosa, no siendo recomendables: glicol, xilosa y manitol.

Tabenkin(1950) (235) patenta un medio sintético cuya composición es :

Sacarosa.....	50g.
$PO_4H_2NH_4$	3g.
$CaCO_3$	5g.
PO_4H_2K	2g.
$SO_4Mg.7H_2O$	0.5g.
$SO_4Fe.7H_2O$	0.2g.
$SO_4Zn.7H_2O$	0.04g.
$SO_4Cu.5H_2O$	0.005g.
Inositol	0.005g.
H_2O	c.s.p. 1000 ml.

Trabaja a 28-30°C, con aeración y agitación, obteniendo un rendimiento de 500-700 γ /ml. en 120-144 horas.

Debido a la ausencia de sustancias proteicas animales, no hay tendencia a formar espuma y la purificación del producto final también se simplifica.

Sekido y Kichina(1950) (236) preparan un producto con alta potencia en vitamina(50.000 γ /g) a partir de un cultivo de Cremothecium ashbyi conteniendo 5000 γ /g. que di-

sueiven en agua, filtran y dejan en reposo al aire. El precipitado que se obtiene se centrifuga y seca para obtener el producto final.

De Beeze y co(1951)(237) presentan una patente sobre producción de materiales conteniendo de 2000-10.000 γ /g. Se obtienen a partir de residuos de destilados que se suplementan con almidón, nitrógeno inorgánico (sulfato de amonio) y nutriente fosforado (fosfato de calcio) y se inoculan con Crematophyllum ashbyii.

Osaki y Karata(1951)(238) estudian la influencia de cebada germinada sobre el crecimiento del hongo y la producción de Riboflavina. En tanto que este aumenta en un 200 por ciento, por agregado de 1-2% de cebada, el crecimiento se ve retardado y se acelera la autólisis micelial, por lo cual se deduce que el factor responsable de la producción de vitamina difiere del que gobierna el crecimiento del hongo.

Yaw(1952)(239) observa que las necesidades en factores de crecimiento del hongo están estrechamente ligadas a variaciones de pH. Solamente algunos aminoácidos se requieren a ciertos niveles y a pH 6,2-7,2, por ej., no resulta necesario agregar factores adicionales. Estas diferencias de requerimientos se deben probablemente a la capacidad del organismo de producir ciertos factores sólo a deter-

minados pH.

Las posibilidades de adaptación del hongo a distintos medios, podría explicar la diferencia de sus necesidades comentadas en los diversos laboratorios.

Yaw observa que metionina influye sobre la producción de Riboflavina debido a un aumento del crecimiento del hongo, que tiene como consecuencia natural un aumento en la flavinogénesis; histidina en cambio juega un rol más importante pues la mayor cantidad de vitamina no está relacionada con el aumento de crecimiento del organismo.

ASHBYA GOSSYPHII (Ashby et Nowell) Guill.

Guilliermond. Revue gen. botanique 40, 318, 606 y 690 (1928)

Nematospora gossypii, Ashby et Nowell. Ann. of Botany. 40, 69 (1926).

Micelio multinucleado, ramificado dicotómicamente, diámetro 2,5 u. Esporangios desarrollados por tabicación seguida por ensanchamiento de los segmentos interseptales a cierta distancia (150-200 u) de la punta de las hifas; longitud 70-100 u; diámetro 8-12 u. Tabiques de hasta 6 u de espesor, desarrollados desde las paredes hacia adentro. Esporos de 4 a 32, en dos o más haces, más frecuentemente en número de 12 dispuestos en dos haces de 6 como sucede en N. coryli.

Forma similar a los de N. coryli pero tabicados transversalmente, con la mitad superior oscura o no.

Tamaño de esporo desarrollado sobre papa 24-32 u por 2-2,5 u. Apéndice 50-100 u.

Parásito del linter y semilla de Gossypium ssp. en las Antillas menores y en Africa Tropical y de semillas de Datura metel en Montserrat y de Asclepias curassavica en Trinidad.

Las hifas hialinas a menudo vacuoladas o conteniendo un material granulado y numerosas gotitas hialinas, se ramifican dicotómicamente, presentando en un primer estado de desarrollo, brotes laterales que pueden germinar. Se cita una forma vegetativa de reproducción que solamente tiene lugar en condiciones que impidan la formación de esporos y que se caracteriza por fisión transversal con separación de las células hijas.

Tratándose de cepas flavinogénicas se observa la presencia de Riboflavina o algún derivado en forma de un fluido oleoso o de cristales aciculares anaranjados, dentro de

ciertas células. El número de núcleos en las células es variable.

Los sacos esporíferos son abundantes y se desarrollan a partir de segmentos de hifas, apareciendo al azar a lo largo del micelio, formando cadenas o solos, y a veces ramificados; poseen tamaños y formas variadas, siendo la más frecuente la de un cuerpo signoide; son multinucleados y sus núcleos sufren dos mitosis en el proceso de formación de esporos, a semejanza de lo que sucede en los Ascomicetas superiores. Guilliermond (242) describe en detalle los procesos citológicos que tienen lugar; finalizadas las divisiones nucleares, el plasma esporógeno se divide en largos filamentos que se agrupan en haces a medida que se forman los esporos. Cuando éstos maduran permanecen agrupados paralelamente en 2 o más haces de 2 a 6 esporos a lo largo del saco; cuando se liberan permanecen unidos por entrelazamiento del largo apéndice de que están provistos y que está constituido por un plasma homogéneo muy difícil de teñir. Los esporos se caracterizan por la presencia de una región anterior ocupada por estructuras derivadas de una degeneración del citoplasma; una región central constituida por citoplasma denso conteniendo el núcleo y una región polar, el apéndice filiforme. En el centro puede observarse ocasionalmente un ligero tabique. Al germinar se produce una expansión globular en la región nucleada central, a

a partir de la cual surgen uno o más tubos que dan lugar a las hifas.

En los cultivos de cepas flavinogénicas aparecen formas bulbares típicas, que son expansiones de las hifas y que representan probablemente la respuesta del organismo a variaciones de presión osmótica ocasionadas por la producción de grandes cantidades de Riboflavina.

Caracteres culturales:

Han sido descritos por varios investigadores, incluyendo Ashby y Nowell (1926) (241); Guilliermond (242); Wickerham et al (1946) (243); Pridham y Raper (1950) (244).

Ashbya crece sobre papa, agar-papa-glucosa; agar-papa-sacarosa; mosto de cerveza; gelatina y zanahoria; produciendo primero un crecimiento húmedo y extendido de hifas con proyecciones cortas, puntiagudas sobre la superficie. Después de una semana aparecen sobre papa, puntos esporádicos semejantes a pústulas, que luego se unen para formar un plectenquima plegado, vermiforme, gelatinoso. El sustrato mantiene la misma pigmentación. Sobre agar-papa-glucosa o sacarosa aparece un crecimiento de hifas similar, que luego se convierte en un plectenquima húmedo, translúcido, plegado, grisáceo, que puede desprenderse fácilmente.

Según estudios realizados sobre una cepa flavinogénica, puede describirse la siguiente colonia típica, desarrollada sobre agar-extracto de malta-extracto de leva-

33

dura-peptona-glucosa, después de 10 días a temperatura ambiente (24-26°C): Colonia circular, chata o ligeramente levantada, de 35-40 mm. de diámetro, que presenta proyecciones espinosas sobre la superficie al 2° o 3r. día de desarrollo y arrugas accidentales o surcos radiales al 4° o 5° día. Al principio es blanca o verdosa, tornándose amarillo limón claro en dos ó tres días; el tono se intensifica a los cinco días alcanzando un amarillo anaranjado o rojizo a los diez días; los bordes de la colonia son siempre blancos. El medio que la rodea se colorea generalmente de amarillo verdoso al cabo de 7 a 10 días, debido a la difusión del pigmento. El cultivo es extremadamente adherente y puede ser separado entero de la superficie.

Ashbya gossypii es ligeramente inestable cuando se siembra en medios líquidos. En reposo, da lugar a células formando colonias pálidas o incoloras, flocculentas; en agitación se obtienen un crecimiento homogéneo que sufre autólisis después de varios días. En medios apropiados y especialmente sometiénolas a una aereación intensa, las cepas flavinogénicas producen una pigmentación amarillo limón o anaranjada.

Caracteres fisiológicos:

Requiere tiamina, biotina y meso-inositol para su desarrollo adecuado (219, 244). De estos tres factores, bio-

tina es el más importante, no habiendo tenido éxito intentos realizados por Robbins y Ma (1942) para reemplazarlo por ácido pimélico o una mezcla de ácido pimélico y l-cistina.

Con respecto a la fuente nitrogenada, algunos autores citan que el N inorgánico resulta de muy poco valor para el crecimiento del organismo (244, 245) sin embargo puede utilizarlo, siempre que se provean sus otras necesidades. La mayoría de las cepas flavinógenicas no son capaces de síntesis en medios totalmente sintéticos.

El organismo es capaz de utilizar la mayoría de las sustancias proteicas comunes y sus productos de hidrólisis tales como proteína animal degradada, albúmina, gluten o caseína, como fuente de N. (245). Para la producción de Riboflavina, parece ser necesario una combinación de proteína animal y vegetal degradada, siendo adecuados y económicos a este respecto, "animal stick liquor" y "cornsteep liquor".

Como fuente carbonada, Ashbya gossypii puede emplear glucosa, sacarosa o fructosa para la producción de vitamina (243) pero las melazas de caña o de remolacha, aunque proveen un crecimiento abundante, no favorecen la flavinogénesis. La maltosa y celobiosa son asimiladas lentamente, en cambio las pentosas (xilosa o arabinosa), el almidón y la celulosa no pueden ser metabolizadas, pues es-

táceas. En ese entonces designa al nuevo hongo simplemente como especies "C".

Wingard (1925) también observa la relación entre especies "C" y Nematospora spp.; pero siguiendo estudios citológicos de N. phaseoli, adelanta la opinión de que los sacos esporíferos son en realidad ascos, y que esos organismos son Saccharomycetáceas; también señala que las especies "C" parecen tener características comunes con los géneros Nematospora, monospora, Coccidiascus, Eremothecium, Protascus y ciertas especies de Endomyces.

Ashby y Nowell (1926) (241) caracterizan y denominan a especies "C" como Nematospora gossypii, sin embargo dudan de que el organismo sea Saccharomycetáceas y dejan abierto el interrogante acerca de la naturaleza exacta del saco esporífero.

Guilliermond (1927, 1928, 1935, 1936) (240), en una serie de estudios dedicados a la citología y filogenia de los Ascomicetas inferiores, sugiere colocar al organismo entre los Hemiascáceas.

Este investigador recuerda que en este grupo provisorio se clasifican por convención, aquellos hongos que presentan sacos esporíferos semejantes al asco de los Ascomicetas superiores, pero que no corresponden con su definición.

En este caso la sugestión se basa en su observación

de la formación de esporas a expensas de un esporoplasma, la presencia de un epiplasma, número par de esporos y dos mitosis del núcleo previo a la formación de esporos. Considera el saco esporífero como intermedio entre un esporangio y un asco, debido a su naturaleza multinucleada, y señala que el hongo se relaciona con géneros como Dipodascus, Protomyces, Endogone, Taphridium, Spermophthora y Eremothecium, creando para él un nuevo género Ashbya

Fragoso y Ciferri (1928) presentan una descripción latina del organismo, bajo el nombre genérico de Ashbia y lo consideran una Saccharomycetaceae. (244).

Stelling Dekker (1931) (247) omite el género Ashbya en su clasificación de levaduras esporógenas y considera dudosa su posición, representando sólo una sección del género Nematospora, sub-familia Nematosporoideae y familia Endomycetaceae.

Dodge (1935) mantiene el nombre genérico Ashbya; pero establece una familia separada Ashbyaceae, en el orden de las Endomycetales, en el cual también incluye a los géneros Piedraia y Eremothecium.

En general los taxonomistas están de acuerdo en colocar al hongo dentro del orden Endomycetales de las Ascomycetas, pero a partir de aquí los intentos de clasificar-

0197

lo difieren, pues posee características de varias familias. Si se acepta la clasificación de Martin (1948) A. gossypii muestra caracteres que lo relacionan con 3 familias: Ascoideáceas, Endomicetáceas y Sacaromicetáceas.

Recientemente, Routien (1949) (211) al describir el nuevo género Crebrothecium, para incluir a Eremothecium ashbyi, ofrece una posibilidad para ubicar dentro de él a A. gossypii.

Nosotros consideramos que su posición sistemática es la siguiente:

Reino: Vegetal
División: Eumicetas (sin clorofila)
Clase: Ascomicetas (con ascos)
Orden: Euascales (micelio tabicado)
Suborden: Protoascineas (sin himenio ni carpogonio)
Familia: Endomicetáceas.
Género: Ashbya.

Nowell (241) halló que Ashbya gossypii era una de las especies que infectaban el algodón de las Indias Británicas Occidentales y más adelante se encontró que los tomates, café y citrus, todas plantas importantes en la economía de un país, también podían ser atacadas. Para su diseminación es importante la presencia de ciertos in-

sectos vectores (*Dysdercus*, *Antestia*, etc.) que inyectan los esporos o el micelio en el tejido del huésped mientras se alimentan. La enfermedad provocada en el algodón se denomina estigmatonicosis, y da por resultado la caída prematura de las cápsulas o su desecación si permanecen en la planta.

En el laboratorio, en cambio, *A. gossypii* atrae la atención por su gran capacidad para sintetizar Riboflavina, y las investigaciones de los últimos años han girado alrededor de ese aspecto.

Por otra parte, su necesidad en biotina, hace factible su empleo en un ensayo de titulación microbiológica de este factor.

También se ha considerado interesante su uso en estudios tales como el del mecanismo de la actividad fisiológica del gamexane y mecanismo de acción de ciertas lactonas no saturadas (243).

Hawker (1943) lo emplea para probar que Melanospora destruens, es capaz de sintetizar inositol.

Se trata pues, de un organismo patógeno para la naturaleza, pero que en el laboratorio puede prestar grandes servicios.

Esquema del ciclo vital de *Ashbya gossypii* (244)

Producción de Riboflavina.

En 1930, Farries y Bell (245) observan la producción de un pigmento amarillo, por ciertas cepas de A. gossypii, pero este pigmento, es recién identificado como Riboflavina en 1935, por Guilliermond y col. (215). Estos autores mencionan que bajo las condiciones apropiadas para la producción de vitamina B₂ por Eremothecium ashbyii, Ashbya gossypii sólo produce vestigios. Esta característica que distingue a ambas especies es confirmada posteriormente por Schopfer (1944) (219) y Deseive (1947) (226). Sin embargo, Wickerham y col (1946) (243) encuentran que A. gossypii es capaz de sintetizar cantidades apreciables de Riboflavina, si se seleccionan el medio y las condiciones de cultivo. Wickerham trabaja con una cepa del Dr. Robbins, Director del Jardín Botánico de Nueva York, que introduce en su colección como N.R.R.L.Y. 1056. Esta cepa desarrolla colonias de color amarillo muy claro con tinte verdoso, que se tornan más intensamente coloreadas por repiques en serie. Después de un tiempo aparece una variante que forma colonias más anaranjadas, y que permanece estable durante meses de repiques en medio sólido. Wickerham obtiene con ella buenos rendimientos, sin necesidad de eliminar Fe del medio, lo que resulta de gran im-

portancia para la producción industrial, puesto que los tanques de fermentación se construyen preferentemente de acero y las instalaciones de plantas con metales especiales pueden resultar antieconómicas.

Realiza sus ensayos empleando dos medios: uno compuesto de:

extracto de levadura(polvo)	0.3%
peptona	0.5%
cerelosa	2. %

y otro con estos mismos componentes adicionados de una sustancia que denomina "Stimuflav" (solubles de destilación) en proporción de 0.3%.

Para mantener la cepa emplea estos mismos medios a los que agrega un 2% de agar.

Estudia la influencia del medio empleado para preparar la siembra, sobre el rendimiento, y observa que los mejores resultados los provee un cultivo alternado en ambos medios.

Con respecto a las condiciones de fermentación, alcanza un máximo de 381 γ/ml. a los 8 días, empleando el medio adicionado de Stimuflav y haciendo burbujear aire a un promedio de 75 ml. por minuto y por 400 ml. de cultivo.

Tanner y Van Lanen (1948) (249) solicitan una patente para producción de Riboflavina con Ashbya gossypii en condiciones aeróbicas.

Tanner, Vojnovich y Van Lanen (1949) (250) estudian los factores importantes para la producción en escala de laboratorio y establecen medios para la producción industrial, en cultivo aerobio sumergido.

Mantienen la cepa H.R.R.L.Y.1050 en un medio sólido compuesto de:

glucosa	1%
peptona.....	0.5 %
extracto de levadura	0.3%
agar	1.8 %

Observan que el agregado de extracto de malta a este medio aumenta la velocidad de formación del pigmento en el agar, sin influir sobre la fermentación principal.

La cantidad de vitamina sintetizada, se relaciona íntimamente con el glúcido disponible, y sólo aparecen vestigios, antes de que éste sea metabolizado; posteriormente se produce un aumento del pH hacia reacción alcalina y tienen lugar la etapa de síntesis.

En un medio base compuesto de:

corn steep	0.5%
glucosa.....	0.25-3%

la producción aumenta con la cantidad de glúcido presente, no siendo útiles niveles superiores a 4%. La temperatura óptima de fermentación está entre 26 y 28°C. La reacción inicial del medio debe ser superior a pH 5,5 y preferentemente entre pH 6 y 7. La edad de la siembra y el volumen agregado también tienen gran importancia, y es

conveniente emplear cultivos jóvenes, de 24 horas, en proporción del 1% en volumen, con lo cual se induce un período de síntesis más rápido y prolongado. La esterilización resulta un factor de consideración; un tratamiento prolongado en autoclave, por ej. más de 30 minutos a una atmósfera, produce un efecto adverso notable sobre la producción, por lo cual se aconseja esterilizar los componentes del medio por separado.

Con respecto al medio empleado para la producción en escala industrial, Tanner y col. encuentran que como sustituto del extracto de levadura resulta económico y muy satisfactorio, el Corn steep; en cambio, la peptona comercial resulta más difícil de sustituir, aunque obtienen buenos rendimientos empleando "animal stick liquor" (producto constituido por la fase líquida de la digestión de desechos de carnes envasadas) y también residuos de carne. Frecuentemente los rendimientos se mejoran sometiendo estos suplementos a una digestión proteolítica previa.

Los resultados obtenidos por estos investigadores trabajando en las condiciones óptimas establecidas, alcanzan un promedio de 575-555 γ /ml; mencionándose valores de 1050 y 1420 γ /ml. en experiencias aisladas; estas cifras pueden ser indicio de un posible aumento general

de los rendimientos, si se consiguen establecer las condiciones óptimas(359).

Pfeifer, Tanner, Vojnovich y Traufler(1950) (360) realizan ensayos en planta semipiloto, estudiando especialmente condiciones de esterilización, composición del medio, aereación y agitación y variación de cepa.

Emplean fermentadores de acero inoxidable de 300 galones de capacidad y de cobre de 800 galones, convenientemente equipados para agitación y aereación.

El medio usado para mantener la cepa stock es:

extracto de malta	0.3%
peptona	0.5%
extracto de levadura	0.3%
glucosa	1. %
agar	1.8%

La siembra se realiza de acuerdo con las sugerencias de Tanner(250).

El medio de fermentación consta de :

glucosa	2%
cornsteep	1.8-2.1%
animal stick....	1. %

El óptimo de Corn steep a usar varía con cada remesa de material, siendo necesario determinarlo previamente, pues no puede establecerse correlación entre su eficacia y su contenido en sólidos o en nitrógeno.

Con respecto a la esterilización confirman que un exceso de calentamiento perjudica la producción, ya sea por destrucción o alteración de constituyentes descono-

cidos, y aconsejan efectuar una esterilización continua a $pu\ 4.5, 275^{\circ}F.$ y con retención de 5 minutos.

Durante la fermentación el medio se mantiene con agitación mecánica, para proveer una mezcla eficaz, y no tan fuerte como para interferir en el crecimiento del micelio. Se hace burbujear aire estéril, preferentemente en cantidades de 0.25 vol. de aire por minuto y por volumen de medio. Los rendimientos obtenidos oscilan entre 500-848 $\gamma/ml.$ en un tiempo de 96-120 horas, siendo más satisfactorias las fermentaciones que se llevan a cabo con mayor profundidad de líquido. Por otra parte, experimentos paralelos realizados con una variante inducida de la cepa N.R.K.L.Y.1056, dio resultados superiores.

El licor fermentado puede evaporarse a consistencia siruposa en evaporadores adecuados, y desecar posteriormente hasta lograr un concentrado con 2.5% de riboflavina.

Smiley y col. (1951) (361) estudian la biosíntesis de vitamina B_2 con A.gossypii sobre un sustrato constituido por residuos de destilación de la fermentación alcohólica de granos. Experimentos iniciales realizados sin adición de glucido al medio, sólo dan por resultado, un incremento de 5 veces la cantidad original de riboflavina. Es decir que a este respecto, A.gossypii puede compararse

con Aerobacter aerogenes, según ensayos de Novak(362).

Fermentaciones realizadas en planta piloto con fermentadores de 1000 galones, logran mejores rendimientos, comparables a los obtenidos por Pfifer(360) en escala de laboratorio. En estos ensayos el sustrato de residuos de destilación es suplementado por un glúcido fermentescible y la peptona es reemplazada por "packing house stick liquor".

Empieza una esterilización relámpago con retención de 3 minutos a 126-143° ; la velocidad de agitación es de 100 revoluciones por minuto y la velocidad de aereación corresponde a 1/6 de volumen de aire por volumen de medio y por minuto.

Panner(1951)(363) solicita una patente para obtener Riboflavina por cultivo de A.gossypii en condiciones aeróbicas. El medio empleado consta de:

glúcido fermentescible		0.5-10%
Cornsteep		0.1-2%
Residuos de fermentación alcohólica		0.1-2%
Animal stick liquor		0.1-2%

Este último compuesto debe degradarse previamente, por medio de incubación con papaína a 30-40°C de 12 a 40 horas.

Koninklijke(1951)(364).patenta la producción de Riboflavina por fermentación con A. gossypii de un medio compuesto de un glúcido fermentescible y una mezcla de

1.2
proteínas de origen vegetal y animal, parcialmente hidrolizadas. Obtiene rendimientos de 600 y por ml.

Caracteres de la fermentación por Ashbya gossypii y Crebrothecium ashbyi:

De acuerdo a la relación entre el sustrato y el producto elaborado, se pueden establecer dos tipos fundamentales de fermentación: uno en el cual se produce una conversión más o menos cuantitativa de la fuente de glucido para dar origen al producto (por ej. la producción de ácido cítrico; otro en el que no existe una conexión tan obvia entre producto y sustrato. Éste pertenece la producción de Riboflavina por A. gossypii y Crebrothecium ashbyi. La función primordial de la fuente de carbono, es sólo ayudar al microorganismo a crecer y metabolizar, no siendo necesario emplear grandes cantidades de glucidos; la fuente nitrogenada, en cambio, es preciso que sea más compleja, y con este objeto es muy usado el Corn steep, que también es fuente de factores minerales y accesorios necesarios. En la fermentación, si bien se producen grandes cantidades de vitamina, son sólo trazas comparando con los rendimientos de los procesos comprendidos en el primer grupo. La vitamina originada, parece ser un producto lateral accidental del metabolismo del hongo, y una gran parte de la misma permanece íntimamente asociada con las

células del organismo, del cual debe ser extraída.

No siendo bien notorias las condiciones que favorecen la fermentación, resulta más difícil establecer las condiciones óptimas de trabajo.

de la Universidad de Chile.

Los datos de laboratorio para el análisis de los
muestras de plantas se obtuvieron de la siguiente manera:
se tomaron las plantas de la zona de estudio y se les
fue quitando las hojas y se les fue quitando las raíces.

Las plantas fueron cortadas en pedacitos de 1 cm.
de largo y se les fue quitando las raíces y se les
fue quitando las hojas y se les fue quitando las raíces.
Las plantas fueron cortadas en pedacitos de 1 cm.
de largo y se les fue quitando las raíces y se les
fue quitando las hojas y se les fue quitando las raíces.
Las plantas fueron cortadas en pedacitos de 1 cm.
de largo y se les fue quitando las raíces y se les
fue quitando las hojas y se les fue quitando las raíces.

MÉTODOS de VALORACION

Los datos de laboratorio se obtuvieron de la siguiente
manera: se tomaron las plantas de la zona de estudio y
se les fue quitando las raíces y se les fue quitando
las hojas y se les fue quitando las raíces. Los datos
de laboratorio se obtuvieron de la siguiente manera:
se tomaron las plantas de la zona de estudio y se les
fue quitando las raíces y se les fue quitando las
hojas y se les fue quitando las raíces.

Los datos de laboratorio se obtuvieron de la siguiente
manera: se tomaron las plantas de la zona de estudio y
se les fue quitando las raíces y se les fue quitando
las hojas y se les fue quitando las raíces. Los datos
de laboratorio se obtuvieron de la siguiente manera:
se tomaron las plantas de la zona de estudio y se les
fue quitando las raíces y se les fue quitando las
hojas y se les fue quitando las raíces.

Los datos de laboratorio se obtuvieron de la siguiente
manera: se tomaron las plantas de la zona de estudio y
se les fue quitando las raíces y se les fue quitando
las hojas y se les fue quitando las raíces. Los datos
de laboratorio se obtuvieron de la siguiente manera:
se tomaron las plantas de la zona de estudio y se les
fue quitando las raíces y se les fue quitando las
hojas y se les fue quitando las raíces. Los datos
de laboratorio se obtuvieron de la siguiente manera:
se tomaron las plantas de la zona de estudio y se les
fue quitando las raíces y se les fue quitando las
hojas y se les fue quitando las raíces.

4.-Métodos de valoración.

Los métodos empleados para realizar el dosaje de Riboflavina pueden ser: químicos, físico-químicos y biológicos.

Cronológicamente, los métodos biológicos son los primeros aplicados.

Diversos investigadores realizaron ensayos para determinar dietas que reunieran las condiciones necesarias, por ej. Chick y Roscoe (1927); Evans y Burr (1928); Gldberger y col. (1926); pero recién en 1931 Bourquin y Sherman (251) desarrollan un método basado en el empleo de ratas como animales de experimentación. Las respuestas obtenidas en las curvas de peso, bajo condiciones adecuadamente controladas, se consideran un índice para medir los valores relativos de vitamina en alimentos o concentrados diversos.

La dieta básica empleada para alimentar ratas de 4 semanas, es la siguiente:

Caseína purificada	18%
Mezcla salina de Osborne y Mendel	4%
Aceite de hígado de bacalao ..	1-2%
Manteca	8-9%
Almidón	68 %
Extracto alcohólico de trigo libre de vitamina B ₂ ..	1 %

El propósito de Bourquin y Sherman, es suministrar con esta dieta todos los factores necesarios para el crecimiento, excepto la vitamina a titular, de modo que ella constituya el factor de crecimiento limitante a través de una amplia zona de experimentación, dentro de la que, la curva de

peso del animal ensayado sea función del ingreso de vitamina B₂.

El período de ensayo comienza recién después de unas 2 a 3 semanas de alimentación con la dieta mencionada, cuando el peso de las ratas se mantiene constante. Se administra entonces, por lotes separados, cantidades conocidas de vitamina y de sustancia a ensayar, como suplementos de la dieta, durante un período de 4 a 8 semanas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinan las unidades Bourquin Sherman presentes en la sustancia problema, y considerando que una Unidad Bourquin-Sherman es la cantidad de vitamina B₂ que suministrada diariamente a una rata standard, le provoca un aumento de peso promedio de 3 g. por semana. El valor de esta unidad fué calculado más tarde en cifras variables que oscilan entre 2 y 5 aproximadamente, por unidad. (252, 253, 254).

Este método, valioso del punto de vista de la nutrición, puesto que se basa en una respuesta biológica, no resulta específico si se emplea la dieta sugerida por Bourquin y Sherman, dado que no conociéndose entonces exactamente todos los factores requeridos para el crecimiento de mamíferos, estas raciones sólo proporcionan un crecimiento limitado, aún cuando se suplementen con Riboflavina, indicio cierto de deficiencia en otros factores. Para obviar este inconveniente, muchos investigadores han propuesto distintas raciones.

Day y col. (255) emplean una dieta en que el suplemento libre de Riboflavina es provisto por un extracto alcohólico

80% de cáscaras de arroz.

Ansbacher y col(1936)(256) y Cook y col(1937)(257) emplean concentrados de cáscaras de arroz;Suplee y col.los mismos concentrados después de autoclavar(258).

Lindholm(1938)(259) emplea extracto acuoso de hígado tratado con tierra de Fuller a pH 4 como fuente de los diversos miembros del complejo B en la construcción de una curva de respuesta standard, en la cual se compara la ganancia promedio con el logaritmo de la dosis.

El Sadr y col.(1940)(260) emplean una dieta con filtrado de levadura por tierra de fuller como fuente de complejo B libre de Riboflavina.No es improbable, sin embargo, que todas estas dietas no contengan las cantidades adecuadas de complejo B y posean en cambio dosis apreciables de Riboflavina.

Wagner, Axelrod y Lipton, (1940)(261) después de ensayar varias dietas, adoptan una con la que obtienen resultados concordantes con los valores hallados por el método microbiológico de Snell y Strong.Dicha dieta consta de:

Dextrina	65g.%
Caseína Labco.....	18g.%
Salas	4g.%
Maíz blanco	6g.%
Manteca	3g.%
Aceite de hígado de bacalao.	2g.%
Aceite de maíz	2g.%
Tiamina	200 %
Vit.B ₆	200 %
Acido nicotínico.....	2500 %
Extracto de hígado (libre de B ₂)	4g.%

Emmett y col(1941)(262) realizan ensayos comparativos entre el método biológico que emplea ratas como animal de experimentación y los métodos microbiológicos y fluorométrico, encontrando resultados similares cuando se trabaja con muestras de alta potencia y mayores diferencias cuando se trata de bajas potencias.

Otros métodos biológicos emplean como criterio de actividad riboflavínica, la velocidad de crecimiento de pollos, propuesto por Norris y col.(1930)(263). El más generalmente usado es el de Jukes(1937)(264) y sus modificaciones. La dieta propuesta por Jukes para alimentar pollos de 8 días es la siguiente:

Harina de maíz amarillo	30 partes
Almidón	23 "
Salvado lavado con ácido.....	10 "
Caseína lavada	22 "
Filtrado de salvado de arroz...	7 "
Cloruro de sodio	1 "
Carbonato de calcio	1 "
Aceite de soja crudo.....	3 "
Aceite de hígado de bacalao....	2 "
Extracto de harina de alfalfa equivalente a 1% de harina.	

El crecimiento máximo obtenido según las condiciones del ensayo, requiere el agregado de unos 0,60mg. de Riboflavina cristalizada por cada 100g. de dieta.

El ensayo con pollos es más corto que el realizado con ratas e igualmente exacto.

En general puede decirse que los ensayos biológicos en animales superiores resultan muy largos, caros y no muy exactos, pero su principal ventaja reside precisamente en el hecho de basarse en una respuesta biológica.

Método colorimétrico:

Se basa en la medida de la intensidad del color de la Riboflavina en el fotómetro Pullfrich. Ha sido sugerido por Warburg y Christian(1933)(265) y muy usado por Kuhn(1934)(266). Es un método conveniente solamente tratándose de soluciones del compuesto puro, pues en otro caso es necesario suprimir todos los otros pigmentos extraños, lo que resulta a menudo muy difícil establecer si se ha logrado. (Emmerie)

Este método es perjudicado por grandes e inconstantes pérdidas, calculadas por Kuhn entre 13 y 58%(267).

Emmerie lo emplea para titulaciones en orina, leche, pan, queso. Realiza una adsorción previa de la vitamina en sulfuro de plomo, y eluye luego con agua, piridina y ácido acético; oxida las materias colorantes extrañas con permanganato de potasio y mide la intensidad del color amarillo en el fotómetro.

Kllinger(267) considera mucho más seguros los métodos biológicos.

Método de lumiflavina:

Se basa en la conversión de riboflavina en lumiflavina por irradiación en solución alcalina. La lumiflavina se extrae de la solución acidificada, con cloroformo y se determina su fluorescencia o la intensidad de color en el fotómetro.

La principal objeción que puede hacerse a este método es que la transformación no es cuantitativa y varía, según

algunos investigadores entre 42 y 87%, dependiendo esta variación de la presencia de impurezas y de la concentración de Riboflavina. Tampoco se excluye la posibilidad de que otras sustancias desconocidas den lugar a un producto que se disuelva también en cloroformo. Se ha probado, sin embargo, que el método es efectivo, si se determina por separado la velocidad de conversión de Riboflavina pura en solución de una concentración aproximadamente igual a la que se titula, y cuidando el pH, temperatura y cantidad de aire presentes.

El método original de dosaje por transformación en lumiflavina ha sido propuesto por Kuhn, Wagner-Jauregg y Kaltschmitt (1934) (266). Se extrae el material con metanol al 40% o con agua a ebullición. El extracto se alcaliniza, luego de su purificación con cloroformo, éter de petróleo y tierra de diatomeas. Se procede entonces a su irradiación por espacio de 2 horas, con una lámpara de 600 watts a distancia de 25cm. y cuidando que la temperatura del líquido no exceda los 20°C. Se acidifica con ácido acético y se extrae por lo menos 3 veces con cloroformo. La capa clorofórmica se seca con sulfato de sodio anhidro y se procede a medir la concentración de la sustancia colorante en el fotómetro Pullfrich, efectuando los cálculos necesarios para convertir la cifra de lumiflavina hallada en Riboflavina.

Método fluorométrico:

La Riboflavina emite una fluorescencia amarillo-verdosa característica en soluciones neutras(81) cuya intensidad puede medirse por medio de un fotómetro.

Esta interesante propiedad da origen a un método rápido y económico que resulta uno de los más aplicables entre los distintos métodos físicos y químicos propuestos.

Las primeras determinaciones las efectuaron Euler y Adler(268) titulando la flavina presente en tejidos animales y vegetales por comparación de la fluorescencia de una solución extractiva purificada con una solución tipo o por medición en el fotómetro Pullfrich.

Actualmente la técnica fluorométrica más empleada es la sugerida por Hodson y Norris(1939)(269) con algunas modificaciones.

El método Hodson y Norris es de titulación indirecta dado que existen otras sustancias fluorescentes y pigmentos que acompañan a la Riboflavina en su extracción y que luego interfieren en la determinación, por absorción de la luz activante y, o, fluorescente.

Estas sustancias deben eliminarse y los autores lo logran por medio de una reducción preliminar con NaHSO_3 ó Cl_2Sn y posterior reoxidación de la Riboflavina al aire, cuando se trata de sustancias fluorescentes reductibles.

En caso de pigmentos, se recurre a determinar el alcan-

ce del decrecimiento de la fluorescencia provocado por acción de esos pigmentos sobre una solución tipo de vitamina B₂ agregada a la solución problema, con la cual se efectúa una lectura preliminar.

Las modificaciones propuestas a este método para mejorar su exactitud, se refieren a aspectos parciales del mismo. Consideraremos las distintas etapas:

1.-Extracción de la muestra: Debe lograrse una extracción cuantitativa. La mezcla ácido-acetona es un solvente eficaz (Scott y col. 270). La acetona actúa para floccular suspensiones coloidales y previene la adsorción de la vitamina por proteínas. Su empleo resulta interesante tratándose de muestras que gelifican al ser calentadas en solución. En caso de trigo y productos derivados, Hoffer y col. (271) recomiendan emplear una solución al 25% de ClK en ácido acético al 2%, con lo cual se elimina la adsorción-elución. Una técnica que da buenos resultados es la que recurre a la hidrólisis enzimática (272) y no debe eludirse si posteriormente se realiza la etapa de adsorción-elución, puesto que la Riboflavina combinada no es adsorbida por Florisil. Rosner y col. (1945) (273) aconsejan realizar una incubación de 1 hora con 3% de polidasa a pH 4,5 a 48°C, para lograr una buena digestión. También puede emplearse clarasa o takadiastasa con el mismo objeto (274).

2.-Oxidación: Cuando se trata de materiales con pigmen-

tos no riboflavínicos muy fluorescentes, el método de Hodson y Norris da resultados erróneamente altos. Para obviar esto se sugiere la oxidación de los pigmentos con permanganato y agua oxigenada, en lugar del procedimiento de reducción. Esta oxidación es usada por Roschara (1935) (275) en sus estudios sobre licromos; por Ferrebee (1940) (276) en su método para determinar riboflavina en orina; por Daniel y Norris (1945) (277) para leche, productos lácteos y semillas leguminosas secas, y a partir de entonces por la mayoría de los investigadores. En caso de ensayarse alimentos de baja potencia vitamínica, se aconseja combinar el tratamiento oxidante y el reductor, para lograr una buena purificación de los extractos (Rubin y col, 1945) (278), .

Adsorción -elución: Es una etapa de gran valor, en el caso de tratarse de extractos muy pigmentados.

Euler y Adler (1934) (268) emplean tierra de diatomeas para la adsorción y una mezcla piridina-alcohol metílico-agua para la elución.

Barton y col. (279) emplean tierra de Fuller americana, que consideran mejor que la tierra de Fuller inglesa y que el sulfuro de plomo como adsorbente. Actualmente, la adsorción se realiza más comúnmente en Florisil, un preparado de tierra de Fuller (Conner y Straub, 1941) (280).

Hoffer y col. (1944) (271) recalcan la importancia del Florisil, cuya eficacia como adsorbente conviene controlar para

evitar errores por deficiencia de adsorción. La elución se realiza empleando una solución de piridina al 20% en ácido acético al 2%.

Kodicek y Wang (281) (1949) estimando que la técnica de adsorción no resulta satisfactoria, pues además de ser larga y tediosa provoca pérdidas, proponen eliminar este paso y emplean un colorímetro fotoeléctrico para realizar la lectura sin necesidad de concentrar por adsorción. Usan un filtro azul para la luz incidente y uno amarillo para la emitida. Una técnica similar emplean Barton, Wright y Booth (279) y Scott, Hill y col. (270)

4.-Lectura de la fluorescencia. Solución tipo: Dado que la Riboflavina es sensible a la luz y por lo tanto inadecuada para emplearse como tipo de fluorescencia, se emplean con ese objeto soluciones de fluoresceína sódica. (Weisberg y Levin, 1937) (282). La relación entre la vitamina B₂ y la fluoresceína sódica se muestra en la tabla siguiente: (Gstirner)

Vit. B ₂ γ/cm^3	Fluoresceína sódica γ/cm^3
0.1	0.17
0.2	0.34
0.3	0.51
0.4	0.68
0.5	0.86
0.6	1.03
0.7	1.20
0.8	1.37
0.9	1.54
1.0	1.72

La solución tipo empleada puede ser interna o externa.

Algunos investigadores(270,284) prefieren el patrón interno que elimina algunas dificultades debidas a la atenuación de la fluorescencia.

5.Preparación del blanco:Puede realizarse por irradiación (284,285)por reducción con hidrosulfito;ó por tratamiento alcalino a pH 11(Molaren y col.(1944)(286).El segundo método es el más empleado.

En general puede decirse que siendo mayor la potencia de la muestra, más corto puede ser el método a seguir,exceptuando aquellos casos en que se tengan también gran cantidad de pigmentos que interfieren,en cuyo caso no pueden eludirse las etapas de purificación,y a la inversa pueden presentarse muestras con bajo contenido vitamínico acompañado de pocas sustancias interferentes,siendo entonces posible omitir todos los pasos de purificación.

Método polarográfico

Este método es propuesto por Lingane y Davis(1946)(287) quienes encuentran que la corriente de difusión de Riboflavina en buffer fosfato a pH 7,2 es directamente proporcional a su concentración en un espacio comprendido entre 5×10^{-6} y 10^{-4} M.

Se emplea una técnica polarográfica usual,registrándose las ondas producidas por la vitamina pura en las concentraciones citadas,por medio de un polarógrafo Heyrosky-Shikata.

La Riboflavina da buenas ondas, tanto en soluciones bufereadas como no bufereadas y en una amplitud de pH 4 a 9; pero es preferible realizar las determinaciones a pH vecino a 7 puesto que la vitanina se descompone a pH alcalino.

Con este método puede determinarse Riboflavina en presencia de otros factores del complejo B.

Portillo y Varela (1950) (288) aplican la determinación polarográfica a extractos hepáticos. Estos investigadores comparan la altura de la onda polarográfica producida por una solución de 0,5 ml. de extracto de hígado en 1,5 ml. de KCl 0.1 N conteniendo unos mg. de Na_2SO_3 , con la onda producida por adición de una cantidad conocida de Riboflavina a una solución similar. No se observa interferencia por acción de otros componentes del complejo B; por extractos de mucosa gástrica, etanol, nitrato de estricnina ó procaina-HCl.

Método de la enzima amarilla: Es un método bioquímico que se basa en la medición del aumento de oxígeno producido por adición de Riboflavina al sistema: ácido hexosa fosfórico; coxidohidrogenasa II; apodehidrogenasa y la proteína específica de la enzima amarilla. La velocidad del aumento de oxígeno por minuto, es función de la cantidad de vitanina B_2 agregada al sistema. (Kuhn y Rudy, 1936) (290).

Métodos químicos: Determinación de N total:

Las recientes ediciones de algunas farmacopeas(291), preconizan el dosaje, muy poco selectivo, de N total para controlar la Riboflavina comercial. El requisito que se exige es la presencia de no menos de 14,5%, ni más de 15,2% de N calculado con referencia a la sustancia seca.

El método sigue las líneas de un Kjeldahl: se pesa 0,1 g. de vitamina y se coloca en un balón de cuello largo, al que se agrega 1g. de SO_4Na_2 anhidro; 50mg. de SO_4Cu en polvo y 3,5ml. de H_2SO_4 libre de N. Se calienta primero lentamente y luego más fuerte, hasta decoloración total. Se enfría, agrega agua y alcaliniza para destilar el NH_3 , que se recoge en H_2SO_4 N/10, cuyo exceso se titula con 0,1N/10 en presencia de rojo de metilo como indicador. Debe hacerse una titulación en blanco.

Oxidación per-yódica:

Wickström(1952) (74) realiza un estudio sobre la oxidación per-yódica de Riboflavina, obteniendo resultados aplicables al análisis corriente de control de la vitamina.

En efecto, la Riboflavina es oxidada regularmente por el ácido per-yódico a la temperatura de laboratorio, en proporción de una molécula de vitamina B_2 por 3 de HIO_4 , dando origen a 2 moléculas de ácido fórmico, una de formaldehído, y teóricamente, una molécula de 6,7-dimetil-isoalloxazina-9-acetaldehído, compuesto extremadamente lábil que se descompone en lumiflavina y lumicromo. Titulando el IO_4H reducido, puede dosarse cuantitativamente la Riboflavina.

Método microbiológico:

Desde el descubrimiento del "bios" por Wildiers en 1901, los microorganismos han sido empleados para determinar la presencia de sustancias que favorecen su crecimiento.

Orla-Jensen y col. establecen en 1919, y 1930 (292) el hecho de que las bacterias lácticas requieren medios complejos para su desarrollo. La riboflavina y otros factores son componentes esenciales de esos medios (293) y actualmente se incluyen en un grupo denominado factores de crecimiento, que pueden definirse como compuestos orgánicos que deben estar presentes sólo en pequeñas cantidades para promover el desarrollo de las bacterias. (294).

Dado que el microorganismo exigente es incapaz de multiplicarse cuando hay déficit de uno de sus factores de crecimiento, agregando ese factor al medio se asegura su multiplicación, y ella resulta proporcional a la concentración del factor requerido. Según Lwoff (295) en la vecindad de las dosis límites activas el desarrollo es "sub-máximo" cuando la dosis es "sub-óptima".

Para relacionar la cantidad de factor presente y el crecimiento provocado, puede aplicarse la ley de proporcionalidad, siempre que la respuesta del microorganismo ensayado se evalúe, no sólo por la medida de su desarrollo sino también por la de alguna de sus actividades fisiológicas.

Este concepto constituye la base de los métodos microbiológicos cuantitativos empleados para titular los distintos factores de crecimiento en alimentos, tejidos anormales, sangre, heces, orina, medios bacteriológicos, productos vitamínicos, etc., cuyo desarrollo en los últimos años representa una de las fases más interesantes del empleo de microorganismos.

Las levaduras, fueron los primeros organismos empleados para dosaje de vitaminas B(1919), pero el primer método de titulación empleando bacterias lácticas, data recién del año 1939, y es el propuesto por Snell y Strong para determinar vitamina B₂ por medio de Lactobacillus casei(254).

Numerosas publicaciones posteriores se refieren a la aplicación de este ensayo a distintos tipos de materiales, o estudian determinadas fases del mismo.

También el estudio de las necesidades nutritivas de distintas bacterias, permite la formulación de medios cada vez más específicos y adecuados, lo que conduce al desarrollo de otros ensayos cuantitativos, por ej.:

Acido nicotínico: Snell y Wright(1941)(296); Krehl, Strong y Elvehjem(1943)(297).

Acido pantoténico: Pennington y col.(1943)(298); Skeggs y Wright(1944)(299); Hoag y col.(1945)(300)

Acido fólico: Roberts y Snell(1946)(301); Luckey y col.(1944)(302).

P.A.B.A: Lewis(1942)(303); Landy y Dicken(1942)(303)

Biotina:Shull y col.(1942)(304);wright y Skeggs(1944)(305)

Tiamina:Sarett y Cheldelin(1944)(306).

Posteriormente, con el desarrollo de medios químicos definidos, se puede determinar con exactitud la necesidad de N y de ello surge como consecuencia la aplicación de la técnica microbiológica a la titulación de aminoácidos. (Mc Mahan y Snell(1944)(307);Stokes y col.(1945)(308);Hao y Snell(1945)(309);Gunnness y col.(1946)(310).El empleo de esta técnica resulta de muy especial interés, por no existir métodos químicos sensibles para esas determinaciones.

Las razones del éxito del método microbiológico residen en que su marcha es simple, rápida y económica. Es extremadamente sensible y permite la titulación por medio de muestras muy reducidas. El organismo empleado no es patógeno y su respuesta puede medirse exactamente por titulación turbidimétrica o acidimétrica. Su especificidad sin ser absoluta, es comparable con la del método biológico que emplea animales superiores.

El método de titulación microbiológica de Riboflavina propuesto por Snell y Strong, se desarrolla de acuerdo con las siguientes condiciones:

Emplea como cultivo stock Lactobacillus casei, cuyas necesidades en Riboflavina y otros factores de crecimiento son descritas por Snell y Strong(1937,1938)(311).

Los cultivos se realizan por punción en agar levadu-

ra con 1% de glucosa, realizándose repiques mensuales para mantener la viabilidad de la cepa, que se incuba a 37°C 24 horas y se conserva en heladera.

El inoculum se prepara a partir del cultivo stock, sembrando un tubo con medio base estéril adicionado de 0,5-1 de B₂ por cada 10cc. Se incuba a 37°C-24 horas y luego se centrifugan las células asepticamente, resuspendiéndolas en un volumen igual de solución de ClNa al 0,9%.

Si se realizan ensayos en días sucesivos, no aconseja volver cada vez al stock, sino que puede transferirse una gota de inoculum a un tubo similar que se incuba para el día siguiente.

No deben usarse para inoculum cultivos de más de 36 horas. Recomienda volver al stock cada 5 días, para eliminar las posibilidades de variación o de contaminación bacteriana.

El medio base libre de Riboflavina, contiene:

Peptona tratada con ClNa o irradiada.....	0,5%
Glucosa.....	1. %
Acetato de sodio.....	0.6%
Cistina.....	0.01%
Suplemento de levadura libre de B ₂ equivalente a extracto de levadura.....	0.1 %
Sales inorgánicas.	

La solución standard stock de Riboflavina contiene 100 γ/cc³ de vitamina. Se prepara disolviendo Riboflavina pura cristalizada, en solución de ácido acético 0.02N en caliente. Se conserva en heladera bajo tolueno.

A partir de esta solución se prepara otra más diluída, conteniendo $10 \text{ } \gamma / \text{cm}^3$, para emplear en cada titulación.

El ensayo se lleva a cabo en tubos comunes o bacteriológicos a cada uno de los cuales agrega 5 cm^3 de medio base y una porción alícuota adecuada del extracto conteniendo riboflavina. Si es necesario, diluye luego para llevar a 10 cm^3 de volumen total. Se trabaja con una exactitud de más o menos 0.1 cm^3 .

Se esteriliza en autoclave a una atmósfera, 15 minutos. Enfría y procede a la siembra, que se realiza empleando una gota del inoculum para cada tubo. Se incuba a $37-40^\circ \text{C}$. de uno a tres días.

La curva standard se prepara: por duplicado para niveles de $0.01; 0.05; 0.075; 0.10; 0.15$; y $0.20 \text{ } \gamma \text{ B}_2$ y simple para 0.3 y $0.5 \text{ } \gamma \text{ B}_2$.

Para medir la respuesta bacteriana se sugiere la aplicación de dos métodos:

- 1) Medida de la turbiedad producida por el crecimiento bacteriano, empleando el colorímetro fotoeléctrico Evelyn. Mide el porcentaje de luz incidente transmitida. No puede emplearse cuando se ensayan extractos turbios o muy coloreados.
- 2) Titulación de la acidez producida durante el crecimiento. Se titula con $\text{OHNa } 0.1N$ empleando azul de bromotimol como indicador. La medida de la turbiedad se puede

realizar ya a las 24 horas de incubación pues alcanza entonces un máximo que se mantiene constante 48 horas y luego decrece; la producción de ácido en cambio, aumenta constantemente por 3 o 4 días y las lecturas se efectúan después de 72 horas de incubación, aunque se obtienen prácticamente los mismos resultados empleando tiempos de incubación menores.

Para aplicar el método a productos naturales, se recomienda tratar previamente el material finamente dividido con gran volumen de agua y llevarlo a autoclave por 15 minutos a una atmósfera, o sino efectuar una extracción con HCl 0.1N neutralizando posteriormente. En este caso no deben agregarse más de 50 mg. de ClNa a cada tubo, pues cantidades mayores provocan primero un aumento y luego una disminución de la respuesta del organismo ensayado hacia una cantidad determinada de Riboflavina.

Refiriéndose a la exactitud del método, Snell y Strong nos dicen que una respuesta de crecimiento provocada por el agregado de cualquier material al medio base libre de Riboflavina, puede considerarse como un índice cualitativo de la presencia de este factor en el material ensayado. Siendo confirmado este punto de vista por el alto grado de especificidad del organismo, por la identidad de todas las flavinas aisladas hasta entonces de fuentes naturales y por la completa inactividad de los extractos irradiados

de materiales biológicos.

La exactitud de la respuesta en cuanto a medida cuantitativa, resulta para Snell y Strong más difícil de establecer, ya que puede haber inhibición o estimulación provocadas por otras sustancias introducidas con la muestra a ensayar, no descartando tampoco la posibilidad de la existencia de factores de crecimiento aún desconocidos. Cualquiera sea el caso, consideran que la exactitud del método es de un 10%, pues se han obtenido recuperaciones satisfactorias de Riboflavina pura en presencia de extractos irradiados que contendrían presumiblemente sustancias inhibidoras presentes originalmente, y con respecto a los estimulantes se cree que su acción sobre el crecimiento sería despreciable en un medio que contiene cantidades sub-óptimas de un factor esencial como la Riboflavina.

Se cita como fuente de error la presencia de grandes cantidades de material sólido, aconsejándose en esos casos recurrir a la extracción y realizar una purificación posterior del extracto ensayado cuando no coincidan los resultados obtenidos en los distintos niveles ensayados.

Posteriormente a la publicación de este ensayo microbiológico, aparecen numerosas publicaciones sobre el tema, tendientes a perfeccionar el ensayo en alguno de sus aspectos.

Cepa microbiana: Siendo necesario que el microorganismo empleado en una titulación exija el factor evaluado o

sea fuertemente estimulado por él, se estudian las necesidades de otras bacterias lácticas con respecto a Riboflavina. Se establece entonces que la vitamina B₂ influye sobre el crecimiento bacteriano en forma relativa, y que la dependencia de una determinada especie con la provisión exterior del factor, se relaciona con su capacidad para sintetizarlo de acuerdo con sus necesidades. Mientras que para algunos organismos es esencial, para otros es sólo estimulante y otros lo sintetizan en la medida de sus necesidades o en cantidades mayores.

En 1939, Snell y Strong examinan las necesidades en Riboflavina de 11 especies distintas de bacterias lácticas y encuentran que 4 de ellas la sintetizan, mientras que otras 4 la requieren como factor esencial. Ellas son: Lactobacillus delbrückii; Lactobacillus gangori; Bacterium lactis acidii y Lactobacillus casei.

En 1940 Andersen y Werkman encuentran que la Riboflavina es requerida por un organismo que produce ácido láctico. Wood, Geiger y Werkman, en el mismo año, examinan las necesidades de factores de crecimiento y su inter-relación, en 3 especies de bacterias lácticas (L. mannitolis; L. bruckneri y L. Lycopersis) y encuentran que las vitaminas B₁ y B₂ estimulan el crecimiento de L. mannitolis y L. lycopersis; pero que ninguna es esencial en presencia de la otra. Cuando se omiten ambas el crecimiento no tiene lugar. En caso de cultivos seriados, los organismos se

adaptan a crecer en ausencia de ambos factores.

Recalcan la importancia de que en todo trabajo referente a nutrición de microorganismos se encuentren estos en un estado fisiológico adecuado para lograr efectos claros; puesto que las propiedades de las bacterias son susceptibles de variación dentro de ciertos límites, lo que puede originar variaciones en la respuesta hacia un metabolito dado.

Dunn y col(1947)(314), Shankman y col.(1947)(315) en sus estudios sobre necesidades vitamínicas y de aminoácidos de 23 bacterias lácticas llegan a la conclusión de que la Riboflavina es esencial para L.buchneri; L.delbrückii L.D.5. y L.lycopersici, aunque para este último sólo durante un período de incubación corto. No siendo entonces Lactobacillus casei el único microorganismo para el cual la Riboflavina es esencial, se desarrollan ensayos que preconizan el empleo de otros géneres:

Barton, Wright y Booth(1943)(279): Lactobacillus helveticus.

Price y Graves(1944)(316): Lactobacillus helveticus, estudiando la importancia de la temperatura de incubación sobre la producción de ácido.

Jones y Morris(1950)(317) emplean el mismo organismo obteniendo buenos resultados en ensayos sobre levadura y productos derivados; la incubación la realizan a 37°C durante 17 horas solamente.

Campbell y Hucker(1944)(318):Lactobacillus jagurt.

Woodson y col(1946)(319);Lactobacillus delbrückii;obtienen resultados que comparan favorablemente con los obtenidos con L.casei.

Kornberg,y col(1948)(320):Leuconostoc mesenteroides;organismo que es sensible a 0.0001 γ B₂/ml.

El medio base es otro de los factores muy importantes para la exactitud de un método microbiológico,y a medida que se concretaban las necesidades nutritivas de las bacterias lácticas,su composición se fué modificando.

En el método de Snell comentado,se emplea como fuente nitrogenada peptona tratada con O₂Na e irradiada;deseando lograr una mayor purificación de esa fuente,Snell,Strong y Peterson(1939)(321)reemplazan la peptona por un hidrolizado ácido de caseína purificada,pero como la hidrólisis provoca la destrucción del triptofano,agregan éste al medio que queda compuesto así:

Hidrolizado ácido de caseína		
(libre de vitaminas)	0.5	%
Glucosa	1.	%
Acetato de sodio	0.6	%
Cistina	0.01	%
Triptofano	0.01	%
Riboflavina.....	0.1	p.p.m
Acido pantoténico(cono).....	0.5	p.p.m
Sales minerales.		

Este medio provee un crecimiento muy escaso si se inocula con L.casei;pero con agregado de ácido nicotínico el crecimiento es mayor,aunque no se consigue por subcultivos repe-

tidos en el mismo medio. Esto es evidencia de la existencia de otros factores necesarios. Se investiga su naturaleza suplementando el medio anterior con 0.2 p.p.m. de ácido nicotínico y se demuestra que están incluidas por lo menos tres sustancias: (322) Dos de ellas pueden ser parcialmente separadas por adsorción con carbón activado. Una es adsorbida rápidamente y eluida con dificultad. Se la denomina "norite eluate factor" y se dan luego evidencias de que su actividad se debe al ácido fólico (323). Hutchings y col. (1941) (324) publican más detalles sobre la purificación y propiedades del factor, demostrando que es requerido por algunas bacterias lácticas y propiónicas y sintetizado por otras bacterias lácticas. Estudios posteriores permiten el desarrollo de medios adecuados para su determinación.

La segunda sustancia es adsorbida más lentamente y está constituida por varias materias, siendo biotina la principal. Landy y Dicken (1924) (325) establecen una correlación entre inhibición por avidina y estimulación o necesidad de biotina y determinan por este método que este factor es también esencial para *L. casei*.

La tercer sustancia es Vitamina B₆ que Moeller en 1938 encuentra necesaria para ciertas bacterias lácticas.

A medida que se identifican nutrientes esenciales se los agrega al medio base, ya sea puros o en forma de concentrados, y se sigue investigando.

Aunque L. casei puede crecer por subcultivos continuados en un medio que contiene solamente compuestos cristalinos(326) se citan numerosos factores que estimulan el crecimiento inicial:

Feeney y Strong(1940)(327)comentan que pueden reemplazar el extracto de levadura por una mezcla de compuestos entre los que asparagina y glutamina son los más efectivos.

Stokstad(1941)(328)cita el aislamiento de un nucleótido esencial para L. casei que puede ser reemplazado por una combinación de guanina y timina.

Landy y Dicken(1942)(329)formulan un medio en el que incluyen bases púricas y pirimidínicas como sustancias de crecimiento:adenina,guanina,xantina y uracilo.

Pollack y Lindner(1943)(330)hallan que la glutamina es 10 veces más potente que la peptona.

Light y Clarke(1943)(331)sugieren un medio mejorado por la omisión de extracto de levadura y el agregado de mayor cantidad de glucosa,asparagina y otros nutrientes,con el cual consiguen mejores respuestas en la curva standard.

Chattaway y col(1943)(332)estudian la influencia de constituyentes inorgánicos,llegando a la conclusión de que la producción de ácido puede verse alterada por variación en la concentración de iones Fe^{++} , Ca^{++} , $PO_4^{=}$ y $ClNa$ en el medio.También reconocen la necesidad del agregado de un et

elución de hígado.

Dolby y col. (1944) (333) empleando caseína hidrolizada obtienen mayor crecimiento por adición de leucina, isoleucina y treonina al medio.

Lowry y Bessey (1944) (334) comentan que provocando condiciones más anaeróbicas por agregado de cisteína y reemplazo del aire por CO_2 , se mejora mucho la producción de ácido y presumiblemente el crecimiento de *L. casei*.

Snell y Rannefeld (1945) (335) formulan la composición de un medio que provee un buen crecimiento para las bacterias lácticas y que consta de:

Hidrolizado ácido de caseína.....	5	g	
Acetato de sodio	6	g	
Glucosa	10	g	
Cistina	0.1g		
Triptofano	0.05	g	
Asparagina	0.1	g	
Glutamina	0.1	g	
Riboflavina//.....	200		Y
Pantotenato de calcio	800		Y
Acido nicotínico	500		Y
Clorhidrato de tiamina	200		Y
Biotina	1		Y
Acido fólico	5		Y
Piridoxina(clorh.).....	1		Y
Sulfato de adenina	0.01	g	
Clorh. de guanina.	0.01	"	
Antina	0.01	"	
Uracilo	0.01	"	
K_2HPO_4 y KH_2PO_4	0.5	gc/u	
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2		
NaCl ; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01g.c/u		
Agua	O.s.p.	1000 ml	

Como se observa este medio resulta mucho más complejo que el formulado en 1939 por Snell, Strong y Peterson y su composición es un índice de la cantidad de factores

descubiertos como necesarios para el crecimiento de bacterias lácticas.

Roberts y Snell(1946)(336)citan un medio mejorado que permite mayor crecimiento que el medio original de Snell y Strong y cuya principal variación consiste en que la caseína es digerida enzimáticamente con pancreatina. Este medio permite realizar los ensayos en menos tiempo.

Scott y col.(1946)(337)comunican la existencia de nuevos factores esenciales para L.casei bajo determinadas condiciones. Ellos son: estrepogenina, un factor asociado principalmente con productos animales, y glutatión.

Chattaway y col.(1948)(338)comentan la presencia de factores de crecimiento presentes en el hígado crudo, que difieren de ácido fólico y de los cuales tres son solubles en solución saturada de barita y uno insoluble.

Rickes y col.(1949)(339)observan un notable aumento en la velocidad de crecimiento de L.casei cuando se aumentan los niveles de asparagina, serina y ácido glutámico, lo que está relacionado con el hecho de que estos aminoácidos actúan directa o indirectamente como precursores de estrepogenina.

Stokes y col(1949)(340)determinan el efecto del tamaño, edad y medio de crecimiento sobre la respuesta de L.casei a estrepogenina.

Dunn y Shankmann(1947)(314) comunican que los métodos

microbiológicos que dependen en su especificidad de medios básicos carentes de algunos metabolitos o que sólo poseen concentraciones sub-óptimas de factores esenciales, no resultan generalmente muy exactos y son de utilidad limitada. Siguiendo este criterio se piensa que cualquier modificación que permita mayor crecimiento del organismo ensayado en presencia del factor requerido, aumentaría la especificidad o exactitud del método y la simple obtención de ese mayor crecimiento ha sido suficiente para probar que el medio es "mejorado"; pero aunque esta creencia parece lógica no existen los datos necesarios que la prueben. Por ej. en el medio mejorado de Roberts y Snell (1946) el mayor crecimiento obtenido con relación al medio original empleado por Snell y Strong, no redundaba en una mayor exactitud del método, como lo prueban ensayos comparativos.

No se niega con esto (Snell, 1948) (341) que un buen método no deba proveer un buen crecimiento, pero debe recordarse que éste no es el único objetivo, sino que primordialmente debe tenderse a la obtención de datos exactos y convenientes y que no siempre son idénticas estas dos metas.

Con respecto a la solución standard del factor a titular, Hanson y Weiss (49) realizan un estudio acerca de la solubilidad de la vitamina y de su fluorescencia, y dedu-

con que la dilución puede continuar en aumento hasta 50 p.p.m. pero que en la preparación de las soluciones estándar podría resultar peligroso trabajar con concentraciones mayores de 30 p.p.m.

El paso que incluye la preparación de las muestras a analizar, aunque en realidad independiente de la técnica de titulación en sí, es muy importante para la obtención de valores exactos, por varias razones:

1.-La riboflavina se encuentra presente en los tejidos bajo formas combinadas (monofosfato de flavina; dinucleótido flavin-adenina) y aunque se ha demostrado (342) que algunas de ellas tienen acción sobre el desarrollo del bacilo, es posible que otras no lo tengan y por otra parte resulta siempre conveniente limitar el dosaje a una sola sustancia. Además la Riboflavina es menos susceptible de perderse por adsorción sobre los precipitados en las manipulaciones preparatorias, que lo que lo son algunas de sus combinaciones. (343).

2.-Pueden existir sustancias que interfieren: estimulantes o inhibidoras, y que es conveniente eliminar.

La liberación de la Riboflavina de sus combinaciones se realiza generalmente por una hidrólisis como lo recomienda Snell y Strong (254). La eliminación de las sustancias que interfieren, en cambio, es objeto de estudio ulterior, dado que existen una cantidad de factores que pue-

den ser causa de error, como por ej:

Presencia de sólidos extraños(254); acción inhibitoria de urea(344); factor estimulante presente en sangre(345); ácidos grasos(346); almidón(347).

Los tratamientos preconizados para eliminar estas sustancias son:

Procedimiento de filtración a pH 4,5, sólo, (348) o acompañado de extracción por éter(349).

Tratamiento de los extractos molidos con éter(346).

Digestión con takadiastasa(347)(350).

Con respecto a la esterilización, aunque la acción del autoclavado se efectúa por igual sobre los controles que sobre los materiales a titular, se debe prestar mucha atención a esta etapa, sobre todo en casos en que se tiene un medio complejo, entre cuyos componentes pueden tener lugar interacciones y cambios químicos profundos, cuya naturaleza exacta no se ha determinado aún, pero que pueden afectar el desarrollo de los cultivos empleados.

Según Rabinowitz y col(1957)(351); Niven y col.(1944)(352); Smiley y col(1943)(353), muchas bacterias lácticas no crecen en medios sin autoclavar, y aunque no están perfectamente estudiadas las sustancias producidas que permiten el crecimiento, se cree que ellas derivan de una ruptura parcial del glúcido.

Otros efectos comentados sobre la acción del autoclavado son:

Destrucción de tiamina(Sarett y Cheldelin(1944)(354)

Producción de piridoxamina y piridoxal a partir de piridoxina,por efecto de 10 minutos de autoclavado en un medio determinado(Snell y Rannefeld(1945)(335)

Conversión de piridoxal en piridoxamina por transaminación(Snell)(355).

En lo que concierne a la siembra, en la mayoría de los casos el crecimiento final sólo tiene por factor limitante la concentración de vitamina, y la respuesta no resulta materialmente influida por variaciones en el tamaño de la gota(Snell,1948)(341)

En cuanto a la incubación, Price y Graves(316)realizando estudios con L.helveticus, comprobaron la importancia de la temperatura. En el caso de este organismo, desviaciones de 4 a 5 grados a partir del óptimo, podían causar una disminución en la respuesta equivalente a un 25% menos en la concentración de Riboflavina .Del mismo modo es esencial la uniformidad en la temperatura de incubación, pues gradientes diversos afectarán la pendiente de la curva. A este respecto son convenientes las estufas grandes con aire circulante o los baños agitados; en este caso debe cuidarse que no se imparta vibración a los tubos, lo que ocasionaría variaciones en el crecimiento.

Para la medida de la respuesta microbiana, el procedimiento más generalmente usado es la titrimetría, dado que

el grupo homofermentativo que incluye al L. casei convierte la glucosa casi cuantitativamente en ácido láctico.

Lowry y Bessey(334) adoptan procedimientos empleando microburetas. Aunque el ensayo turbidimétrico es menos ampliamente usado, determinaciones comparativas muestran que también da buenos resultados(356);(357);(336) y es más rápido que la titulación acidimétrica. La única dificultad de su uso estriba en el caso de tratarse de muestras muy coloreadas.

Para efectuar el cálculo de resultados, Snell y Strong (254) llevan a un sistema de coordenadas las distintas concentraciones del standard y las respuestas correspondientes a esas concentraciones y trazan así una curva testigo en la cual se determina por interpolación la cantidad de vitamina presente en la muestra ensayada.

Wood(358) intenta procedimientos matemáticos para reemplazar el método empírico de cálculo. Estos pueden emplearse en los casos en que la curva standard sea una línea recta o pueda transformarse en línea recta. Si estos métodos se combinan con un diseño estadístico, los mismos datos microbiológicos permiten determinar la variancia, y el error standard, por lo cual prometen ser muy valiosos para algunos casos.

-5-

P A R T E
E X P E R I M E N T A L

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

5.-Parte experimental.

1.Fermentación.

a)Selección de la cepa de producción.

Las cepas que de acuerdo con la bibliografía resultan interesantes de estudiar son:

Torula utilis var. thermophyla (171, 175, 176, 177)

Clostridium acetobutylicum (187, 188, 189, 196, 197, 198)

Candida guilliermondii (199, 200, 201)

Candida flareri (201, 202)

Mycocandida riboflavina (203)

Aspergillus flavus (208)

Aspergillus niger (209)

Crebrothecium ashbyi (210-239)

Ashbya gossypii (240-250, 359-363)

Con los datos reunidos por informaciones previas, se seleccionan como potencialmente mejores: Crebrothecium ashbyi y Ashbya gossypii, realizándose también algunos ensayos con Mycocandida riboflavina.

Crebrothecium ashbyi y Mycocandida riboflavina se obtienen de American Type Culture Collection (U.S.A.), correspondiendo a los números 6747 y 11155, respectivamente, de esa colección. Ashbya gossypii proviene del Northern Regional Research Laboratory del Ministerio de Agricultura de E.E.U.U., donde registra bajo el número N.R.R.L. Y.1056.

La cepa original de Crepotthecium ashbyi, se siembra en agar Sabouraud inclinado, de composición:

Glucosa	2%
Peptona	1%
Agar	2%

pH aproximadamente 5.

Se incuba a 27-30°C de 3 a 7 días. Se mantiene a temperatura ambiente, efectuando repiques periódicos una vez por mes. Como se observa, en ocasiones, la formación de dos tipos de colonias: unas de intensa coloración anaranjada y otras amarillo pálidas, se recomienda efectuar los repiques a partir de las colonias más pigmentadas.

Ashbya Rossyvi se siembra en agar inclinado de composición:

Peptona	0.5 %
Ext. de levadura ..	0.3 "
Ext. de malta...	0.3 "
Glucosa	1. "
Agar	2 "

pH alrededor de 6. después de esterilizar.

Se incuba a 27-30°C de 4 a 7 días y se conserva en heladera a 4°C, efectuándose repiques mensuales.

Mycocandida Riboflavina se siembra en agar Sabouraud inclinado, cuya composición se vió más arriba.

Se incuba a 27-30°C de 3 a 5 días y se conserva en heladera a 4°C, efectuándose repiques mensuales.

En las fotografías se observan colonias típicas de las tres especies.

Para observar la influencia de las condiciones de cultivo sobre la pigmentación, se ensayan repiques de las tres cepas en algunos medios de cultivo muy empleados para hongos.

1.-Medio Czapek, modificado por Dox.

Agua destilada	1000 ml.
Nitrato de sodio....	3 g.
Fosfato bipotásico..	1 g.
Sulfato de magnesio..	0.5 g.
Cloruro de potasio .	0.5 g.
Sulfato ferroso	0.05g (o vestigios)
Sacarosa	30. g
Agar	15.

Se disuelven los componentes en agua; se reparte en tubos, se taponan y esterilizan a $3/4$ atmósfera durante 20 minutos.

2.-Medio Gorodkova.

Peptona	1 g.
Ext. de carne ...	1 g.
Cloruro de sodio..	0.5 g.
Glucosa	0.25 g.
Agar	11 g.
Agua destilada...	100. ml.

Se procede igual que en 1.-

3.-Agar-papa glucosado.

Papas cortadas	250 g.
Glucosa	10 g.
Agar	20 g.
Agua	1000 ml.

Las papas peladas se cortan en trozos y se ponen a hervir 50 minutos con el total de agua. Se decanta, filtra por algodón y se completa a volumen de 1000 ml. Se agrega la glucosa y el agar; se funde en autoclave, se filtra y distribuye en tubos. Se esteriliza durante 20 minutos a $3/4$ atmósfera.

4.-Medio Sabouraud. Ya visto.

5.-Medio: Peptona-extracto de malta-extracto de levadura-glucosa-agar: Ya visto.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Ashbya gossypii: Produce colonias amarillas solamente en medio 5; la pigmentación se intensifica por repiques semanales en el mismo medio.

Crebrothecium ashbyi: Sembrado en medio 5 produce colonias mayores y más intensamente coloreadas que la cepa anterior. En medio Sabouraud se observan colonias muy pigmentadas; pero más pequeñas; en medio Gorodkova las colonias son menores aún y apenas coloreadas, adquiriendo, tanto el medio como el agua de condensación, una fluorescencia amarillo verdosa que se pierde por repiques continuados en el mismo medio.

Mycocandida riboflavina: Crece abundantemente sobre medio Sabouraud, dando un desarrollo de aspecto cremoso, que no ofrece casi coloración, observándose sólo un leve tinte amarillento hacia los bordes y una tenue pigmentación en el medio de cultivo. No se observa intensificación de la coloración por efecto de repiques o por variación de medios.

b) Selección de un medio básico.

La composición de los medios que de acuerdo con la bibliografía pueden ser empleados para obtener Riboflavina por fermentación, es la siguiente:

Autor	Fuente de C	Fuente de N	Factores minerales	Factores accesorios.
Wickerham (243)	glucosa, sacarosa, maltosa.	peptona	extracto de levadura.	extracto de levadura y solubles de destilación
Tanner, y col. (250)	glucosa, sacarosa, maltosa.	peptona, residuos de carne, "animal stick liquor" (1)	corn-steep (2)	corn-steep.
Pfeifer, Tanner. (360)	glucosa.	"animal stick liquor"	corn-steep	corn-steep
Smiley y col. (361)	Residuos de destilación alcohólica adicionales de: glúcido fermentescible	"Packing house stick liquor" (1)		
Tanner (362)	Residuos de destilación de fermentación alcohólica adicionados de: glúcido	"animal stick liquor" degradado con papaina.	corn-steep	corn-steep
Koninklijke (363)	glúcido	proteínas vegetales y animales degradadas	corn-steep	corn-steep

1) animal stick liquor: fase líquida condensada obtenida a partir de una digestión de desechos de frigorífico, en agua a presión y alta temperatura; similar a packing house stick liquor.

2) cornsteep: concentrados solubles de maíz, extraídos durante el proceso de maceración a pH aproximadamente 4 y 45-52°C; en presencia de SO_2 y de activa fermentación láctica.

Crehrothecium ashbyi:

Autor	Fuente de C	Fuente de N	Factores minerales	Factores accesorios.
Schopfer (219)	maltosa, sacarosa, glucosa, levulosa.	peptonas bacteriológicas: Byla, Witte Sigfried, bacto-triptona Difco.	Sulfato de magnesio; fosfato de potasio.	biotina, aneurina, inositol, extracto de levadura.
Moore y de Becze (214)	sacarosa	N inorgánico	Nitrato de sodio, fosfato bipo-tásico, sulfato de magnesio, ClK, sulfato ferroso.	-----
Rudert (222)	lipido metabolizable (lecitina)	N proteico.	-----	-----
Pierzma (223)	melaza	proteína animal	-----	extracto de malta.
Allen (229)	melaza	caseína solubilizada.	-----	extracto de malta.
Foster (224)	melaza	N proteico (levadura	sales minerales	-----
Moore y de Becze (225); Stiles (231)	Residuos de destilación alcohólica suplementados.			
De Becze y col. (237)	Residuos de destilación alcohólica mas almidón, N inorgánico y P inorgánico.			
Deseive (226)	glucosa	agua de le-o produc-vadura; mostos que to de cerveza.	la contiene en alto porcentaje.	

Autor	Fuente de C	Fuente de N	Factores minerales	Factores accesorios.
Kinya Na- gao(227)	Germen de arroz u otros granos.			
Rychei Takata (230)	Germen de arroz o de trigo.			
James (232)	Trigo malteado.			
Moss y Klein (228)	Sacarosa parcial- mente in- vertida	Lentejas molidas.		
Chin (234)	Glicerol, Peptona. glucosa, sacarosa.			
Tabenkin (235)	sacarosa	N inor gánico.	CO ₃ Ca., PO ₄ H ₂ K., SO ₄ Mg., SO ₄ Fe., SO ₄ Zn., SO ₄ Cu.	Inositol.

De acuerdo con estos datos se selecciona como medio básico para fermentación aeróbica sumergida, en escala de laboratorio, el siguiente:

Fuente de Carbono: Glucosa comercial

Fuente de Nitrógeno: Peptona.

Factores minerales: Corn-steep.

Factores accesorios: Corn-steep.

Las proporciones relativas de cada componente se varían en cada caso, para establecer el óptimo de rendimiento.

Se trabaja en escala de laboratorio, pues se tienen así condiciones particularmente adecuadas para la experimentación, pudiendo determinarse el óptimo de cada componente o las posibilidades de cada cepa, con mayor facilidad.

La técnica operatoria aplicada para preparar los medios es la siguiente:

Se coloca en un recipiente con agua potable a temperatura de ebullición, la cantidad indicada en cada caso, de peptona, agitando para favorecer su disolución; se agrega luego la glucosa disuelta en un volumen adecuado de agua; se añade el "corn steep" también convenientemente pesado y se mezcla, llevando luego a volumen.

Se ajusta el pH de la solución con HCl 0.1N, primero con un indicador externo en piedra de toque (azul de bromotimol: pH 6.0-7.6; púrpura de bromocresol: 5.2-6.3) y finalmente con el potenciómetro Laed y Northrup Co. Phil. U.S.A.

Se distribuye el medio en Erlenmeyers ó recipientes indicados; se taponan con algodón y gasa, y se procede a esterilizar en autoclave a una atmósfera durante 20 minutos.

Variables para aumentar el rendimiento en Riboflavina.

Los materiales que hay que disponer, y las condiciones de trabajo seguidas para determinar estas variables son las siguientes:

- 1.-Cultivo de la cepa en medio agar como se indica en a)
- 2.-Medio de desarrollo estéril dispuesto en cantidad de 10 ml. en Erlenmeyer de 50 ml.
- 3.-Medio de fermentación estéril dispuesto en cantidad de 100 ml. en Erlenmeyer de 500 ml.

Se siembra asépticamente con un ansa de cultivo sobre medio sólido, un Erlenmeyer conteniendo medio de desarrollo; se incuba a 27-30°C durante 24 horas, con agitación. Con un ml. de este cultivo se siembra otro Erlenmeyer de 50 ml. incubándose igual que anteriormente; al cabo de 24 horas se siembra con 0.5 ml., un medio de fermentación, que se incuba con agitación durante un tiempo variable según la cepa empleada, y extrayendo muestras periódicamente para determinar la producción de Riboflavina por titulación microbiológica, según se indica en II.

(Se consigna en su oportunidad, los casos en que ha sido necesario aplicar alguna variante a esta línea de trabajo.)

1) Las variables físicas estudiadas son: pH, temperatura y agitación.

pH.

Para estudiar esta variable se trabaja con medio de desarrollo de composición:

- glucosa 2%
- peptona 0.5%
- corn-steep... 2.5%

Medio de fermentación:

A.-glucosa 2.5 %	B.-glucosa 4 %
peptona 0.5 %	peptona 0.5 %
corn-steep.. 2.5 %	corn-steep.. 2.5 %

Los ensayos se conducen como se indicó anteriormente.

Ashbya gossypii.

La mayoría de los investigadores emplea un pH inicial comprendido entre 6.5 y 6.8.

Ensayos comparativos a pH 5.7 y 6.7 con medios A y B, conducen a los siguientes resultados, al cabo de 9 días de fermentación, a temperatura de 27-30°C, con agitación.

		pH	
		5.7	6.7
γ B2/ ml	A	243.7	375
	B	200	398

gráfico Nº1.

En los ensayos posteriores se emplea un pH inicial comprendido entre 6.6 y 6.8.

Las variaciones de pH que se observan en el curso de una fermentación con Ashbya gossypii, son las siguientes:

pH inicial	6.7
24 horas	5.1
72 "	4.5
120 "	6.2
216 "(9 días)	7.4

gráfico No 2.

La fase de descenso de pH coincide con la de utilización del glúcido (como se verá al tratar de fuente carbonada), y el ascenso se produce durante la síntesis de la vitamina. En los casos en que se produce contaminación, lo que se caracteriza por el desarrollo de un olor desagradable y no aromático como sucede en condiciones normales, se observa un rápido ascenso de pH por encima de 8. En fermentaciones anormales en que no hay producción de Riboflavina, el pH permanece entre 4.5 y 5.0.

Crebrothecium ashbyi

El pH de los distintos sustratos a partir de los cuales se citan variados rendimientos de Riboflavina con este hongo, abarca desde 4.6 hasta 6.5, llevándose a cabo la

mayor parte de las fermentaciones en una zona comprendida entre 5.5 y 6.5.

Ensayos comparativos con medios A y B a pH 5.5 y 6.5 nos permiten observar un crecimiento más abundante y más rápido a pH 6.5. Los resultados en γ de Riboflavina por ml. al cabo de 8 días de fermentación a 27-30°C, con agitación, son los siguientes.

		pH	
		5.5	6.5
γ B ₂ /ml	A	245	193
	B	97	81

gráfico No 3.

En los ensayos posteriores se emplea un pH inicial aproximadamente 5.5.

Las variaciones de pH que se observan en el curso de una fermentación con *C. ashbyi*, son las siguientes.

pH inicial	5.5
24 horas	5.5
48 horas	4.0
120 horas	6.9
192 horas (8 días)	7.1

gráfico nº 4

El ascenso de pH corresponde a la etapa de producción de vitamina.

Las fermentaciones con Mycocandida Riboflavina en medio A y B a pH 4.5 y 5.5 también conducen a una elevación de pH a valores cercanos a pH 7.0; pero no se obtiene producción de Riboflavina, habiéndose encontrado cantidades de 5 a 10 γ de vitamina por ml., después de 7 días de incubación a 27-30°C, con agitación.

Temperatura:

Según establece la bibliografía consultada, el óptimo de fermentación se logra a una temperatura entre 27-30°C, ya se trate de A. gossypii o C. ashbyi. Para los ensayos se dispone de una estufa provista de un termostato-regulador adecuado, trabajando dentro de ese límite térmico.

En algunas fermentaciones conducidas a temperaturas más elevadas, se constata una gran facilidad de contaminación con rendimientos disminuídos; en cambio, temperaturas inferiores, si bien alargan el período de fermentación, conducen a buenos resultados.

Ashbya gossypii:

Se realizan ensayos con medio B a pH 6.7 inicial.

B₁: temperatura de agitación 23-24°C.

B₂: " " 35-37°C

Resultados obtenidos en γ por ml.

	5º día	7º día	9º día	12 día
B ₁	25	30	150	375
B ₂	25	50	100	100

gráfico No 5

Crebrothecium ashbyi:

Se realizan ensayos con medio A a pH inicial 5.5 y durante un período de fermentación de 7 días, pues no se observa aumento notable en la producción con una incubación más prolongada.

A₁: temperatura de agitación 23-24°C

A₂: " " " 27-30°C

A₃: " " " 37-38°C.

Resultados obtenidos en γ por ml.

	5º día	7º día
A ₁	147.17	190
A ₂	235.	250
A ₃	10.	10

gráfico Nº 6.

Mycocandida riboflavina:

No puede establecerse una relación entre temperatura y producción; porque en todas las condiciones el desarrollo ha sido, precario y los rendimientos ínfimos.

Agitación:

Se realizan ensayos con agitación mecánica y por burbujeo de aire, empleando los dispositivos descritos a continuación:

- 1.- Dos agitadores que se desplazan a razón de 80 y 60 golpes por minuto (que denominamos S_1 y S_2 respectivamente) con un recorrido de 10 cm.
- 2.- Agitador mecánico con cierre de mercurio operando a razón de 50 revoluciones por minuto aproximadamente.
- 3.- Burbujeo de aire estéril enviado desde un compresor a través de glicerina y de un filtro lleno de algodón hidrófugo estéril. La velocidad de aereación es de 0.5 litros de aire por minuto, por litro de medio.

En los casos 2 y 3 se trabaja con balones de 5 litros de capacidad, con una carga de 1 litro de medio, dispuestos

en baño maría a temperatura de 27-30°C.

1.-Se obtienen muy buenos rendimientos en fermentaciones con A.gossypii en S₁; pero al mismo tiempo, la violencia de la agitación favorece la humectación de los tapones, contribuyendo a una más fácil contaminación.

Los rendimientos obtenidos en S₂, si bien algo menores, resultan más homogéneos y hay menos peligro de contaminación.

2 y 3.-Las fermentaciones realizadas con estos procedimientos de agitación, no conducen a resultados satisfactorios, tal vez en el caso 2, por interferencia de la varilla de agitación en el crecimiento del micelio.

Los mismos resultados se obtienen al combinar los dos dispositivos.

Se prefiere emplear, entonces, el agitador S₂, que se desplaza como se dijo, a razón de 60 golpes por minuto. Los rendimientos más elevados se obtienen agregando a esto un burbujeo de aire estéril como se indica en 3. En estas condiciones se alcanza una producción de 927.5 y por ml. con A.gossypii en medio B al que se agrega 2% de glucosa estéril al tercer día de fermentación.

2.- Fuente de Carbono.

Como fuente de Carbono se emplea glucosa comercial variando sus proporciones.

Ashbya gossypii:

Medio de desarrollo: Glucosa 2.5%
Peptona 0.5%
Corn-steep... 2.5

Medio de fermentación: Peptona 0.5 %
Corn-steep.. 2.5 %
Glucosa 1-6 %

Condiciones de trabajo: pH inicial 6.7
temperatura de fermentación: 27-30°C
agitación: 60 golpes p/minuto.

Resultados obtenidos al cabo de 3 días de fermentación:

% Glucosa	1	2	3	4	5	6
Riboflavina por ml.	250	375	399	450	275	224

gráfico No 7.

Por agregado en condiciones asépticas de cantidades adicionales de glucosa (2 g. por ej.) al tercer día de fermentación, según recomienda Pfeiffer, se obtienen resultados de hasta 814.5 γ Riboflavina por ml.

El consumo de glucosa que tiene lugar durante la fermentación, se deduce de las cantidades residuales presentes en un medio que contiene un 4 % inicial de glúcido.

24 horas	0.915 g %
48 horas	0.533 g %

Esto demuestra que hay un consumo rápido de glucosa durante las primeras horas de fermentación, comenzando la síntesis del pigmento una vez que aquella ha sido parcial o totalmente metabolizada.

En caso de fermentaciones que conducen a rendimientos bajos, se observa que la asimilación de glucosa es más lenta, anotándose resultados de:

24 horas....	2.60 g%
48 horas....	2.20

El gráfico siguiente expresa estos resultados:

gráfico Nº 8.

Crebrothecium ashbyi:

Medio de desarrollo: Glucosa..... 2.5 g%
 Peptona 0.5 g%
 Corn-steep.. 2.5 g%

Medio de fermentación: Peptona.... 0.5 g%
 Corn-steep.. 2.5 g%
 Glucosa 1-4%

Condiciones de trabajo: pH inicial: 5.5
 temperatura: 27-30°C
 agitación: 60 golpes por minuto

Resultados obtenidos al cabo de 7 días de fermentación:

% glucosa	1	2	3	4
γ Riboflavina por ml.	51	175	190	80

gráfico No 9.

La asimilación de glucosa que tiene lugar durante la fermentación, se deduce de las cantidades residuales presentes al cabo de 24 y 48 horas de fermentación en un medio conteniendo 3% inicial de glúcido:

24 horas.....	1.26 g%
48 horas.....	0.56 g%

Al igual que lo que sucede con A. Rossynii, la producción de Riboflavina comienza cuando el glúcido es metabolizado.

Mycocandida riboflavina:

Aunque los rendimientos en Riboflavina son ínfimos, se observa que la glucosa es metabolizada rápidamente por el hongo. Los resultados obtenidos son los siguientes a partir de un sustrato conteniendo 4% de glucosa inicial.

24 horas	1.77 g %
48 horas	0.43 g %
72 horas	0.36 g %

gráfico NR 10

3.-Fuente de Nitrógeno.

Como fuente de Nitrógeno se ensaya: peptona de carne, peptona de caseína y peptona bacteriológica Parke Davis.

Ashbya gossypii:

Medio de desarrollo: Glucosa 2.5 g%
Peptona 0.5 g%
Corn-steep.. 2.5 g%

Medio de fermentación: Glucosa 4. g%
Corn-steep 2.5 g%
Peptona: de carne,
de caseína,
Bacteriológica P.Davis

Condiciones de trabajo: pH inicial: 6.7
temperatura: 27-30°C
agitación: 60 golpes por minuto.

Los resultados obtenidos son: los siguientes al cabo de 9 días de fermentación.

Peptona de caseína: 0.5% 23.3 g/ml.
1. % 50.

Peptona de carne : 0.5% 450 g/ml.
1. % 571.2 g/ml
2. % 37.5 g/ml.

Peptona bacteriológica
Parke-Davis. 0.5 % 53. g/ml
1. % 42.8 "
2. % 5. "

gráfico No 11

Cresbrothecium ashbyi:

Se ensaya peptona de carne y peptona ParkeDavis.

El medio de fermentación y de desarrollo consta de:

Glucosa 2 %
 Corn-steep.. 2.5 %
 Peptona: de carne,
 bacteriológica P.Davis.

Condiciones de experimentación:

pH inicial 5.5
 temperatura.... 27-30°C
 agitación 60 golpes por minuto.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Peptona de carne 0.5 %..... 175 g/ml
 1 %..... 275 "

Peptona bacteriológica
 Parke Davis 0.5 %..... 125 g/ml
 1 %..... 141.7 "

gráfico No 12

Mycocandida riboflavina:

Se obtiene desarrollo del organismo, pero no producción de Riboflavina, aún ensayando las peptonas consignadas anteriormente en distintas proporciones.

4.-Factores minerales:

Se emplean dos partidas diferentes de Corn-steep: I y II., cuyo contenido en N total y amínico y suresiduo seco se dan a continuación.

	Residuos seco.	N total líquido res.seco		N amínico líquido r.seco	
Corn-steep I	63.62g%	4.200g%	61603g%	1.312	2.062
Corn-steep II	46.25g%	1.443g%	3.125g%	0.375	1.394

Ashbya gossypii :

Medio de desarrollo: Glucosa2.5 g%
Peptona0.5 g%
Corn-steep I'ó II 2.5g%

Medio de fermentación: Glucosa ...4. g%
Peptona ...0.5 g%
Corn-steep I ó II.. 2-5%

Condiciones de experimentación.

pH : 6.7
temperatura: 27-30 °C
agitación: 60 golpes/minuto.

Resultados obtenidos:

Corn-steep I:	2 %		238	γ Rib./ml.
	3 %		378.5	"
	4 %		4.1	"
	5 %		0.6	"
Corn-steep II:	2 %		550.	"
	3 %		582.5	"
	4 %		19.	"
	5 %		5	"

Generalmente se observa que al aumentar la proporción de cornsteep, las colonias formadas son mayores y más consistentes, al mismo tiempo que disminuyen los rendimientos.

Los resultados anteriores se expresan en el siguiente gráfico:

gráfico No 13

Crebrothecium ashbyi:

Se realizan ensayos con corn-steep II en un medio de fermentación y de desarrollo de composición:

glucosa 2 g%
 peptona 0.5 g%
 corn-steep 2.5-4 g%

Condiciones de experimentación:

pH inicial : 5.5
 temperatura: 27-30°C
 agitación: 60 golpes/minuto.

Los resultados obtenidos son:

Corn steep %	γ Ribof/ml.
2.5	171
3	157
4	108.25

gráfico Nº 14

Mycocandida riboflavina:

No se obtienen rendimientos apreciables de Riboflavina.

5.- Factores accesorios.

Se estudia la acción de P.A.B.A., ácido naftilacético., y ácido nicotínico, sobre la pigmentación y el rendimiento en Riboflavina.

Las primeras observaciones se realizan en el medio agar inclinado 5, al que se adiciona por separado, cada uno de los factores en proporción de 1:1000., 1:10.000., y 1:100.000.

Ashbya gossypii:

P.A.B.A.: en concentración de 1:1000., 1:10.000 y 1:100.000 provoca una intensificación notable de la pigmentación de las colonias, que se tornan anaranjado intenso.

Ac. naftil acético: En concentración 1:1000 actúa inhibiendo el desarrollo.

En concentración de 1:10.000,permite el desarrollo de colonias pequeñas y sin pigmentación.

En concentración 1:100.000,se desarrollan colonias pequeñas,pero intensamente pigmentadas.

Acido nicotínico:Se observan colonias de pigmentación intermedia entre las obtenidas por acción de los dos factores anteriores,no produciéndose inhibición del desarrollo ni aún en concentración de 1:1000.

Crebrothecium ashbyi:

P.A.B.A. No se observa un a intensificación tan notable en la pigmentación,como la registrada en el caso de A.gossypii;en general las colonias son similares a las desarrolladas sobre medio 5 sin suplementar.

Acido naftilacético:En concentración 1:1000 hay inhibición del desarrollo.

En concentración 1:10.000 se desarrollan colonias pequeñas,pero pigmentadas.

En concentración 1:100000,de desarrollan colonias de tamaño similar a las típicas;pero de pigmentación un tanto atenuada.

Acido nicotínico:En concentración de 1;1000 se observa una ligera inhibición en el desarrollo;las colonias son pequeñas,aisladas y con un leve tinte amarillento.

En concentración de 1:10.000 y 1:100.000 las colonias son similares a las típicas en tamaño y coloración.

Mycocandida riboflavina:

P.A.B.A. y Acido nicotínico en todas las concentraciones no provocan la aparición de pigmentación amarilla

Acido naftil acético: en concentración de 1:1000 provoca inhibición del desarrollo; en las demás concentraciones el desarrollo es similar al que se obtiene en medio 5 sin suplementar.

A pesar de la acción favorecedora de la pigmentación observada por acción de P.A.B.A. sobre cepas de A. gossypii y C. ashbyi en los medios sólidos, al realizar los ensayos respectivos en medios líquidos, en condiciones óptimas de fermentación, no se obtienen resultados que indiquen una influencia favorable sobre la producción de Riboflavina.

1. INTRODUCTION

2. SCOPE AND PURPOSE OF THE STUDY

3. METHODS

4. RESULTS AND DISCUSSION

5. CONCLUSIONS

-II-

TITULACION MICROBIOLOGICA

1. OBJETIVO

2. ALCANCE

3. PROCEDIMIENTO

1. <u>PREPARACION DE LA SUSENSION</u>	20
2. <u>SELECCION DEL VOLUMEN</u>	25
3. <u>SELECCION DEL TIEMPO</u>	30
4. <u>SELECCION DEL TEMPERATURA</u>	35
5. <u>SELECCION DEL MUESTRO</u>	40
6. <u>SELECCION DEL MUESTRO</u>	45
7. <u>SELECCION DEL MUESTRO</u>	50
8. <u>SELECCION DEL MUESTRO</u>	55
9. <u>SELECCION DEL MUESTRO</u>	60
10. <u>SELECCION DEL MUESTRO</u>	65

II.-TITULACION MICROBIOLOGICA.

Puesta a punto del método de titulación con Lactobacillus casei.

Principio: El desarrollo de Lactobacillus casei provocado por agregado de Riboflavina a un medio de cultivo sintético deficiente solamente en ese factor, es proporcional a su concentración.

La medida del desarrollo se establece por titulación acidimétrica o turbidimétrica.

Reactivos.

- 1.-Medio de cultivo.
- 2.-Solución standard concentrada de Riboflavina.
- 3.-Solución standard diluida de Riboflavina.
- 4.-German testigo.
- 5.-Inocu lum.
- 6.-Solución de hidróxido de sodio 0.1 N.
- 7.-Solución indicadora de azul de bromotimol
- 8.-Solución reguladora acético-acetato.

1.-Medio de cultivo.

En los primeros ensayos de titulación se empleó el "Riboflavin assay medium" Difco, cuya composición es la siguiente:

Peptona fotolizada	22
Suplemento de levadura ..	2
Bacto dextrosa.....	20
Acetato de sodio	1.8
L.cistina Difco	0.2
PO ₄ K ₂ H	1.
PO ₄ KH ₂	1.
SO ₄ Mg	0.4
NaCl	0.02
SO ₄ Fe	0.02
SO ₄ Mn	0.02

Para preparar el medio empleado en la titulación, se pesan 5 g. de este medio deshidratado, se llevan a 100 ml. con agua destilada y se hierve tres minutos.

Según se ha visto en la bibliografía al respecto, este medio responde aproximadamente a la composición del medio base empleado por Snell y Strong en sus ensayos de titulación.

Las primeras determinaciones realizadas con el medio Difco dieron resultados satisfactorios, consiguiéndose una buena decaída en la curva control; pero posteriormente comenzaron a observarse irregularidades: la curva control con solución de riboflavina standard no proveía crecimiento, que en cambio se producía cuando se le adicionaba extracto de hígado. Como estas anomalías continuaron a pesar de trabajar en condiciones absolutamente controladas, se pensó que podía haberse destruido en el medio base algún factor esencial presente en el extracto de hígado. Se decidió ensayar un medio sintético en el que estuvieran presentes en cantidades óptimas, todos los factores de crecimiento requeridos por *Lactobacillus casei*, según los últimos estudios de sus necesidades nutritivas.

Se prepara a tal efecto un medio que responde a la fórmula indicada por Capps, Hobbs y Fox (1949) (305) con algunas modificaciones. Siendo ensayado con buenos resulta-

dos, se los adopta para las posteriores titulaciones.

Su composición es la siguiente:

1.-Caseína hidrolizada libre de vitaminas	12g.
2.-Dextrosa	40g
3.-Acetato de sodio	20g
4.-Cistina	200 mg
5.-Tryptofano	200 mg
6.-Adenina	10 "
7.-Guanina	10 "
8.-Uracilo	10 "
9.-Xantina	1 "
10.-Tiamina	2 "
11.-Piridoxina	4 "
12.-Acido nicotínico	2 "
13.-d-pantotenato de calcio	0.2 "
14.-Acido fólico	0.1 "
15.-Biotina	0.001"
16.-Acido p.amino benzoico	0.2 "
17.-Tween 80.....	0.25ml.
18.-Fosfato monopotásico	100. mg
19.-Fosfato bibásico de potasio	100. "
20.-Sulfato de magnesio	400. "
21.-Cloruro de sodio	20. "
22.-Sulfato ferroso	20. "
23.-Sulfato de manganeso	20. "
24.-Agua destilada c.s.p.	1000.ml.

Se disuelve en unos 500 ml. de agua destilada, en matríz de 1000 ml., la caseína hidrolizada libre de vitaminas, la dextrosa y el acetato de sodio. Se agrega la cantidad que se indica a continuación de cada una de las soluciones. Se ajusta a pH 6.8-6.9 por adición de HCl 0.1 N y se completa a volumen con agua destilada. Se conserva en heladera bajo tolueno.

Los reactivos empleados para la preparación del medio son los siguientes:

- a.-Caseína hidrolizada libre de vitaminas.
- b.-Solución de cistina y triptofano.
- c.-Solución de adenina, guanina y uracilo.
- d.-Solución de xantina.
- e.-Solución de tiamina, biotina y ácido nicotínico.
- f.-Solución de ácido p. amino benzoico, pantotenato de calcio, piridoxina y ácido fólico.
- g.-Solución reguladora.
- h.-Solución salina.

a.-Caseína hidrolizada libre de vitaminas. (77)

Se hidrolizan 200 g. de caseína libre de vitaminas, con 1000 ml. de HCl al 20%, por ebullición a reflujo durante 8 horas. Se destila al vacío hasta concentración siruposa, se agregan 750 ml. de agua destilada y se repite la destilación. El residuo se disuelve con agua destilada. La solución se ajusta a pH 3 con OHNa y se diluye a 23 litros. La solución se agita con 40 g. de "Norit A" a 50-60°C durante 1 hora y se filtra. Se ajusta el filtrado a pH 8 con OHNa y se completa nuevamente a 2 litros. La solución se conserva en heladera bajo tolueno.

b.-Solución de cistina y triptofano.

Se suspenden 4 g. de d.l.-triptofano ó 2 g. de l-triptofano en unos 700-800 ml. de agua destilada. Se calienta a 70-80°C. y se agrega HCl diluido (1:2) gota a gota y agitando hasta que las dos sustancias se hayan disuelto. Se enfría y adiciona agua destilada hasta 1000 ml. Se conserva bajo tolueno y a temperatura no menor de 10°C. 50 ml. de esta solución se emplean para 1 litro de medio.

c.-Solución de adenina, guanina y uracilo.

Se disuelven en caliente 100 mg. de cada una de las siguientes sustancias: sulfato de adenina, clorhidrato de guanina y uracilo, en 10 ml de HCl al 10%. Se enfría y se lleva a volumen de 100 ml. con agua destilada. Se conserva en heladera bajo tolueno.

10 ml. de esta solución se emplean para un litro de medio.

d.-Solución de xantina.

Se suspenden 2.5 mg. de xantina en 30-40 ml. de agua destilada; se lleva a temperatura vecina a 70°C y se agregan 6 ml. de solución de amoníaco al 10%; se agita hasta completa disolución. Se enfría y lleva a volumen de 200 ml. con agua destilada.

1 ml. de esta solución se emplea para un litro de medio.

e.-Solución de tiamina, biotina y ácido nicotínico.

Se prepara una solución de ácido acético 0.02 N de manera que cada ml. contenga 200 microgramos de clorhidrato de tiamina, 200 microgramos de ácido nicotínico y 10 microgramos de biotina. Se conserva en heladera bajo tolueno y al reparo de la luz.

10 ml. de esta solución se emplean para un litro de medio.

f.-Solución de ácido p. amino benzoico, pantotenato de calcio, piridoxina y ácido fólico.

Se prepara una solución de alcohol neutro al 25% conteniendo por ml. 10 microgramos de ácido p. amino benzoico,

10 microgramos de pantotenato de calcio, 200 microgramos de clorhidrato de piridoxina y 5 microgramos de ácido fólico. Se conserva en heladera.

20 ml. de esta solución se emplean para 1 litro de medio.

g.-Solución reguladora.

Se disuelve 1 g. de fosfato monopotásico y 1 g. de fosfato dibásico de potasio en agua destilada, completando un volumen de 200 ml. Se agregan 11 gotas de HCl y se conserva bajo tolueno.

20 ml. de esta solución se emplean para 1 litro de medio.

h.-Solución salina.

Se disuelven en agua destilada 4g. de sulfato de magnesio ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 0.2g. de ClNa; 0.2g. de sulfato ferroso ($\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 0.2g. de sulfato de manganeso ($\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Se completa a volumen de 200 ml. Se agregan 11 gotas de ácido clorhídrico y se conserva bajo tolueno.

20 ml. de esta solución se emplean para 1 litro de medio.

2.-Solución standard concentrada de Riboflavina

Contiene 25 microgramos de Riboflavina por ml.

Se suspenden 25 mg. de Riboflavina cristalizada en unos 500 ml. de agua destilada; se agrega 1 ml. de ácido acético glacial y se calienta nuevamente hasta disolución. Se enfría a temperatura ambiente y se ajusta a volumen de 1000 ml. con agua destilada. Se conserva en heladera bajo

tolueno y al resguardo de la luz en frascos color caramelo.

3.-Solución standard diluida de Riboflavina.

Se prepara en el momento de usar.

Solución I. Contiene 1 microgramo de Riboflavina por ml.

Se diluye un ml. de solución standard concentrada con agua destilada hasta 25 ml.

Solución II. Contiene 0.1 microgramo de Riboflavina por ml.

Se diluye 1 ml. de la solución I con agua destilada hasta 10 ml.

4.-Germen testigo.

Se emplea el Lactobacillus casei F.M.Strong.Univ.de Wisconsin(A.T.C.C.7469) que se mantiene en agar caldo punción al 2% adicionado de :

Glucosa	0.45 %
Extracto de tomates...	3 %
" " levadura...	0.3%
Hígado 1:100	0.3%
Opovital	6 ml.

El germen se replica mensualmente. Se incuba a 37°C de 24 a 48 horas, y se conserva en heladera hasta el momento de usar.

5.-Inoculua.

Se prepara a partir del cultivo stock, 24 horas antes de ser usado, sembrando un tubo con medio de cultivo I adicionado de 4 microgramos de Riboflavina cada 5 ml. de medio. Se incuba 24 horas a 37°C y luego se diluye al 1% con suero fisiológico estéril.

6.-Solución de OINA 0.1 N.

7.-Solución indicadora de azul de bromotimol.

Se disuelve 1 g. de azul de bromotimol en 15-20 ml. de alcohol. Se agregan 20 ml. de solución de OINA 0.1N., gradualmente y agitando y luego 90 ml. de agua destilada. Se ajusta a pH 6.8, color azul-verdoso, con OINA 0.1N. Se lleva a 1000 ml. con agua destilada.

8.-Solución reguladora acético-acetato.

Se disuelven 5g. de acetato de sodio anhidro, en unos 50 ml. de agua destilada. Se agregan 75 g. de ácido acético glacial y se completa luego a volumen de 100 ml. con agua destilada. El pH de esta solución tampón está entre 4.5 y 4.7.

Procedimiento.

- 1.-Preparación del material.
- 2.-Preparación de las muestras.
- 3.-Preparación de la escala de comparación.
- 4.-Preparación de la escala de ensayo.
- 5.-Esterilización.
- 6.-Inoculación e incubación.
- 7.-Lectura turbidimétrica.
- 8.-Titulación.
- 9.-Cálculo de resultados.

Es importante realizar todas las manipulaciones con poca luz y cubrir los recipientes con un paño negro cuando no se usan.

1.-Preparación del material.

Los tubos, pipetas y recipientes diversos a emplear de-

ben encontrarse en perfectas condiciones de higiene, disponiéndose de pipetas esterilizadas de diámetro uniforme, para efectuar la siembra.

2.-Preparación de las muestras.

a) Cuando se trata de soluciones lípidas, se emplean directamente para diluir; si son turbias se procede a una cuidadosa filtración, y, o, agitación con éter, si resulta necesario para evitar interferencia de materiales liposolubles

b) Si se tienen extractos concentrados en polvo o en pasta, se prepara una solución al 10% P/V y luego se opera como en a).

c) En caso de tratarse de titulación de fermentaciones, es necesario proceder previamente a la liberación de la Riboflavina del micelio del hongo. Se colocan 10 ml. de la muestra en Erlenmeyer de 125 ml. y se añade 1 ml. de Tampón acetato, procediéndose a la hidrólisis en autoclave 30 minutos a una atmósfera. Luego se filtra para evitar la presencia de material sólido que actúa desfavorablemente. Con las muestras así obtenidas se procede a realizar las diluciones correspondientes.

Dilución del preparado:

Solución muestra N° 1.: Dilución 1:100

Solución original	0.1 ml.
Agua destilada	9.9

Solución muestra N° 2.: Dilución 1:1000

Solución N° 1 ... 0.5 ml.
Agua destilada .. 4.5 ml.

Solución muestra N° 3: Dilución 1:10.000

Solución N° 2 ... 0.5 ml.
Agua destilada .. 4.5 ml.

En caso de tratarse de muestras muy concentradas, lo que se aprecia por el color y la fluorescencia de las soluciones, se procede a realizar una dilución mayor 1:100000:

Solución N° 3 ... 0.5 ml.
Agua destilada .. 4.5 ml.

A la inversa, se recurre a diluciones de 1:10 en el caso de tratarse de muestras de muy débil potencia. Lo esencial es lograr que varios niveles de la escala de ensayo puedan ser comparados con la curva standard.

3.-Preparación de la escala de comparación.

Esta escala se prepara por duplicado, acompañando a cada ensayo.

Tubo	Solución standard II	Agua destilada	Medio de cultivo	Microgramos de Riboflavina.
1	2.0 ml.	-	2.0 ml.	0.2
2	1.5 "	0.5 ml	2.0 ml	0.15
3	1.0 "	1.0 "	2.0 "	0.10
4	0.8 "	1.2 "	2.0 "	0.08
5	0.6 "	1.4 "	2.0 "	0.06
6	0.5 "	1.5 "	2.0 "	0.05
7	0.4 "	1.6 "	2.0 "	0.04
8	0.3 "	1.7 "	2.0 "	0.03
9	0.2 "	1.8 "	2.0 "	0.02
10	0.1 "	1.9 "	2.0 "	0.01
T	-	2.0 "	2.0 "	-

4.-Preparación de la escala de ensayo.

No es necesario prepararla por duplicado, pues cada uno de los distintos niveles ensayados, constituye una lectura independiente de la misma titulación.

Tubo	Solución muestra N°1	Solución muestra N°2	Solución muestra N°3	Agua dest.	Medio ml.	Dilución final.
1	1.0	-	-	1.0	2.0	1:100
2	0.5	-	-	1.5	2.0	1:200
3	0.2	-	-	1.8	2.0	1:500
4	-	1.0	-	1.0	2.0	1:1000
5	-	0.5	-	1.5	2.0	1:2000
6	-	0.2	-	1.8	2.0	1:5000
7	-	-	1.0	1.0	2.0	1:10000
8	-	-	0.5	1.5	2.0	1:20000
9	-	-	0.2	1.8	2.0	1:50000

5.-Esterilización.

Se mezcla el contenido de cada tubo por agitación y se tapona con algodón y gasa. Se autoclava a una atmósfera, durante 12 minutos.

8.-Inoculación e incubación.

a) Cuando los tubos están a temperatura ambiente, se adiciona asépticamente 0.2 ml. de inoculum a cada tubo, empleando pipetas estériles de diámetro uniforme.

Se flamea la boca de cada tubo, para disminuir al mínimo el riesgo de contaminación.

Es conveniente emplear pipetas con punta a bisel en ángulo de 60°, para que puedan colocarse casi horizontalmente al efectuar la siembra.

b) Se incuba a 37°C durante 48 horas, en la oscuridad.

Todos los tubos deben ser mantenidos exactamente a igual temperatura. El tiempo de incubación puede extenderse 18 horas o disminuirse en 12 horas, sin que afecte apreciablemente los resultados; que en cambio pueden alterarse, si no se extreman en esta etapa, las condiciones de asepsia y de uniformidad.

7.- Lectura turbidimétrica.

Se utiliza como medida del desarrollo bacteriano.

a) Se agita bien cada tubo para suspender uniformemente los microorganismos, y se deja reposar luego para evitar la presencia de burbujas de aire.

b) Se mide la turbiedad en un colorímetro fotoeléctrico, que se describe más adelante, sin descontar de las lecturas el valor del ensayo en blanco.

c) Se construye una curva standard con los valores turbidimétricos obtenidos en la escala de comparación, relacionando densidad turbidimétrica con microgramos de Riboflavina.

Para realizar estas lecturas turbidimétricas, se emplea el colorímetro fotoeléctrico Fisher. Modelo A.C.

FISHER

- A. Control de intensidad
- B. Cero inicial
- C. Dial control
- D. Boton de lámpara
- E. Perilla
- F. Filtro
- G. Galvanómetro
- P. Plataforma
- T. Tubos

Es un instrumento de precisión diseñado para medir cuantitativamente, la transmisión o absorción de la luz por distintos líquidos o soluciones.

La corriente para su funcionamiento puede provenir de cualquier línea alternada de 110-115 voltios y 60 ciclos/

El principio de su funcionamiento es el siguiente: La luz de la lámpara del fotómetro se transmite a través de una solución coloreada, dando sobre una fotocélula que genera así una corriente. Esta corriente se mide en un circuito potenciométrico, comparándola con la corriente que genera una segunda célula foto-eléctrica, que es iluminada directamente por la misma lámpara del fotómetro.

El porcentaje de luz que permite propagar la solución, se halla por comparación con la transmisión 100% que se obtiene, cuando la luz se transmite, en idénticas condiciones, a través de agua destilada o de solvente puro. El uso de dos fotocélulas iluminadas por la misma lámpara, hace posible una completa compensación de las fluctuaciones de voltaje de la línea normal, que son las responsables de la inexactitud de los instrumentos con una sola fotocélula.

El botón A (parte inferior izquierda de la figura) es el control de intensidad. Cuando el instrumento no está en uso, este control debe mantenerse en posición "off"

con lo cual se apaga la lámpara dentro del aparato y se cortan los circuitos terminales del galvanómetro, protegiendo al mecanismo de posibles daños por golpes o vibraciones.

El botón B (parte inferior derecha de la figura) es el Cero inicial, llamo así porque se usa para obtener la primera lectura ó lectura inicial del galvanómetro.

El botón C (centro de la figura) es el Dial Control y el D, el botón de Lámpara.

Encima de C, hay una ventana transparente, a través de la cual pueden verse iluminadas, dos escalas: la superior logarítmica, la inferior dividida en unidades que van desde 100% a 10%, al girar el dial en sentido contrario a las agujas de reloj; cada unidad representa una variación de 1% en la propagación de la luz a través de una solución.

Más arriba se observa el galvanómetro G, del cual puede apreciarse una escala translúcida iluminada con una línea índice y una aguja que se desplaza. El botón correspondiente al galvanómetro, es el llamado ajuste Cero.

Detrás del galvanómetro se encuentra el alojamiento del filtro E, que puede ser cambiado según el caso, levantando la manija plástica de que está provisto.

La parte derecha posterior del instrumento alberga la célula fotoeléctrica de medición y las células de absorción. Este compartimento se abre levantando la perilla F. Los tubos para colocar la solución a medir, se colocan

en el instrumento por medio de un soporte que se mantiene en la posición correcta sobre la plataforma P. Esta plataforma se desliza sobre dos rieles de acero, con lo cual se dispone de un medio rápido y conveniente para intercambiar la célula o tubo de absorción, conteniendo el solvente de referencia o el agua destilada, con la célula o tubo que contiene la solución a medir. Esta operación puede realizarse sin necesidad de levantar la perilla E. El movimiento horizontal de la plataforma mencionada, se ve limitado por dos topes regulables; estando la plataforma contra el primer tope, se hace la lectura del blanco y estando contra el segundo, se hace la lectura de la solución a ensayar.

El Control de intensidad A, es múltiple y varía la intensidad desde posición A a D, aumentando a medida que el botón gira en el sentido de las agujas de reloj.

Dado que todos los filtros no permiten la transmisión de iguales cantidades de luz, el ajuste adecuado del control de intensidad, produce una condición tal que la intensidad de la luz filtrada que alcanza finalmente la célula de absorción, es aproximadamente constante, no importa cual sea el filtro usado. El ajuste adecuado de dicho control para todos los filtros, lo indica el fabricante en cada caso.

El botón P controla la lámpara. Este no debe ser nunca apretado, o dejado en posición "on" más tiempo que el necesario para hacer ajustes y lecturas.

Una extensa serie de experimentos ha probado que la lámpara alcanza una condición adecuada en pocos segundos. En cualquier posición del control de intensidad, la lámpara opera con un voltaje menor que el normal, aumentando así la vida útil de la lámpara, ya que el filamento no está sujeto a la temperatura máxima.

Las operaciones necesarias para efectuar las lecturas turbidimétricas, son las siguientes:

- 1) Colocar el aparato en una superficie nivelada y libre de vibración.
- 2) Conectar a una corriente alternada de 110-115 voltios y 50-60 ciclos.
- 3) Colocar en posición el filtro adecuado.
- 4) Colocar el control de intensidad A en posición ajuste de galvanómetro, y girar el botón para ajuste a 0, de modo que la aguja del galvanómetro coincida exactamente con la línea índice.
- 5) Colocar el control de intensidad A en la posición designada por el filtro a usar.
- 6) Colocar un tubo de absorción con solución de referencia, agua destilada, por ej., en la parte posterior de la plataforma P, y otro conteniendo la solución a medir en la parte anterior. Empujar la plataforma dentro del compartimento, hasta que quede en contacto con el tope del frente, lo que permite hacer la lectura para la solución de referencia. Cerrar la puerta del compartimento.

7) Ajustar el dial control C, hasta obtener una lectura de 0 en la escala inferior correspondiente. Presionar el botón de la lámpara. Ajustar el Cero inicial, hasta que la aguja del galvanómetro quede de nuevo en la línea índice, sin tendencia a desplazarse, lo que indica que se ha alcanzado un estado de equilibrio.

8) Sin soltar el botón de la lámpara D, empujar la plataforma, hasta que toque el tope trasero, lo cual permite hacer la lectura de la solución ensayo. La aguja del galvanómetro sufrirá una deflexión.

9) Girar el dial control C hasta que la aguja del galvanómetro vuelva a la línea índice.

10) Hacer la lectura y anotar. Después de efectuada la lectura, puede controlarse nuevamente el cero inicial.

Valores de lecturas turbidimétricas de escalas de comparación obtenidas en el electrofotómetro Fisher descrito y curvas control promedio construidas con dichos valores:

Escala de Comparación Nº 1

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	Albúmina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	42.7	42.5
2	1.5	0.15	40	41.7
3	1.0	0.10	36.7	33.3
4	0.8	0.08	35	31.2
5	0.6	0.06	30.5	23.7
6	0.5	0.05	29	27.5
7	0.4	0.04	27.5	23.7
8	0.3	0.03	25.7	23.5
9	0.2	0.02	23.6	21.7
10	0.1	0.01	21.5	13.2
11	--	--	4.5	4.7

Escala de Comparación Nº 2

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	45.9	45.5
2	1.5	0.15	44.7	44.5
3	1.0	0.10	32	31
4	0.8	0.08	27.7	27.3
5	0.6	0.06	25.2	23.3
6	0.5	0.05	21.7	21.2
7	0.4	0.04	19.5	19.5
8	0.3	0.03	20	18.9
9	0.2	0.02	16.4	16.1
10	0.1	0.01	16.6	15
11	--	--	4.5	4.3

Escala de Comparación No 3

Tubo No	ml. Sol. Stank. II	γ Riboflavina per tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.20	42.3	44.3
2	1.5	0.15	40.5	40
3	1.0	0.10	27.5	27.6
4	0.3	0.03	24.7	24.4
5	0.6	0.06	20.6	21.1
6	0.5	0.05	18.5	18
7	0.4	0.04	17.5	16.7
8	0.3	0.03	16	15
9	0.2	0.02	14.7	13
10	0.1	0.01	12.2	12.2
11	--	--	1.	1

Escala de Comparación NR 4

Escala de Comparación NR 4

Tubo No	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	50.2	50.1
2	1.5	0.15	43	46.7
3	1.0	0.10	32.1	35.6
4	0.3	0.03	31.3	30.2
5	0.6	0.06	26.3	26.3
6	0.5	0.05	24.2	23.6
7	0.4	0.04	22.7	22
8	0.3	0.03	17	16.6
9	0.2	0.02	16.7	15.5
10	0.1	0.01	13.4	13
11	--	--	3.2	3.2

Escala de Comparación Nº 5

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	56	56.5
2	1.5	0.15	49.5	49.3
3	1.0	0.10	36	40
4	0.8	0.08	32.5	35.5
5	0.6	0.06	29.6	28.8
6	0.5	0.05	25.2	23.8
7	0.4	0.04	23.3	23.5
8	0.3	0.03	21	20.3
9	0.2	0.02	17.3	17.5
10	0.1	0.01	17.2	14.5
11	--	--	6.5	6.6

Escala de Comparación Nº 6

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	43	45.1
2	1.5	0.15	34	35.5
3	1.0	0.10	27.5	23
4	0.8	0.08	25.9	23
5	0.6	0.06	23.8	21
6	0.5	0.05	21	13.4
7	0.4	0.04	17.4	17.2
8	0.3	0.03	17.5	17.6
9	0.2	0.02	15.1	15.7
10	0.1	0.01	12.6	12.2
11	--	--	4.6	4

Escala de Comparación Nº 7

Tubo Nº	ml.Sol.Stand.II	Y Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	40.1	33
2	1.5	0.15	36	36.1
3	1.0	0.10	32.2	32.7
4	0.8	0.08	29.7	27.5
5	0.6	0.06	25.5	26.7
6	0.5	0.05	23.9	24.6
7	0.4	0.04	23.3	23
8	0.3	0.03	19.7	20.6
9	0.2	0.02	15.6	17.9
10	0.1	0.01	12	13.2
11	--	--	4.7	4.9

Escala de Comparación Nº 3

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	49.5	48.8
2	1.5	0.15	35.5	34.7
3	1.0	0.10	33	31.8
4	0.8	0.04	35	33.7
5	0.6	0.06	29	29.5
6	0.5	0.06	28.9	28.7
7	0.4	0.04	28.4	28
8	0.3	0.03	25.8	25
9	0.2	0.02	25.2	24.5
10	0.1	0.01	22.2	19.1
11	--	--	4.8	4.6

Escala de Comparación nº 9

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	50.1	49
2	1.5	0.15	45.5	43
3	1.0	0.10	35.5	33.5
4	0.8	0.08	29.5	30.8
5	0.6	0.06	23	22.9
6	0.5	0.05	19	19.9
7	0.4	0.04	17.5	17.7
8	0.3	0.03	16	15.7
9	0.2	0.02	11.5	13.5
10	0.1	0.01	9	9.9
11	--	--	1.3	1.5

Escala de Comparación Nº 10

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.20	53	54
2	1.5	0.15	51.3	53.5
3	1.0	0.10	42.6	45
4	0.8	0.08	41	41
5	0.6	0.06	32.5	37
6	0.5	0.05	31.5	30.5
7	0.4	0.04	30	29
8	0.3	0.03	27.5	27
9	0.2	0.02	24.5	25.7
10	0.1	0.01	20.5	23.5
11	--	--	6.4	6.3

Escala de Comparación Nº 11

Tubo No	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	47.5	47.3
2	1.5	0.15	45.7	44.5
3	1.0	0.10	43.1	42.7
4	0.3	0.03	40	42.5
5	0.6	0.06	37.5	39
6	0.5	0.05	36.2	34.5
7	0.4	0.04	35	33.5
8	0.3	0.03	32	31.5
9	0.2	0.02	26	29.5
10	0.1	0.01	22.1	26
11	--	--	6.5	6.3

Escala de Comparación Nº 12

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	Y Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	50.5	50.7
2	1.5	0.15	43	44
3	1.0	0.10	35.5	37.5
4	0.8	0.08	30	32
5	0.6	0.06	25	23
6	0.5	0.05	24.1	27.5
7	0.4	0.04	23.2	26.7
8	0.3	0.03	22	25.5
9	0.2	0.02	21	23
10	0.1	0.01	17	17.2
11	--	--	4.5	4.6

Escala de Comparación Nº 13

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	51.5	51.2
2	1.5	0.15	38.3	36.5
3	1.0	0.10	33	30.7
4	0.8	0.08	30	28.2
5	0.6	0.06	27.5	26.5
6	0.5	0.05	23	22.5
7	0.4	0.04	20.2	18.8
8	0.3	0.03	18.5	16.2
9	0.2	0.02	15.5	14.7
10	0.1	0.01	11	13.5
11	--	--	5.2	5.4

Escala de Comparación Nº 14

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	41	41.5
2	1.5	0.15	40.5	39.7
3	1.0	0.10	35.7	34.5
4	0.8	0.08	34.5	32
5	0.6	0.06	26.2	27
6	0.5	0.05	23	23.5
7	0.4	0.04	22	21.5
8	0.3	0.03	18	17
9	0.2	0.02	16.1	15
10	0.1	0.01	15	14.5
11	--	--	3.4	3.3

Escala de Comparación N° 15

Tubo N°	ml. Sol. Stand. II	γ Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0.2	0.2	65	61.3
2	1.5	0.15	59.8	60
3	1.0	0.10	46.3	48.8
4	0.3	0.03	43	42
5	0.6	0.06	39	40
6	0.5	0.05	35.1	39.1
7	0.4	0.04	33.4	38.3
8	0.3	0.03	31.6	32.1
9	0.2	0.02	29.4	29.3
10	0.1	0.01	27.2	27.1
11	--	--	7.7	7.5

milimicrogramos Ribo, Colano

Nº 1

Nº 2

mitimicrogramas Rboflavina

Lectura

50

40

30

20

10

0.01

0.02

0.03

0.04

0.05

0.06

0.08

0.10

0.15

0.20

0.25

0.30

0.35

0.40

0.45

0.50

0.55

0.60

0.65

0.70

0.75

0.80

micromicrogramos Riboflavina

Nº 3

milimicrogramos Fibroflavina

N 4

Nº 5

multistriatus Fibosarino

Nº 6

Andimicropodanus R. boesjainae

Nº 7

multinucleolamos Ribosoma

milimicrogramos Riboflavina

Nº 8

Nº 9

multimicrogramas Piboferrina

Nº10

Monococcus Riboflavinus

multimicrogrammes Riboflavina

Nº 11

milimicrogramos Riboflavina

Nº12

Leitura

mitomycina B. Riboflavin

Nº13

Nº 14

milímetros mos. Tibolagins

microrreos Rhofores

Nº 15

B.- Titulación.

Se emplea en algunos ensayos, como medida del desarrollo bacteriano; pero siendo más rápidas, sencillas e igualmente exactas las lecturas turbidimétricas, se les da preferencia, adoptándolas finalmente para todas las determinaciones.

- a) Se transfiere el contenido de cada tubo a un Erlenmeyer de 125ml., lavando el tubo dos veces con unos 10 ml. de agua destilada, y adicionando los lavados al Erlenmeyer.
- b) Se agrega 0.2ml. de solución de indicador azul de bromotimol y se titula con solución de CHNa 0.1N hasta color verde (pH 6.8), conservando el primer Erlenmeyer como referencia del punto final.
- c) Se construye una curva standard con los valores titrimétricos de la escala de comparación, relacionando ml. de solución de CHNa 0.1N con microgramos de Riboflavina.

Valores de lecturas titrimétricas de escalas de comparación y curvas standard promedio respectivas.

Escala de Comparación Nº 16

Tubo Nº	ml.Sol.Stand.II	Riboflavina por tubo	ml. CHNa 0.1 N	
			A	B
1	2.0	0.2	1.70	1.74
2	1.5	0.15	1.59	1.61
3	1.0	0.10	1.42	1.46
4	0.8	0.08	1.32	1.33
5	0.6	0.06	1.21	1.23
6	0.5	0.05	1.14	1.16
7	0.4	0.04	1.03	1.13
8	0.3	0.03	0.96	0.98
9	0.2	0.02	0.96	0.95
10	0.1	0.01	0.91	0.83
11	--	--	0.03	0.07

Escala de Comparación Nº 17

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	Riboflavina	ml. CINA 0.1 N	
		por tubo	A	B
1	2.0	0.2	2.14	2.13
2	1.5	0.15	1.93	1.96
3	1.0	0.10	1.77	1.73
4	0.8	0.08	1.62	1.64
5	0.6	0.06	1.54	1.50
6	0.5	0.05	1.37	1.33
7	0.4	0.04	1.34	1.32
8	0.3	0.03	1.24	1.26
9	0.2	0.02	1.12	1.13
10	0.1	0.01	0.79	0.80
11	--	--	0.14	0.15

Escala de Comparación Nº 13

Tubo Nº	ml. Sol. Stand. II	Riboflavina por tubo	ml. OHNa 0.1 N	
			A	B
1	2.0	0.2	1.98	1.97
2	1.5	0.15	1.45	1.47
3	1.0	0.10	1.32	1.33
4	0.8	0.08	1.21	1.19
5	0.6	0.06	1.11	1.13
6	0.5	0.05	1.05	1.10
7	0.4	0.04	0.90	1.01
8	0.3	0.03	0.97	0.96
9	0.2	0.02	0.89	0.91
10	0.1	0.01	0.84	0.86
11	--	--	0.12	0.13

Escala de Comparación Nº 19

Tubo Nº	ml.Sol.Stand.II	Riboflavina	ml. CHNa 0.1 n	
		por tubo	A	B
1	2.0	0.2	3.36	3.37
2	1.5	0.15	3.11	3.13
3	1.0	0.10	2.72	2.74
4	0.3	0.03	2.53	2.54
5	0.6	0.06	2.35	2.38
6	0.5	0.05	2.23	2.29
7	0.4	0.04	2.17	2.20
8	0.3	0.03	2.20	2.19
9	0.2	0.02	1.97	1.96
10	0.1	0.01	1.83	1.80
11	--	--	0.42	0.41

Escala de Comparación nº 20

Tubo Nº	ml.Sol.Stand.II	Riboflavina por tubo	Lectura	
			A	B
1	2.0	0.2	1.75	1.76
2	1.5	0.15	1.63	1.67
3	1.0	0.10	1.45	1.47
4	0.8	0.08	1.37	1.33
5	0.6	0.06	1.07	1.15
6	0.5	0.05	1.13	1.13
7	0.4	0.04	1.09	1.12
8	0.3	0.03	1.03	1.04
9	0.2	0.02	1.01	1
10	0.1	0.01	0.92	0.97
11	--	--	0.11	0.11

ml. 0.044
No. 1

3

2

1

micromycetozoa

Nº 16

ml. 0.01
No. 1

ml. microgramos Thiopentone

Nº 17

ml. $\text{OH} \cdot \text{H}_2$
No. 1

3

2

1

CONTADOR MARCA REGISTRADA

milimicrogramas Riboflavin

Nº 18

5

10

15

20

25

ml. 0.1N NaOH
No. 1

milimicropipetas Riboflavina

Nº 19

ml. 0.044
no. 1

3

2

1

0.01

0.02

0.03

0.04

0.05

0.06

0.08

0.10

0.15

0.20

micromicrogramas Riboflavina

N-20

5

10

15

20

25

9.- Cálculo de resultados

a) Se determina el contenido en Riboflavina de cada tubo de la escala de ensayo, interpolando en la curva standard, los valores turbidimétricos o acidimétricos correspondientes. Para que el ensayo sea satisfactorio, por lo menos 4 a 6 tubos deben caer en la parte útil de la curva.

b) Se calcula de acuerdo con la dilución correspondiente, el contenido de Riboflavina por ml. de solución muestra. El valor final representa un promedio de los valores obtenidos en los distintos niveles, siempre que ellos no difieran entre sí en más de un 20%.

Ejemplo de algunas determinaciones efectuadas en distintas muestras:

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard N° 1.

Muestra: N° 1

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib/tubo	γ Rib/ml
1	1/100	52	--	--
2	1/200	50.5	--	--
3	1/500	50	más de 0.2	--
4	1/1000	39	0.135	135
5	1/2000	30	0.064	128
6	1/5000	23.8	0.035	135
7	1/10000	20.2	0.013	130
8	1/20000	11.7	menos de 0.1	--
9	1/50000	B		

Promedio: 127,5

Contiene: 127,5 γ Rib./ml.

Muestra: N° 5

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	56.2	--	--
2	1/200	53	--	--
3	1/500	46.5	--	--
4	1/1000	45	más de 0.2	--
5	1/2000	38.2	0.125	250
6	1/5000	28	0.049	245
7	1/10000	23.5	0.034	240
8	1/20000	19.3	0.012	240
9	1/50000	11.8	menos de 0.01	--

Promedio: 243.75

Contiene: 243.75 γ Rib./ml.

Titulación turbidimétrica.Curva de Concentración Standard No 2.

Muestra: No 15

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/1000	50.5	más de 0.2	--
2	1/2000	42.5	0.143	236
3	1/5000	23.7	0.058	290
4	1/10000	13.7	0.023	280
5	1/20000	15.7	0.0142	234
6	1/50000	13.1	menos de 0.01	--
7	1/100000	9.7	--	--
8	1/200000	5.5	--	--
9	1/500000	4.8	--	--

Promedio: 232.5

Contiene: 232.5 γ Rib./ml

Muestra: No 16

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	56	--	--
2	1/200	56	--	--
3	1/500	53	--	--
4	1/1000	51.3	más de 0.2	--
5	1/2000	43.2	0.177	354
6	1/5000	36.2	0.072	360
7	1/10000	19.3	0.035	350
8	1/20000	16	0.013	360
9	1/50000	13.5	menos de 0.01	--

Promedio: 356

Contiene: 356 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.

Curva de Comparación Standard N°3.

Muestra: N° 47

Tubo	Solución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	53	--	--
2	1/200	30.6	0.111	22.2
3	1/500	13	0.043	24
4	1/1000	14.2	0.023	23
5	1/2000	12.5	0.012	24
6	1/5000	3.3	menos de 0.01	--
7	1/10000	4.7	--	--
8	1/20000	4.2	--	--
9	1/50000	4.2	--	--

Promedio: 23.3

Contiene: 23.3 γ Rib./ml

Muestra: N° 48

Tubo	Solución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	55.2	--	--
2	1/200	35.5	0.131	26.2
3	1/500	19.9	0.056	23
4	1/1000	15.2	0.023	23
5	1/2000	14.5	0.021	23
6	1/5000	9.2	--	--
7	1/10000	5.7	--	--
8	1/20000	4.7	--	--
9	1/50000	4.7	--	--

Promedio: 27.55

Contiene: 27.55 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard Nº 4.

Muestra: Nº 75

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/1000	54.8	--	--
2	1/2000	51	más de 0.2	--
3	1/5000	36.7	0.114	570
4	1/10000	25.7	0.053	530
5	1/20000	16.7	0.023	560
6	1/50000	13.7	0.0115	575
7	1/100000	10.2	menos de 0.01	--
8	1/200000	4.3	--	--
9	1/500000	4.7	--	--

Promedio: 571.25

Contiene: 571.25 γ Rib./ml

Muestra: Nº 77

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	53	--	--
2	1/200	53.2	--	--
3	1/500	56	--	--
4	1/1000	55.5	más de 0.2	--
5	1/2000	46	0.162	324
6	1/5000	27	0.063	315
7	1/10000	13	0.032	320
8	1/20000	14.7	0.0155	310
9	1/50000	12.3	--	--

Promedio: 317.25

Contiene: 317.25 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard N° 5.

Muestra: N° 120.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	58	--	--
2	1/200	56.5	más de 0.2	--
3	1/500	55.5	0.20	100
4	1/1000	42.2	0.119	119
5	1/2000	27.5	0.057	114
6	1/5000	13.2	0.022	115
7	1/10000	13.3	menos de 0.01	--
8	1/20000	14.2	--	--
9	1/50000	13.3	--	--

Promedio: 112

La muestra fué previamente diluida al medio.

Contiene: $112 \times 2 = 224$ γ Rib./ml

Muestra: N° 121

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	57	--	--
2	1/200	56.5	más de 0.2	--
3	1/500	50	0.16	30
4	1/1000	36.7	0.037	37
5	1/2000	34	0.043	36
6	1/5000	17.5	0.019	95
7	1/10000	15	menos de 0.01	--
8	1/20000	12.5	--	--
9	1/50000	9.2	--	--

Promedio: 37

La muestra fué previamente diluida al medio.

Contiene: $37 \times 2 = 74$ γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard No 6.

Muestra: No 160.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	52	--	--
2	1/200	45.9	más de 0.2	--
3	1/500	28.7	0.103	54
4	1/1000	19.9	0.05	50
5	1/2000	16.8	0.0245	49
6	1/5000	11.4	--	--
7	1/10000	8.7	--	--
8	1/20000	5.2	--	--
9	1/50000	5.3	--	--

Promedio: 51

Contiene: 51 γ Rib./ml

Muestra: No 161

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/10	59.7	--	--
2	1/20	59.5	--	--
3	1/50	54	--	--
4	1/100	53.1	--	--
5	1/200	45.2	más de 0.2	--
6	1/500	23.2	0.102	50
7	1/1000	21.5	0.057	57
8	1/2000	16.7	0.026	52
9	1/5000	9.1	--	--

Promedio: 53

Contiene: 53 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard No 7

Muestra: No 223

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	42.2	--	--
2	1/200	41.5	más de 0.2	--
3	1/500	39.2	0.20	100
4	1/1000	31.5	0.094	94
5	1/2000	24.9	0.054	108
6	1/5000	17	0.022	110
7	1/10000	13.1	menos de 0.01	--
8	1/20000	11.8	--	--
9	1/50000	7.6	--	--

Promedio: 103

Contiene: 103 γ Rib./ml

Muestra : No 224

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	44.2	--	--
2	1/200	40.9	--	--
3	1/500	39.5	más de 0.2	--
4	1/1000	35.6	0.142	142
6	1/2000	27.5	0.070	140
6	1/5000	19.8	0.029	145
7	1/10000	14.2	0.014	140
8	1/20000	10.5	menos de 0.01	--
9	1/50000	6.9	--	--

Promedio: 141.75

Contiene: 141.75 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard Nº 3.

Muestra: N° 229.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib/ml
1	1/100	65.3	--	--
2	1/200	65	--	--
3	1/500	63.2	--	--
4	1/1000	55	más de 0.2	--
5	1/2000	49	0.2	400
6	1/5000	32	0.072	360
7	1/10000	23	0.039	390
8	1/20000	13.5	menos de 0.01	--
9	1/50000	6.3	--	--

Promedio: 383.3

Contiene: 383.3 γ Rib./ml

Muestra: N° 230

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib/ml
1	1/100	65	--	--
2	1/200	63.4	--	--
3	1/500	57.2	más de 0.2	--
4	1/1000	42.5	0.157	157
5	1/2000	31	0.063	136
6	1/5000	25.5	0.031	155
7	1/10000	22.5	0.015	150
8	1/20000	11.7	menos de 0.01	--
9	1/50000	5.2	--	--

Promedio: 147.75

Contiene: 147.75 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard Nº 2

Muestra: Nº 235

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	53	--	--
2	1/200	51	más de 0.2	--
3	1/500	35.9	0.104	104
4	1/1000	21.5	0.056	112
5	1/2000	12.7	0.021	105
6	1/5000	10	0.0112	112
7	1/10000	5.8	menos de 0.01	--
8	1/20000	4.7	--	--
9	1/50000	4.6	--	--

Promedio: 103.25

Contiene: 103.25 γ Rib./ml

Muestra: Nº 236

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	53	--	--
2	1/200	52.9	más de 0.2	--
3	1/500	44.8	0.15	75
4	1/1000	23.2	0.075	75
5	1/2000	17.2	0.039	78
6	1/5000	11.5	0.016	80
7	1/10000	8.2	menos de 0.01	--
8	1/20000	5.7	--	--
9	1/50000	5.2	--	--

Promedio: 77

Contiene: 77 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard No 10.

Muestra No 251.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/1000	56.2	--	--
2	1/2000	54.5	más de 0.2	--
3	1/5000	53.2	0.18	900
4	1/10000	42.5	0.093	930
5	1/20000	30.7	0.049	930
6	1/50000	24.2	0.018	900
7	1/100000	18.5	menos de 0.03	--
8	1/200000	14.6	--	--
9	1/500000	10.4	--	--

Promedio: 927.50

Contiene: 927.50 γ Rib./ml

Muestra: No 252

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	53	--	--
2	1/200	54.8	--	--
3	1/500	54	más de 0.2	--
4	1/1000	50.2	13.5	135
5	1/2000	38.5	14.4	144
6	1/5000	27	14.5	145
7	1/10000	19.5	menos de 0.01	--
8	1/20000	10.8	--	--
9	1/50000	9.7	--	--

Promedio: 141.33

Contiene: 141.33 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard No 11.

Muestra: No 273.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/10	62	--	--
2	1/20	53.7	más de 0.2	--
3	1/50	47.4	0.2	10
4	1/100	41.6	0.032	8.2
5	1/200	38.2	0.059	11.8
6	1/500	30.5	0.027	13.5
7	1/1000	22	menos de 0.01	--
8	1/2000	14	--	--
9	1/5000	9.9	--	--

Promedio: 10.3

Contiene: 10.3 γ Rib./ml

Muestra: No 275

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/10	59	--	--
2	1/20	54.5	--	--
3	1/50	49.3	--	--
4	1/100	47.9	más de 0.2	--
5	1/200	37	0.056	11.2
6	1/500	31.2	0.023	14
7	1/1000	24.2	0.01	10
8	1/2000	15.7	menos de 0.01	--
9	1/5000	12.9	--	--

Promedio: 11.7

Contiene: 11.7 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard No 12

Muestra: No 305

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	42.5	0.142	14.2
2	1/200	34.5	0.093	19.6
3	1/500	21.3	0.027	13.5
4	1/1000	19.2	0.014	14
5	1/2000	14.4	menos de 0.01	--
6	1/5000	11.6	--	--
7	1/10000	8.7	--	--
8	1/20000	5.3	--	--
9	1/50000	5.2	--	--

Promedio: 15.3

Contiene: 15.3 γ Rib./ml

Muestra: No 306

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	44.5	0.13	13
2	1/200	29.3	0.075	15
3	1/500	22.2	0.025	12.5
4	1/1000	13.7	0.013	13
5	1/2000	12.8	menos de 0.01	--
6	1/5000	8.6	--	--
7	1/10000	5.3	--	--
8	1/20000	5.3	--	--
9	1/50000	5.1	--	--

Promedio: 14.6

Contiene: 14.6 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard Nº 13.

Muestra: Nº 320.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	53	--	--
2	1/200	55.4	--	--
3	1/500	54	más de 0.2	--
4	1/1000	46.2	1.32	132
5	1/2000	31.7	0.10	200
6	1/5000	20	0.041	205
7	1/10000	14.3	0.019	190
8	1/20000	8.5	menos de 0.01	--
9	1/50000	5.2	--	--

Promedio: 194.25

Contiene: 194.25 γ Rib./ml

Muestra: Nº 322.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	59	--	--
2	1/200	56.8	--	--
3	1/500	53.2	--	--
4	1/1000	52.2	más de 0.2	--
5	1/2000	43.2	1.71	342
6	1/5000	36.2	0.063	315
7	1/10000	18.2	0.033	330
8	1/20000	14.2	0.016	320
9	1/50000	5.4	menos de 0.01	--

Promedio: 326.75

Contiene: 326.75 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard No 14

Muestra: No 344

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	51	--	--
2	1/200	48	--	--
3	1/500	43	--	--
4	1/1000	40.5	más de 0.2	--
5	1/2000	32	0.17	170
6	1/5000	19.7	0.077	154
7	1/10000	15.3	0.035	175
8	1/20000	--	0.016	160
9	1/50000	--	--	--

Promedio: 164.75

Contiene: 164.75 γ Rib./ml

Muestra: No 345

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/10	12.5	--	--
2	1/20	12.3	--	--
3	1/50	12.3	--	--
4	1/1000	6.8	--	--
5	1/2000	6.7	menos de 0.01	menos de 0.01
6	1/5000	5.8	--	--
7	1/10000	5.8	--	--
8	1/20000	5.6	--	--
9	1/50000	5.7	--	--

Contiene menos de 0.01 γ Rib./ml

Titulación turbidimétrica.Curva de Comparación Standard No 15

Muestra: No 357.

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	65.2	--	--
2	1/200	65	--	--
3	1/500	63.2	0.2	100
4	1/1000	47.7	0.11	110
5	1/2000	37	0.05	100
6	1/5000	29	0.019	95
7	1/10000	25.5	--	--
8	1/20000	17.2	--	--
9	1/50000	12.5	--	--

Promedio: 101

Contiene: 101 γ Rib./ml

Muestra: No 358

Tubo	Dilución	Lectura	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	74.1	--	--
2	1/200	65	--	--
3	1/500	62.3	0.194	97
4	1/1000	49.3	0.109	109
5	1/2000	35.5	0.047	94
6	1/5000	29.5	0.021	105
7	1/10000	25.2	menos de 0.01	--
8	1/20000	16.3	--	--
9	1/50000	12.3	--	--

Promedio: 101

Contiene: 101 γ Rib./ml

Titulación acidimétricaCurva de Comparación Standard Nº 16

Muestra: Nº 45

Tubo	Dilución	ml OHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	1.86	--	--
2	1/200	1.74	más de 0.2	--
3	1/500	1.62	0.173	89
4	1/1000	1.32	0.078	78
5	1/2000	1.16	0.046	92
6	1/5000	0.95	0.196	95
7	1/10000	0.83	menos de 0.01	--
8	1/20000	0.77	--	--
9	1/50000	0.72	--	--

Promedio: 83.5

Contiene: 83.5 γ Rib./ml

Muestra: Nº 46

Tubo	Dilución	ml OHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	2.54	--	--
2	1/200	2.49	--	--
3	1/500	2.33	--	--
4	1/1000	1.83	más de 0.2	--
5	1/2000	1.40	0.009	130
6	1/5000	1.65	0.172	860
7	1/10000	1.36	0.031	810
8	1/20000	1.12	0.042	340
9	1/50000	0.85	menos de 0.01	--

Promedio: 836.6

Contiene: 836.6 γ Rib./ml

Titulación acidimétricaCurva de Comparación Standard Nº 17

Muestra: Nº 84

Tubo	Dilución	ml.OHNa 0.1 N	γRib./tubo	γRib./ml
1	1/100	3.81	--	--
2	1/200	3.72	--	--
3	1/500	2.72	más de 0.2	--
4	1/1000	1.90	0.132	132
5	1/2000	1.53	0.063	126
6	1/5000	0.17	0.024	120
7	1/10000	0.90	0.013	130
8	1/20000	0.51	menos de 0.01	--
9	1/50000	0.51	--	--

Promedio: 127

Contiene: 127 γRib./ml

Muestra: Nº 85

Tubo	Dilución	ml.OHNa 0.1 N	γRib./tubo	γRib./ml
1	1/100	2.60	--	--
2	1/200	2.53	--	--
3	1/500	2.30	más de 0.2	--
4	1/1000	2.11	0.194	194
5	1/2000	1.72	0.094	188
6	1/5000	1.30	0.037	185
7	1/10000	1.14	0.019	190
8	1/20000	0.51	menos de 0.01	--
9	1/50000	0.48	--	--

Promedio: 189.25

Muestra diluida previamente al medio.

Contiene: $189.25 \times 2 = 378.50$ γRib./ml

Titulación acidimétricaCurva de Comparación Standard Nº 18

Muestra: Nº 135

Tubo	Dilución	ml. OHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	2.47	--	--
2	1/200	2.38	--	--
3	1/500	2.25	--	--
4	1/1000	2.17	más de 0.2	--
5	1/2000	1.95	0.198	396
6	1/5000	1.18	0.076	380
7	1/10000	0.98	0.042	420
8	1/20000	0.89	0.02	400
9	1/50000	0.75	menos de 0.01	--

Promedio: 399

Contiene: 399 γ Rib./ml

Muestra: Nº 136

Tubo	Dilución	ml. OHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	2.53	--	--
2	1/200	2.41	--	--
3	1/500	2.30	--	--
4	1/1000	2.15	más de 0.2	--
5	1/2000	1.90	0.193	386
6	1/5000	1.21	0.081	405
7	1/10000	0.98	0.042	420
8	1/20000	0.91	0.021	420
9	1/50000	0.80	menos de 0.1	--

Promedio: 407.75

La muestra fué previamente diluída al medio.

Contiene: 407.75 x 2 = 814.50 γ Rib./ml

Titulación acidimétrica.Curva de Concentración Standard Nº 12

Muestra: Nº 131

Tubo	Dilución	ml. OHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	3.62	--	--
2	1/200	3.53	más de 0.2	--
3	1/500	3.21	0.163	94
4	1/1000	2.71	0.093	93
5	1/2000	2.27	0.045	90
6	1/5000	1.92	0.017	85
7	1/10000	1.63	menos de 0.01	--
8	1/20000	1.25	--	--
9	1/50000	0.31	--	--

Promedio: 91.75

Contiene: 91.75 γ Rib./ml

Tubo	Dilución	ml. OHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	4.25	--	--
2	1/200	4.05	--	--
3	1/500	3.75	--	--
4	1/1000	3.59	--	--
5	1/2000	3.27	más de 0.2	--
6	1/5000	2.87	0.12	600
7	1/10000	2.35	0.057	570
8	1/20000	2.15	0.023	560
9	1/50000	1.32	0.012	600

Promedio: 582.50

Contiene: 582.50 γ Rib./ml

Titulación acidimétrica
Curva de Comparación Standard No 20

Muestra: No 193

Tubo	Dilución	ml. CHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	2.23	--	--
2	1/200	1.97	más de 0.2	--
3	1/500	1.65	0.142	71
4	1/1000	1.42	0.035	85
5	1/2000	1.10	0.042	84
6	1/5000	0.83	0.016	80
7	1/10000	0.73	menos de 0.01	--
8	1/20000	--	--	--
9	1/50000	--	--	--

Promedio: 80

Contiene: 80 γ Rib./ml

Muestra: No 194

Tubo	Dilución	ml. CHNa 0.1 N	γ Rib./tubo	γ Rib./ml
1	1/100	2.39	--	--
2	1/200	2.17	--	--
3	1/500	1.96	más de 0.2	--
4	1/1000	1.73	0.199	199
5	1/2000	1.48	0.107	214
6	1/5000	1.10	0.042	210
7	1/10000	1.01	0.022	220
8	1/20000	0.79	menos de 0.01	--
9	1/50000	--	--	--

Promedio: 210.75

Contiene: 210 γ Rib./ml

-III

PURIFICACION
y
CONCENTRACION de RIBOFLAVINA.

1. 100 g de extracto de levadura	1.000
2. 100 g de extracto de levadura	1.000
3. 100 g de extracto de levadura	1.000
4. 100 g de extracto de levadura	1.000

III. Purificación y concentración de Riboflavina

a) Ensayos de adsorción.

- 1) Con Carbón.
- 2) Con Bentonita.
- 3) Con solución saturada de ácido benzoico en etanol.

1) Con Carbón.

Se mide en probetas de 100 ml. contapa, 50 ml. de medio proveniente de fermentación, tratado previamente como se indicó en el punto "c" de preparación de muestras para ensayo microbiológico.

Este medio contiene 327 γ Riboflavina /ml., y su pH es de 4.7. Se agregan cantidades graduales de Carbón adsorbente. Se agita enérgicamente durante 5 minutos. Se filtra por filtro seco desechando los primeros 20 ml. Se titulan microbiológicamente los líquidos provenientes de la filtración.

Ensayo N°.	1	2	3	4	5	6
g. Carbón %	0.5	1	2	3	5	10
B ₁₂ /ml. en el filtrado.	375	100	2.6	0.5	<0.1	<0.1
% adsorbido.	59.65	99.22	99.74	99.95	>99.95	

Con los resultados obtenidos se construye el siguiente gráfico.

gráfico N° 15.

2) Con Bentonita.

Se mide en probetas de 100 ml. con tapa, 50 ml. de medio proveniente de fermentación, tratado previamente en la misma forma que para ensayo de adsorción con Carbón.

Su título en Riboflavina corresponde a 250 γ /ml, y su pH es 4.7. Se agregan cantidades graduales de Bentonita; se agita enérgicamente durante 5 minutos. Se filtra por filtro seco desechando los primeros 20 ml. Se titulan microbiológicamente los líquidos provenientes de la filtración.

Ensayo No.	1	2	3	4	5	6
g. Bentonita%	0.5	1	2	3	5	10
γ B./ml en el filtrado.	127	37.5	6	1.7	1.7	1.7
% adsorbido.	50	85	93	99.32	99.32	99.32

Con los resultados obtenidos se construye el siguiente gráfico:

gráfico No 16.

3) Solución saturada de ácido benzoico en etanol.

Se mide en probetas de 100 ml. con tapa, 50 ml. de medio proveniente de fermentación, tratado previamente en la misma forma que para ensayo de adsorción con Carbón.

su título en Riboflavina corresponde a 250 γ /ml. y su pH es 4.7. Se agregan cantidades graduales de solución saturada de ácido benzoico en etanol (22%), correspondiendo a concentraciones de 2, 4, 5, 10 y 20 % de ácido benzoico. Se agita enérgicamente durante 5 minutos. Se filtra por filtro seco desechando los primeros ml. Se titulan microbiológicamente los líquidos provenientes de la filtración.

Ensayo No	1	2	3	4	5
g.ác. benzoico%	2	4	5	10	20
γ B ₂ /ml en el filtrado.	243	240	230	227	227
% adsorbido.	0.8	4	8	9.2	9.2

Con los resultados obtenidos se construye el siguiente gráfico.

b) Elución de los adsorbatos por diferentes disolventes

Se realizan ensayos con:

- 1) Etanol-agua.
- 2) Acetona-agua.
- 3) Piridina-agua.
- 4) Piridina-agua-etanol; piridina-agua-metanol.
- 5) Ácido cítrico a distintos pH.
- 6) Sol. ácido bórico 20%; sol. benzoato de sodio 50%; glicerol-agua; ácido fórmico diluido.

1) Etanol-agua:

Se adsorbe con Carbón al 3% una solución conteniendo 250 γ B₂/ml. El adsorbato se seca en estufa a 100° y se emplea para los ensayos de elución.

Se eluye 1g. de adsorbato con 25 ml. de:

- 1. Alcohol de 96°
- 2. " 70°
- 3. " 40°
- 4. " 30°
- 5. Agua destilada.

Eluyente y adsorbato se dejan en contacto 10 minutos a temperatura ambiente y agitando. Se filtra y titula microbiológicamente el filtrado.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Ensayo N°.	1	2	3	4	5
γ B ₂ /ml.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

2) Acetona-agua

Se eluye 1 g. de adsorbato con 25 ml. de:

- 1. Acetona pura.
- 2. 1 Vol. acetona + 1 Vol. agua
- 3. 1 Vol. acetona + 2 Vol. agua
- 4. 1 Vol. acetona + 4 Vol. agua.
- 5. Agua destilada.

Eluyente y adsorbato se dejan 10 minutos en contacto a temperatura ambiente y agitando. Se filtra y se titula microbiológicamente el filtrado.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Ensayo N°.	1	2	3	4	5
γB_2 /ml.	0.1	1.7	0.5	0.1	0.1

3) Piridina-agua:

Se adsorbe con Carbón al 3%, una solución conteniendo 108,25 B_2 /ml. El adsorbato se seca en estufa a 100°C y se emplea para los ensayos de elución siguientes.

Se eluye 1 g. de adsorbato con 20 ml. de:

1. Agua destilada.
2. 4 Vol. agua + 1 piridina
3. 3 Vol. agua + 1 piridina
4. 2 Vol. agua + 1 piridina
5. 1 Vol. agua + 1 piridina.

Adsorbato y eluyente se dejan en contacto 10 minutos a temperatura ambiente y agitando. Se filtra y se titula el filtrado microbiológicamente.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Ensayo N°	1	2	3	4	5
γB_2 / ml.	0.1	33.25	32	33	39.25

4) Piridina-agua-etanol:piridina-agua-metanol:

De la misma manera que en el ensayo anterior se realizan eluciones con las mezclas siguientes;

6. 4 Vol. agua + 1 Vol. etanol + 1 Vol. piridina
 7. 3 Vol. agua + 1 Vol. etanol + 1 Vol. piridina
 8. 2 Vol. agua + 1 Vol. etanol + 1 Vol. piridina
 9. 1 Vol. agua + 1 Vol. etanol + 1 Vol. piridina.
 10. 4 Vol. agua + 1 Vol. metanol + 1 Vol. piridina
 11. 3 Vol. agua + 1 Vol. metanol + 1 Vol. piridina
 12. 2 Vol. agua + 1 Vol. metanol + 1 Vol. piridina.
 13. 1 Vol. agua + 1 Vol. metanol + 1 Vol. piridina

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Ensayo No	6	7	8	9	10	11	12	13
$\gamma_{B_2}/ml.$	13.5	23	19.6	16.3	11.9	15	19.3	17.1

Con los resultados de 3) y 4) se construye el gráfico siguiente.

gráfico No 13

5) Acido cítrico a distintos pH.

Se adsorbe con Carbón al 3% una solución conteniendo 250 γ B₂/ml. El adsorbato se seca en estufa a 100°C y se emplea para realizar el ciones con soluciones de ácido cítrico.

Las soluciones se preparan al 5 y al 10 %,ajustando su pH a valores de 2.,3.,4.,5.,y 6 por agregado de solución de CHNa.

1 g. de adsorbato se extrae con 20 ml. de cada una de estas soluciones,manteniendo en contacto 10 minutos con agitación.los ensayos se realizan a temperatura ambiente y a temperatura de ebullición.Se filtra y se titula microbiológicamente.

Los resultados obtenidos son los siguientes.

Solución de ácido cítrico 5%.

Ensayo No.	pH	Temperatura ambiente.	Temperatura de ebullición
1	2	Menos de 0.1 γ B ₂ /ml	Menos de 0.1 γ B ₂ /ml
2	3	" " "	" " "
3	4	" " "	" " "
4	5	" " "	" " "
5	6	" " "	" " "

Solución de ácido cítrico 10%

Ensayo Nº	pH	Temperatura ambiente	Temperatura de ebullición.
1	2	Menos de 0.1 γ_{B_2}/ml	Menos de 0.1 γ_{B_2}/ml
2	3	" "	" "
3	4	" "	" "
4	5	" "	" "
5	6	" "	" "

6).El mismo adsorbato empleado para realizar las eluciones con ácido cítrico, se trata con los eluyentes siguientes:

1.Solución de ácido bórico al 20% (5 ml. para lg. de adsorbato.)

2.Solución de benzoato de sodio al 50%. (5 ml. para lg. de adsorbato.)

3.Mezcla en partes iguales de agua y glicerol (5 ml. para lg. de adsorbato)

4.Acido fórmico diluido 1:5 (5 ml. para lg. de adsorbato)

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Ensayo Nº	1	2	3	4
$\gamma_{B_2}/ml.$	1.15	0.7	2.1	1.1

CONCLUSIONES

6.-Conclusiones.

1.-Se han estudiado las siguientes cepas productoras de vitamina B₂ por fermentación:

Ashbya gossypii N.R.R.L. Y.1056

Cerebrothecium ashbyi A.T.C.C. 6747

Mycocandida riboflavina A.T.C.C. 11155

Se recomienda por sus mejores resultados Ashbya gossypii. Los rendimientos obtenidos con C. ashbyi, si bien inferiores, se logran en un período de fermentación algo más corto, por lo cual su empleo puede resultar de interés en función del tiempo.

2.-Se recomienda para Ashbya gossypii, la siguiente composición del medio de fermentación:

glucosa comercial	4	g
peptona de carne	0.5	g
corn-steep II	3.	g

Es importante el agregado de cantidades adicionales de glucosa entre las 48 y 72 horas de fermentación, así como también, el ensayo de cada partida de corn-steep con respecto a su influencia sobre la producción, puesto que además de ser fuente de N, lo es de factores minerales y accesorios en cantidades variables, lo que hace variar sus posibilidades con relación a los rendimientos.

3.-El mecanismo de agitación que se considera más eficaz es el que se obtiene por acción de un agitador mecánico que se desplaza a razón de 60 golpes por minuto, con un recorrido de 10 cm., adicionado de burbujeo de aire estéril a razón de 0.5 l. de aire/l. de medio/minuto.

4.-Se ha puesto a punto la técnica de titulación microbiológica de Riboflavina propuesta por Snell y Strong empleando Lactobacillus casei A.T.C.C. 7469 como germen testigo.

Son factores de valor destacado en este ensayo:

- a.-La composición del medio de cultivo.
- b.-Las condiciones de mantenimiento de la cepa stock y la preparación del inoculum.
- c.-La preparación de las muestras a ensayar.
- d.-La homogeneidad en la esterilización, inoculación e incubación.

5.-Se ha estudiado la técnica de concentración por adsorción ensayándose los siguientes adsorbentes: Carbón, bentonita, y solución saturada de ácido benzoico en etanol. Se recomienda carbón en proporción del 3%.

6.-Se han ensayado una serie de eluyentes:

- a.-Etanol-agua; b.-Acetona-agua; c.-Piridina-agua; d.-Piridina-agua-etanol; e.-Solución de

ácido cítrico al 5 y 10% a pH 2,3,4,5 y 6;f.-Solución
de ácido bórico al 20%;Solución de benzoato de sodio al
50%;mezcla en partes iguales de agua y glicerol;ácido
fórnico diluido 1:5.

B. J. J.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Comunica do del "Council on Pharmacy and Chemistry."
J. Am. Med. Assoc., 108, 1340 (1937)
- 2.-OSBORNE T.B. y MENDEL L.B. J. Biol. Chem., 15, 311 (1913)
- 3.-FITZETT A.D. y McKIN L.H. J. Biol. Chem., 32, 409 (1917)
- 4.-MITCHELL H.H. J. Biol. Chem., 40, 399 (1919)
- 5.-FITZETT A.D. y LEROY C.O. J. Biol. Chem., 32, 257 (1919)
- 6.-FUNK C. y DUBIN H. J. Biol. Chem., 42, 437 (1921)
- 7.-BLEYER B. y KALLMANN O. Biochem. Z., 155, 54 (1925)
- 8.-MCCOLLUM E.V., SIMMONDS H. y BEKKER E.J. Biol. Chem.,
62, 547 (1925)
- 9.-HAUGE S.M. y CARRICK C.W. J. Biol. Chem., 62, 403 (1926)
- 10.-SMITH H.I. y HENDRICK E.G. U.S. Pub. Health Repts.,
41, 201 (1926)
- 11.-GOLDBERGER J. y col. U.S. Pub. Health Repts., 41, 207
(1926)
- 12.-SALMON M.D. J. Biol. Chem., 73, 483 (1927)
- 13.-HASSAN A. y DRUMMOND J.C. Biochem. J., 21, 653 (1927)
s/ cita 272.
- 14.-CHICK H. y ROSCOE H.H. Biochem. J. 21, 698 (1927)
s/cita 272.
- 15.-HOGAN G. y HUNTER J.P. J. Biol. Chem., 73, XVII (1928)
- 16.-WILLIAMS R.R. y WATTMAN R.E. J. Biol. Chem., 73, 311
(1928)
- 17.-WARBURG O. y CHRISTIAN W. Biochem. Z., 254, 438 (1932)
- 18.-WARBURG O. y CHRISTIAN W. Biochem. Z. 256, 377 (1933).

- 19.-ELLINGER P. y KOSCHARA W. Ber.chem Ges.,66,315(1933)
- 20.-DOCHER L.J. Biol. Chem. 102, 39(1933)
- 21.-KUHN R. y GYORGY P. y WAGNER-JAUREGG T. Ber.chem. Ges. 66,576(1933)
- 22.-KUHN R., GYORGY P. y WAGNER -JAUREGG T. Ber.chem. Ges.,66,317(1933).
- 23.-KUHN R. y col. Ber.chem. Ges.,66,1034(1933)
- 24.-KUHN R., RUDY H. y WAGNER-JAUREGG T. Ber.chem. Ges., 66,1950(1933).
- 25.-KUHN R. y RUDY H. Ber.chem. Ges.,67,892(1934)
- 26.-KUHN R. y RUDY H. Ber. chem. Ges.,67,1298(1934)
- 27.-KUHLE O. Ber.chem Ges.,24,2363(1891)
- 28.-STEPP W., y KUHNAU J. y SCHROEDER H. Las Vitaminas y su empleo clínico. Revista de Información Terapéutica. 4a. Ed. 1941.
- 29.-BICKNELL F. y PRESCOTT F. The vitamins in Medicine. Will. Heinemann. Medical books. Ltd. 2a. Ed. 1947.
- 30.-VITAMINS and HORMONES. Advances in research and applications. Vol. II. Harris y Thimann. Academic Press Inc. Publishers. N.Y. 1944.
- 31.-THEORELL H. Biochem. Z. 272,155(1934)
- 32.-KUHN R. y RUDY H. Ber.chem. Ges.,69,2557(1936)
- 33.-THEORELL H. Biochem. Z.,300,293(1937)
- 34.-KUHN R. y DESNUELLE P. Z. phys. chem.,251,19(1933) s/cita 42.
- 35.-DEWAN J.G. y GREEN D.E. Nature 140,1097(1937)
- 36.-GREEN D.E. y DEWAN J.G. Biochem. J. 31,1069(1937).
- 37.-EULER H. y HELLSTROM H., Z. phys. chem.,252,31(1933) s/cita 42.
- 38.-ABRAHAM E.P. y ADLER E. Biochem. J.,34,119(1940)

- 39.-HAAS E., HARRIS C.J. y HOGGESS T.R. J. Biol. Chem.,
143, 344 (1942)
- 40.-HAAS E., HORFICKER E.L. y HOGGESS T.R. J. Biol. Chem.,
132, 425 (1939)
- 41.-KREBS H.A. Biochem. J. 22, 1620 (1935)
- 42.-TURNER J. y SOMERS F. Chemistry and Methods of en-
zymes. Academic Press Inc., Publishers. N.Y. 1943.
- 43.-GORDON A.H., GREEN D.F. y SUBRAMANYAN V. Biochem.
J. 34, 764 (1940).
- 44.-FISCHER F.G. y HIRSCHBACH H. Ann. Chem., 530, 99 (1937)
- 45.-ROSENBERG H.R., Chemistry and Physiology of the vi-
tamins. Interscience Publishers Inc., N.Y. 1942.
- 46.-GUPTA S.B. y GUPTA H.N. J. Proc. Inst. Chemists (India)
21, 1 (1949) s/cita 47.
- 47.-NUNTI C.S. Il Farmaco, 2, 344 (1952).
- 48.-CHIE CHIEH TZONG, J. Fern. Technol. 21, 56 (1946) s/Chem.
Abst. 41, 5975 ^d (1950).
- 49.-HANSON S.W. y WEISS A.F. The Analyst, 70, 43 (1945)
- 50.-SURREY A. y NACHOD F. J. Am. Chem. Soc., 73, 2336 (1951)
- 51.-FROST D.V. J. Biol. Chem., 145, 693 (1942)
- 52.-AULBACH MORRIS. U.S. Pat. 2,332,548. Oct. 26 (1944)
Brit. Pat. 560,231. April 13 (1944)
- 53.-JURIST A.E. U.S. Pat. 2,353,331. Oct. 19 (1944)
- 54.-PREISBERG E. U.S. Pat. 2,349,986. Mayo 30 (1944)
- 55.-DALE J.R. U.S. Pat. 2,343,254. Marzo 7 (1944)
- 56.-AKTIESELSKABET "FERROSAN". Dan. Pat. 64,009. Oct. 3 (1945)
- 57.-BIRD J. y KUNA A. U.S. Pat. 2,407,624. Set. 17 (1946)
- 58.-HAAS J.G. U.S. Pat. 2,303,706. April 16 (1946)
- 59.-MILLER H. U.S. Pat. 2,335,373. Feb. 19 (1946)

- 60.-FROST D.V. U.S.Pat.2,388,261.Nov.6(1945)
- 61.-FROST.D.V. U.S.Pat.2,407,412.Set.10(1946)
- 62.-FROST D.V. J.Am.Chem Soc. 69,1064(1947)
- 63.-ZENTNER M.R. U.S.Pat.2,423,074.Junio 24(1947)
- 64.-FURTER M.y HOFFER M. U.S.Pat.2,433,880.Marzo 30(1948)
- 65.-CHARNEY J. U.S.Pat.2,445,208. Julio 13(1948)
U.S.Pat.2,449,640. Set.21(1948).
- 66.-MOOS A.M. y UPHAM S.D.U.S.Pat.2,449,003.Set.(1948)
UPHAM S.D. U.S.Pat.2,449,041.Set.7(1948)
- 67.-KNAUF A.E. y KIRCHMEYER F.J. U.S.Pat.2,440,050.Abril
20(1948).
- 68.-LEAL M.A. Jornal dos Farmaceuticos 2,71(1950)s/Chem.Abst.
45,4881^c(1951)
- 69.-N.N.R.(1950). J.Am.Med.Assoc.144,624(1950)
- 70.-STONE L.B. Science.,111,283(1950).
- 71.-HOFFMANN,LaROCHE y Co.Brit.Pat.624,680.Junio 14(1949)
- 72.-ARNOLD.A. y COLL Poultry Sci.,31,350(1952) s/Boll.chim.
farm.91,336(1952)
- 73.-YAMASHITA S. y WAKAMOTO Brev.Giapp.181,384.Enero 16
(1950). s/Chem.Abst.46,1221(1952)
- 74.-WICKSTROM A. Ann.pharm.franç,10,95(1952).
- 75.-LEVITON A. J.Am.Chem.Soc. 68,835(1946)
- 76.-ROSCOE M.Biochem.J. 27,1450(1933)
- 77.-METHODS of VITAMIN ASSAY.Association of Vitamin Chemists
Interscience Publishers,Inc.1947.
- 78.-WILLIAMS R. y CHELDELIN V. Science,96,22(1942)
- 79.-De MERRE L.J. y BROWN W.S. Arch.Biochem.5,181(1944)
- 80.-KARRER P. y col. Helv.Ch.Acta 17,1010(1934)

- 81.-KUHN R. y MORUZZI G. Ber. chem. Ges., 67, 849 (1934)
- 82.-KARRER P. y FRITZSCHE H. Helv. ch. Acta., 18, 911 (1935)
- 83.-MILNER H. y ADLER E. physiol. Chem. 223, 105 (1943)
s/137.
- 84.-KUHN R. y RUDY H. Ber. chem. Ges. 68, 169 (1935)
- 85.-KARRER P. y FRITZSCHE H. Helv. ch. Acta., 18, 1026 (1935)
- 86.-KUHN R. y MORUZZI G. Ber. chem. Ges., 67, 1220 (1934)
- 87.-STERN K. Nature., 133, 178 (1934)
- 88.-KUHN R. y col. Ber. chem. Ges., 67, 361 (1934)
- 89.-KUHN R. y STROBEL R. Ber. chem. Ges., 70, 753 (1937)
- 90.-KUHN R., RUDY H. y WEIGAND F. Ber. chem. Ges., 68, 625 (1935)
- 91.-HOLIDAY E.R. y STERN K. Ber. chem. Ges. 67, 1352 (1934)
- 92.-RUDY H. Naturwissenschaften., 24, 497 (1936)
- 93.-STANNUS H.S., Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., 5, 112
(1912) s/cita 104.
- 94.-RIBES O.W., y col., Arch. Int. Med., 87, 632 (1951)
- 95.-SEBRELL W.H. y BUTLER R.E. U.S. Pub. Health Repts., 54,
2121 (1939)
- 96.-GOLDBERGER J. y col. U.S. Pub. Health Repts., 40, 54 (1925)
s/ cita 94.
- 97.-GEORGY P. Biochem. J., 29, 741 (1935)
- 98.-HARRIS L.J. Biochem. J. 29, 776 (1935)
- 99.-CHICK H., COPPING A.M. y EDGAR C.E. Biochem. J., 29, 722
(1935)
- 100.-COPPING A.M. Biochem. J., 30, 345 (1936)
- 101.-BIRCH T.W., GEORGY P., y HARRIS L.J. Biochem. J. 29, 283
(1935)

- 102.-KOHIN C.J. y ELVEIJEN C.A. J.Nutrition 11,67(1936)
- 103.-STERILL W.H., HUNT D.J. y ONSTOTT R.H. U.S.Pub.Health Repts., 52, 235(1937)
- 104.-STERILL W. H. y BUTLER R.E. U.S.Pub.Health Repts., 53, 232(1938)
- 105.-SPIES T. WILLER R. y ASH W. J. Am. Med. Assoc. 113, 931 (1939)
- 106.-SYDENSTRICKER V.P. J. Am. Med. Assoc., 113, 1698(1939)
- 107.-DAS GUPTA B.K. Amer. J. Ophthalmology., 32, 1389(1949)
- 108.-STERN H.J. y LANDAU J. Amer. J. Ophthalmology., 31, 1623(1942)
- 109.-Advances in Enzimology and related subjects of Biochemistry. Edit. NORD F.F. y WERKMAN C.H. Interscience Publishers Inc. 1944.
- 110.-VITAMINS and HORMONES. Advances in research and applications. Vol. VI. Harris y Thimann. Academic Press Inc. Publishers. N.Y.
- 111.-NELSON J. Am. J. Phys., 122, 429(1940)
- 112.-FERREBE J.W. J. Biol. Chem., 136, 719(1940)
- 113.-KLEIN R. y KOHN H. J. Biol. Chem., 136, 177(1940)
- 114.-SELYE H. J. Nutrition., 25, 137(1943)
- 115.-SINGHER H.O., KINKLER C.J. y col. J. Biol. Chem., 154, 69(19 44)
- 116.-SUPPLEE G.C. y col. J. Biol. Chem., 144, 79(1942)
- 117.-EMMERIE A. Nature., 132, 164(1936)
- 118.-STRONG F.M. y col. J. Biol. Chem., 132, 363(1941)
- 119.-KLOPP y col. Am. J. Med. Sci., 205, 862(1943)
- 120.-SURE B. y FORD Z. Endocrinology., 32, 433(1943)
- 121.-LEVENSON S.M., GREEN R.W. y col., Anales de Cirugía., 5, 2016(1946)

- 122.-CAYLOR D. y CODY S. Am.J.Med.Sci., 215, 273(1943)
- 123.-MICKELSEN O. y col. J.Biol.Chem., 142, 479(1943)
- 124.-TENNANT D. y SILBER R. J.Biol.Chem., 142, 359(1943)
- 125.-CORNBLETT T.R., KIRSHI E. y BERGMAN O. J.A.M.A., 122, 426(1943)
- 126.-SARGENT F., ROBINSON P. y JOHNSON R.H. J.Biol.Chem., 153, 235(1944)
- 127.-KUHN R. y col. Zeitsch.f.physiol.Chem., 232, 36(1935)
- 128.-SARGENT H.P., KLEIN J.R. y PHELPS W.A. J. Nutrition., 31, 295(1942).
- 129.-STABLING H.E. J.A.M.A., 110, 1273(1933)
- 130.-BOHNER J.J., STANFORD C.E. y RYAN B. Am.J.Med.Sci., 205, 544(1943)
- 131.-STRONG F.M., FINNEY R.F., MOORE B. y PARSONS H.T. J.Biol.Chem., 132, 363(1941)
- 132.-MACRAE T.F. y col. Biochem.J., 33, 132(1944)
- 133.-HAJJAR V.A., JOHNS G.A. y col. J.A.M.A., 126, 357(1944)
- 134.-EDERSON G. y FOLKERS K. Ann.Rev.Biochem., (1951)
- 135.-YOUNG J.B. J.A.M.A., 144, 307(1950)
- 136.-EDERSON G., PEARSON T. y HATTISON R. Federation Proc., 2, 365(1950) s/Ann.Rev.Biochem., (1951)
- 137.-BOCHER L. J.A.M.A. 110, 1105(1933)
- 138.-KUNIN R., WEIGAND F. Ber.dhem.Ges., 67, 3084(1934)
- 139.-LAURER P. y QUIBELL T.H. Helv.ch.Acta., 12, 1034(1936)
- 140.-KUNIN R. y BOULANG R.F. Z.physiol.chem., 211, 233(1936)
- 141.-LAURER P. y col. Helv.ch.Acta., 12, 419(1934)

- 142.-KOSCHARA W. Ber.chem.Ges.,62,761(1934)
- 143.-KARRER P. y SCOPP K. Helv.ch.Acta.,17,1012(1934)
- 144.-KARRER P. y SCHOPP K. Helv.ch.Acta.,17,735(1934)
- 145.-KARRER P. Helv.ch.Acta.,17,771(1934)
- 146.-KUHN R. y KALTSCHMITT H. Ber.chem.Ges.,62,128(1935)
- 147.-SALMON J. J.Biol.Chem.,30,91(1928)
- 148.-NARAYANAN B. Biochem.J.,24,19(1930)
- 149.-GUHA C. y CHAKRAVORTY J. J.Ind.Chem.Soc.,11,295(1934)
s/Chem.Abst.,27,5735(1934)
- 150.-RUBIN S.H. y DE RITTER K. J.Biol.Chem.,152,630(1943)
- 151.-ELLINGER P. Ber.chem.Ges.,66,308;1411(1933)
- 152.-KUHN R.,GEORGY P. Ber.chem.Ges.,66,1577(1933)
- 153.-GLAXO Lab.Ltd. y EMERY W.B. Brit.Pat.607,008.Agosto
21,1948.
- 154.-KUHN R.,REINHOLD K.,WEIGAND F. y STROBIL R.
Ber.chem.Ges.,62,1765(1935)
KUHN R. y col.Naturwissenschaften.,23,360(1936)
- 155.-KARRER P.,y col.Helv.ch.Acta.,12,1435(1936)
KARRER P. Helv.ch.Acta.,13,1130(1936)
KARRER P. Helv.ch.Acta.,12,264(1936)
- 156.-KUHN R. y col.,Ber.chem.Ges.,62,1232(1935)
KUHN R. y col.,Ber.chem.Ges.,70,773(1937)
- 157.-KARRER P. y col. Helv.ch.Acta.,17,1165(1934)
- 158.-KUHN R. y WEIGAND F. Ber.chem.Ges.,62,1001(1935)
- 159.-KARRER P. y col.Helv.ch.Acta.,12,69(1935)
KARRER P. y col.Ber.chem.Ges.,62,216(1935)
- 160.-KARRER P. Helv.ch.Acta.,12,69,426,533,1143 y 1343
(1935)
- 161.-TISHLER N. L. y col. J.Am.Che.Soc.,67,2165(1945)
- 162.-TISHLER N.L. U.S.Pat. 2,417,143.Marzo 11,1947.

- 163.-TISHLER H., PFISTER K., y col., J. Am. Chem. Soc., 69,
1487(1947)
- 164.-FLEXNER L. y FARKAS W. U.S. Pat. 2,456,395. Dic. 14, 1948
- 165.-FLEXNER L. y FARKAS W. U.S. Pat. 2,473,007. Mayo 31,
1949.
- 166.-BENZONISKII V., KUDYUKOVA V. Ann. Rev. Biochem., 1951.
- 167.-AGARWAL P. SINGH K. Arch. Biochem., 14, 106(1947)
- 168.-PETT L.B. Biochem. J. 29, 937(1935)s/110.
- 169.-HOPKINS R.H. y WIENER S. J. Inst. Brewing., 51, 34(1945)
s/Chem. Abst. 39, 3876³(1945).
- 170.-TULLO J.W. y STRINGER W.J. J. Inst. Brewing., 51, 26
(1945) s/Chem. Abst. 39, 3876⁵(1945).
- 171.-THAYSEN A.C. Nature., 151, 406(1943)
- 172.-LEWIS J. U.S. Pat., 2,012,797(1935)
- 173.-LEWIS J.C., STUBBS J.J., y NOBLE W.H., Arch. Biochem.,
4, 339(1944)
- 174.-WILEY A., Ind. Eng. Chem., 42, 1830(1950)
- 175.-WILEY A., Ind. Eng. Chem., 43, 1702(1951)
- 176.-PATTIE E.C. U.S. Pat., 2,567,253, Abril 26(1949)
- 177.-VOSS J.G. U.S. Pat., 2,567,257. Abril 26(1949)
- 178.-LEONIAN B.H. y LILLY V.G. Science., 75, 653(1942)
- 179.-BUNKHOLDER P. Chem. Abst. 37, 5757²(1943)
- 180.-ROGOSA M. J. Bact., 45, 459(1943)
- 181.-KASAHARA H. y GAIHO I., Klin. Wochschr. 21, 349(1942)
s/Chem. Abst. 37, 5099⁴(1943)
- 182.-SCHULZ M. y WERNER W. Chem. Abst. 5326⁵(1943)
- 183.-YAMASAKI I. Bioch. Z. 300, 160(1939) s/Chem. Abst. 33,
4294⁹(1939).

- 184.-YAMASAKI I. Proc. Imp. Acad. (Tokio) s/Chem. Abst.
34,4091⁵ (1940)
- 185.-MINER. C.S. U.S. Pat. 2,202,161. Mayo 23(1940).
- 186.-YAMASAKI I. Biochem. Z. 307,431(1941) s/Advances
in Enzymology. Vol. VII. (1947)
- 187.-YAMASAKI I. U.S. Pat. 2,207,671. Set. 20(1942)
- 188.-ARZBERGER C.F. U.S. Pat. 2,326,425. Agosto 10(1943)
- 189.-LEGG D. y BEESCH C. U.S. Pat. 2,370,177. Feb. 27(1945)
- 190.-HINES G.E. U.S. Pat. 2,367,644. Enero 16(1945)
- 191.-McMILLAN G.W. U.S. Pat. 2,367,646. Enero 16, 1945)
- 192.-HINES G.E. U.S. Pat. 2,387,023. Oct. 16(1945)
- 193.-WALTON M.I. U.S. Pat. 2,368,074. Enero 23(1945)
- 194.-KRYSZTESY J.C. U.S. Pat. 2,355,220. Ag. 8(1944)
- 195.-LEVITON A. J. Am. Chem Soc. 68,836(1946)
- 196.-POLLARD H. y RODGERS N. U.S. Pat. 2,443,939
- 197.-POLLARD H., RODGERS N. y MEADE R.
U.S. Pat. 2,449,140. Set. 14(1948)
U.S. Pat. 2,449,141. Set. 14(1948)
U.S. Pat. 2,449,142. Set. 14(1948)
U.S. Pat. 2,449,143. Set. 14(1948)
U.S. Pat. 2,449,144. Set. 14(1948)
- 198.-KATAGIRI H. Symposia on Enzyme Chem. (Japan)
6,1(1951) s/Chem. Abst. 45,10802
- 199.-BURKHOLDER P.R. Arch. Biochem., 3,121(1943)
- 200.-BURKHOLDER P.R. U.S. Pat 2,363,227. Nov. 21(1944)
- 201.-TANNER E. VOJNOVICH C. Science 101,180(1945)
- 202.-LEVINE H., OXAAS J. y col. Ind. Eng. Chem., 41,1665
(1949).
- 203.-McCLAY J.R. U.S. Pat. 2,537,148. Enero 9(1951)

- 204.-CARPENTER C.P. y FRIEDLANDER E.W. *Science.*, 25, 625 (1942)
- 205.-KITAVIN G.S. *Compt. rend. acad. sci. U.R.S.S.*, 23, 517 (1940) s/*Chem. Abst.* 35, 3670² (1941).
- 206.-PONTOVICH V.E. *Biokhimiya.*, 2, 297 (1943) s/*Chem. Abst.* 39, 3249 (1945)
- 207.-TANNER F.W., PFEIFFER S.E. y VAN LANEN J.M. *Arch. Biochem.*, 2, 29 (1945)
- 208.-PILTIER G., y BORCHERS R. *J. Bacter.* 54, 519 (1947)
- 209.-LEVIN G.G. *Rev. App. Mycology.*, 31, 252 (1952)
- 210.-GUILLIERMOND A. *Compt. r. des Academie sci.*, 204, 1556 (1935)
- 211.-ROUTIER J.B. *Mycologia.*, 41, 133 (1949)
- 212.-GUILLIERMOND A. *Revue de Mycologie et Supplement* 1, 115 (1936)
- 213.-ARRAGON G. *Rev. Appl. Mycology.*, 25, 212 (1946)
- 214.-MOORE H. y DEBECZE G. *J. Bacter.*, 54, 40 (1947)
- 215.-GUILLIERMOND A., FONTAINE M. y RAFFY A. *Compt. r.* 204, 1077 (1935)
- 216.-RAFFY A. *Compt. e. soc. Biol.*, 126, 875 (1937)
- 217.-RAFFY A. y FONTAINE A. *Compt. r. Academie. sci.*, 205, 1005 (1937)
- 218.-MIRIMANOFF y RAFFY A. *Compt. r. Academie. sci.*, 206, 1507 (1938)
- 219.-SCHOPFER W.H., *Helv. ch. Acta.*, 27, 1017 (1944)
- 220.-ARRAGON G., MAINIL J., RUPAIT R. y VELU H., *Rev. App. Mycology* 25, 354 (1946)

- 221.-MAYER R.L. Pat.Franc. 913,165(1946) s/Vitamins and Hormones.Vol.VI.
- 222.-RUDERT F.J. U.S.Pat.2,374,503.Abril 24(1945)
- 223.-PIERSMA H.D. U.S.Pat.2,400,710(1946) s/J.Bact.53, 737(1949)
- 224.-FOSTER J.W. Pat.Brit.593,027.Oct.7(1947)
- 225.-MOORE H. y DeBECZE G. J.Bact.51,40(1947)
- 226.-DESEIVE E. Milchwissenschaft.,2,141(1947) s/Chem. Abst.42,2310ⁿ (1948)
- 227.-KINYA NAGAO Pat.Jap.,162,364.Mar.2(1944)
- 228.-MOSS A. y KLEIN R. Pat.Brit.615,847.Enero 12,(1949)
- 229.-PIELKE A. U.S.Pat. 2,473,817 y 2,473,818.Enero 21 (1949)
- 230.-RYOHEI TAKATA. J.Japan.Biochem.Soc.20,130(1948) s/Chem.Abst.44,8063(1950)
- 231.-STILES H.R. U.S.Pat. 2,483,855.Oct.4(1949)
- 232.-JAMES R.M. U.S.Pat.2,498,549.Feb.21(1950)
- 233.-DULANEY E.L. y GRUTTER F.H. Mycologia.,42,717(1950)
- 234.-CHIN. J.Ferment.Technol.25,140(1947) s/Chem/Abst. 44,7384ⁿ (1950)
- 235.-TABINKIN B. U.S.PAT 2,493,274.Enero 3 (1950)
Brit.Pat.651,671.Julio 16(1947)
- 236.-SEKIDO S.y KICHINA F. Pat.Jap.175,239.Marzo 13(1948)
- 237.-DeBECZE G y col.
- 238.-OSAKI I y KARATA S.J.Ferm.Technol.(Japon)22,181(1951) s/Chem.Abst.46,577 (1952)
- 239.-YAW K. Mycologia.,44,307(1952)
- 240.-GUILLIERMOND A. Rev.gen.botanique.,40,318,606 y 690 (1928)

- 241.-ASHBY S.F. y NOWELL W. Ann.of Botany.,40,69(1926)
- 242.-GUILLIERMOND A. Compt.rend.Acad.Sci.,135,1510(1927)
- 243.-WICKHAM L.J.,FLICKINGER M. y JOHNSTON R. Arch.
Biochem.,2,95(1946)
- 244.-PRIDHAM T.G. y RAPER K. Mycologia.,42,603(1950)
- 245.-FARRIES H.M. y BELL A.F. Ann.of Botany.,44,423(1930)
- 246.-TANNER F.,VOJNOVICH Ch. y VAN LANEN J. J.Bact.,
58,737(1949)
- 247.-STELLING-DIKKER H.M. Rev.App.Mycology.,12,692(1931)
- 248.-BUSTON y col. Nature.,158,22(1946)
BUSTON y col. Arch.Biochem.,22,1(1949)
- 249.-TANNER F.y VAN LANEN J.M. U.S.Pat.2,445,123.Julio
13,(1948)
- 250.-TANNER F.,VOJNOVICH Ch.,y VAN LANEN J.M. J.Bacteriol
gy.,58,737(1949)
- 251.-BOURQUIN A. y SHERMAN H.C. J.Am.Chem.Soc.,53,350(
(1931)
- 252.-BESSEY O. J.Nutrition.,15,11(1933)
- 253.-BENDER R.D. y SUPPLEE G.C. J.Am.Chem.Soc.,52,1178
(1939)
- 254.-HAWK P.BP y col.Practical Physiological Chemistry,
11^a. Ed.Philadel phia,B.Blakiston's Son & Co.1917.
LEPKOVSKY O. y col. Hilgardia.,11,563(1938) s/
SNELL y STRONG, Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.,11,346(1939)
- 255.- DAY P. y col. J.Nutrition.,15,83(1933)
- 256.-ANSBACHER y col. J.Nutrition.,11,401(1936)
- 257.-COOK C.A. y col. Science.,35,503(1937)
- 258.-SUPPLEE G.C.,BENDER R.C. y JENSEN O.G. Ind.Eng.Chem.
11,495(1939)
- 259.-LINDHOLM H. Biochem.J.,32 ,314(1938)

- 260.-EL SADR M.M. Biochem.J.,34,601(1940)
- 261.-WAGNER J.R.,AKELROD A.E.,y ELVENJENC.A. J.Biol.Chem.
126,357(1940)
- 262.-EMMETT A.D. y col. Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.,13,219(1941)
- 263.-NORRIS L.C. y col. Poultry Sci.,10,93(1930) s/274.
- 264.-JUKES T.H. J.Nutrition.,14,223(1937)
- 265.-WARBURG O. y CHRIST IAN W. Naturwissenschaften.,20,
1930(1933)
- 266.-KUHN R. Ber.chem.Ges.,67,1452
- 267.-ELLINGER P. Biochem.J.,32,376(1938)
- 268.-EULER H. y ADLER E. Z.physiol.Chem.,223,105(1934)
Ib.,226,87(1934)
- 269.-HODSON A.Z. y NORRIS L.C. J.Biol.Chem.,131,621(1939)
- 270.-SCOTT M.L.,HILL F.W.,NORRIS L.C. y HENSER G.F.
J.Biol.Che.,165,65(1946)
- 271.-HOFFER A.,ALCOCKA.W. y GEDDES W.F. Cereal.Chem.,21,
515(1949) s/Chem.Abst.,39,1475⁵(1945)
- 272.-SHERMAN H.C. y SMITH S.L. The Vitamins.The Chemi-
cal Catalog. Co.Inc.N.Y. 2nd.Ed.1931.
- 273.-ROSHNER L.,LERNER E. y CANNON H. Ind.Eng.Chem.Anal.
17,778(1945)
- 274.-B.CONNOR JOHNSON. Methods of vitamin determination.
Burgess Publishing Co.1948
- 275.-KOSCHAR W. Z,physiol.chem.,232,101(1935)
- 276.-FERREBER J.W. J.Clin.Invest.,19,251(1940) s/270.
- 277.-DANIEL L. y NORRIS.L.C. J.Nutrition.,30,31(1945)
- 278.-RUBIN S.H.,DeRITTER E.,SHUMAN R.L. y BAUERFEIND J.
Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.,17,136(1945)
- 279.-BARTON E.C.,WRIGHT D. y BOOTH R.G. Biochem.J.,37,25
(1943)

- 230.-CONNER R.T. y STRAUB G.J. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 13, 385(1941)
- 231.-KODICEK E. y WANG Y.L. Biochem. J., 41, 340(1949)
- 232.-WEISBERG S. y LEVIN I. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 2, 523(1937)
- 233.-OSTIRNER P. Métodos físico-químicos para determinar vitaminas. Manuel Mañín. Barcelona. 1944.
- 234.-GLATER E. y MORELL D. Biochem. J., 40, 644(1946)
- 235.-NAJJAR V.A. J. Biol. Chem., 141, 355(1941)
- 236.-McLAUREN B.A., COVER S. y PEARSON P.B. Arch. Biochem., 4, 1(1944)
- 237.-LINGANE J. y DAVIS J. Biol. Chem., 137, 567(1941)
- 238.-PORTILLO R. y VARELA G. Anales real acad. farm., 15, 78(1944) s/Chem/Abst. 44, 10782(1950)
- 239.-KUHN R. y RUDY H. Ber. chem. Ges., 69, 2557(1936)
- 240.-British Pharmacopoea. 1948.
- 241.-ORLA JENSEN S. Mém. acad. roy. sci. Danmark (sec. Sci) VIII, 5, 181(1919) s/J. Bact., 50, 373(1945)
ORLA JENSEN S. y JACOBSEN J. Zentr. Bakt. Parasitenk. II, 30, 321(1930) s/ J. Bact., 50, 373(1945)
- 242.-Vitamins and Hormones. Vol. I (1943)
ORLA JENSEN S., OTTE H.C. y SNOCKJAER A. Zentr. Bakt. Parasitenk. II, 94, 434 y 460(1936)
- 243.-PETERSON W.H. y PETERSON H.S. Bact. Revs., 9, 49(1945)
- 244.-LHOFF A. Ann. Ferment. 1936, 2, 419 s/WILSCH M. Le dosage microbiologique des vitamines. Edit. Desoer. Liege. 1947.
- 245.-SNELL E. y WRIGHT L.D. J. Biol. Chem., 139, 675(1941)
- 246.-KROHL W., STRONG F. y ELVEHJEM C.A. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 471(1943)
- 247.-PENNINGTON D., SNELL E., y WILLIAMS R.J. J. Biol. Chem., 135, 213(1940)

- 299.-SKEGGS H. y WRIGHT L. J. Biol. Chem., 155, 21 (1944)
- 300.-HOAG H., SARUTT H., y CHILDELIN V. Ind. Eng. Chem.,
Anal. Ed. 17, 60 (1945)
301. Roberts E. y SNELL E. J. Biol. Chem., 163, 499 (1946)
- 302.-LUCKEY T.D., BRIGGS G.M. y ELVENJEN C.A. J. Biol.
Chem., 152, 157 (1944)
- 303.-LEWIS J.C. J. Biol. Chem., 146, 441 (1942)
LANDY M. y DICKEN D.M. J. Biol. Chem., 146, 109 (1942)
- 304.-SHULL G.M., HUTHCHINGS B.L. y PETERSON M.H.
- 305.-WRIGHT L.D. y SKEGGS H.R. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.,
55, 95 (1944)
- 306.-SARUTT H. y CHILDELIN V.H. J. Biol. Chem., 155, 153 (1944)
- 307.-McMAHAN R. y SNELL E. J. Biol. Chem., 152, 83 (1944)
- 308.-STOKES J.L., GUNNESS M., DWYER I.M. y CASWELL M.C.
J. Biol. Chem., 160, 35 (1945)
- 309.-HAC L.R., SNELL E.E. y WILLIAMS R.J. J. Biol. Chem.,
159, 273, 291 (1945)
- 310.-GUNNESS M., DWYER I.M., STOKES J. J. Biol. Chem., 162,
159 (1946)
- 311.-SNELL E. y STRONG F.M. Enzymologia., 5, 136 (1939)
s/J. Bact., 50, 373 (1945)
- 312.-ANDERSEN A. y WEIKMAN C. Iowa State Coll. J. Sci., 14, 1
187 (1940) s/Vitamins and Hormones. Vol. III (1945)
- 313.-WOOD H.G., GEIGER C., y WEIKMAN C.H. Iowa State Coll.
J. Sci., 14, 367 (1940) s/Vitamins and Hormones Vol. III.
- 314.-DUNN M., SHANKMAN S., CAMDEN M. y BLOCK H. J. Biol.
Chem., 168, 1 (1947)
- 315.-SHANKMAN S., CAMDEN M., BLOCK H., MERRIFIELD B., y DUNN
J. Biol. Chem., 168, 23 (1947)
- 316.-PRICE S.A. y GRAVIS H.C., Nature, 153, 461 (1944)
- 317.-JONES A. y MORRIS S. The Analyst., 75, 608 (1950)

- 318.-CAMPBELL T.E. y HUCKER G. Food Research., 9, 197 (1944)
s/274.
- 319.-WOODSON H., KIRSH E. y BERGMAN O. J. Am. Pharm. Assoc.
35, 253 (1946)
- 320.-KORNBERG H., LANGDON R. y CHIEDELIN V. Anal. Chem., 20
81 (1948)
- 321.-SNELL E., STRONG F. y PETERSON W.H. J. Bact. 33, 293
(1939)
- 322.-SNELL E. y PETERSON W.H. J. Bact. 39, 273 (1940)
- 323.-MITCHELL H.K., SNELL E. y WILLIAMS R.J. J. Am. Chem. Soc.
63, 2284 (1941)
- 324.-HUTCHINGS D.R., BOHOMOS N. y PETERSON W.H. J. Biol. Chem.
141, 521 (1941)
- 325.-LANDY M. y DICKEN D. J. Bact., 43, 5 (1942)
- 326.-KRUEGER K. y PETERSON W.H. J. Biol. Chem., 152, 145
(1945).
- 327.-FRENEY R.E. y STRONG F.M. J. Am. Chem. Soc., 64, 831
(1942)
- 328.-STOKSTAD E.L.R. J. Biol. Chem., 139, 475 (1941)
- 329.-LANDY M. y DICKEND. J. Lab. Clin. Med., 27, 1036 (1942)
- 330.-POLLACK M.A. y LINDNER M. J. Biol. Chem., 147, 183 (1943)
- 331.-LIGHT A. y CLARKE M. J. Biol. Chem., 147, 739 (1943)
- 332.-CHATTAWAY F.W., HAPPOLD F.C. y SANFORD M. Biochem.
J., 37, 298 (1943)
- 333.-DOLBY D.E. y WATERS Nature., 153, 139 (1944)
- 334.-LOWRY O.H. y BESSEY O.A. J. Biol. Chem., 155, 71 (1944)
- 335.-SNELL E. y RANNEFELD A.N. J. Biol. Chem., 157, 475 (1945)
- 336.-ROBERTS C.E. y SNELL E. J. Biol. Chem., 163, 499 (1946)
- 337.-SCOTT M.L., NORRIS L.C. y HEUSER G.F. J. Biol. Chem.,
166, 481 (1946)

- 333-CHATTAWAY F.W., DOLBY E. y HAPPOLD F.C., Biochem.J., 43, 567 (1948)
- 339-RICKES E., KOCH P., y WOOD T., J. Biol. Chem., 178, 103 (1949)
- 340-STOKES J., LEAH K., y KODITSCHKE., J. Biol. Chem., 178, 93 (1949)
- 341-SNELL E.E., Physiological Reviews., 28, 255 (1948)
- 342-FEENEY R.E., y STRONG F.M., J. Biol. Chem., 133, XXXI (1940)
- 343-KUHN R. y RUDY H., Ber. deutsch. Chem. Ges., 69, 2557 (1936)
- 344-ISBELL H., WOOLEY J.G. y FRASER H.F., U.S. Pub. Health Repts. 56, 282 (1941)
- 345-ECKARDT R.E., GYORGY P. y JOHNSON L.V., Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 46, 405 (1941) s/cita 77.
- 346-Bauernfeind J.C., SOTER A.L. y BORUFF C.S., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 14, 666 (1942)
- 347-SCOTT M.L., RANDALL F.E. y HESSEL F.H. J. Biol. Chem., 141, 325 (1941)
- 348-WEGNER M.F., KEMMERER A.R. y FRAPS G.S., J. Biol. Chem., 144, 731 (1942)
- 349-STRONG F.M. y CARPENTER L.E. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 14, 909 (1942)
- 350-ANDREWS J.S., BOYD H.M. y TERRY D.E., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 14, 271 (1942)
- 351-RABINOWITZ J.C. y col., J. Biol. Chem., (in press) s/cita 341.
- 352-NIVEN C.F. Jr y SHERMAN J.M. J. Bact., 47, 339 (1944)
- 353-SMILEY K. y col., J. Bact., 45, 445 (1943)
- 354-SARETT H.P. y CHSELDELIN V.H., J. Biol. Chem., 155, 153 (1944)
- 355-SNELL E.E., J. Am. Chem. Soc., 67, 194 (1945)
- 356-EMMETT A.D. y col., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 13, 219 (1941)
- 357-HAC L.R., J. Biol. Chem., 159, 273 (1945)
- 358-WOOD E.C. The Analyst., 72, 84 (1947)

- 359.-PRIDHAM T.G. y RAPER K., Amer.J.Bot., 36, 814(1949)
- 360.-PFEIFFER V.F., TANNER F., VOJNOVICH Ch. y TRAUFLER D.H.,
Ind.Eng.Chem., 42, 1776(1950)
- 361.-SMILEY K.L. y SOBOLOW M. y AUSTIN F., Ind.Eng.Chem., 45,
1380(1951)
- 362.-NOVAK A.F. U.S.Pat., 2,447,814., Ag.24(1948)
- 363.-TANNER F. U.S.PAT.Appl.26.233.
- 364.-KONINKLIJKE N.V. , Pat.Alemana., 63,936.Nov.15(1951)
- 365.-CAPPS B., HOBBS N.L., J.Biol.Chem., 178, 517(1949)