

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

Detección de las Vitaminas: Tiamina, Riboflavina,
Nicotinamida, Pantotenato de Calcio, Piridoxina y
Cianocobalamina en Cultivo Sumergido de dos
Especies de Basidiomicetos.

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N :
MARIA DE LOURDES DEL BOSQUE MENDEZ
BERTHA VIDAL GARFIAS

MEXICO, D. F., 1973



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

18515
CHA
MC
1923



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Profa. Q. Sara Manrique Regil.
VOCAL: Profa. Q. F. B. Etelvina Medrano de Jaimes
SECRETARIO: Prof. Q. Alfredo Echegaray Aleman.
1er. SUPLENTE: Prof. Q. F. B. Mario Miranda Castro.
2do. SUPLENTE: Prof. Q. F. B. Alfredo Garzón Serra.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 401 B. Facultad de Química. UNAM y
Laboratorios UPJOHN, S. A. de C. V.

SUSTENTANTES: Ma. de Lourdes del Bosque Méndez.
Bertha Vidal Garfias.

ASESOR DEL TEMA: Q. Sara Manrique Regil.

SUPERVISOR TECNICO: Q. F. B. Mario Miranda Castro.

A nuestros padres:

Lic. Angel Vidal y Vidal
Sara G. de Vidal.

Ing. Garibaldi E. del Bosque S.

Guadalupe M. de del Bosque.

Con agradecimiento a nuestro maestro y
amigo Q. F. B. Mario Miranda Castro y
a los Laboratorios Upjohn de México, S. A.
por su ayuda y colaboración para la rea -
lización de este trabajo.

A nuestros hermanos y amigos .

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	
Hongos de la clase <u>Basidiomycetae</u>	4
Algunas de las vitaminas del Com - plejo B.	
Tiamina	12
Riboflavina	13
Nicotinamida	15
Pantotenato de calcio	17
Piridoxina	19
Cianocobalamina	21
	23
MATERIAL Y METODOS:	
Cepas	25
Medios	25
Determinación azúcares reductores	31
Métodos de cuant. de Tiamina	32
Métodos de cuant. de Riboflavina	37
Métodos de cuant. de Nicotinamida	42
Métodos de cuant. de Pantotenato de calcio	47
Métodos de cuant. de Piridoxina	50
Métodos de cuant. de Cianocobalamina	53
RESULTADOS	59
DISCUSION :	
De Métodos	87
De Resultados	93
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFIA.	98

INDICE DE FIGURAS, CUADROS , TABLAS Y GRAFICAS

		Pág.
Fig. 1	Seis estadios sucesivos de desarrollo de un basidio	7
Fig. 2	Esquema de un basidiocarpo de <u>Agaricaceae</u> (seta - madura).	9
Cuadro 1.	Clasificación de <u>P. ostreatus</u> y <u>T. nudum</u> dentro de la clase <u>Basidiomycetae</u> .	5
Cuadro 2.	Composición del Agua de Cocimiento de maíz.	29
Cuadro 3.	Microorganismos utilizados para la determinación - microbiológica de vitaminas.	30
Tabla 1.	Concentración de azúcares reductores en el cultivo - de <u>P. ostreatus</u> .	59
Tabla 2.	Concentración de tiamina en el cultivo de <u>P. ostrea-</u> <u>tus</u> .	61
Tabla 3.	Concentración de riboflavina en el cultivo de <u>P. os-</u> <u>treatus</u> .	62
Tabla 4.	Curva patrón de nicotinamida .	63
Tabla 5.	Concentración de nicotinamida en el cultivo de <u>P. --</u> <u>ostreatus</u> .	64
Tabla 6.	Curva patrón de pantotenato de calcio.	65
Tabla 7.	Concentración de pantotenato de calcio en el cultivo - de <u>P. ostreatus</u> .	66
Tabla 8.	Concentración de piridoxina en el cultivo de <u>P. ostrea-</u> <u>tus</u> .	67
Tabla 9.	Curva patrón de cianocobalamina .	68
Tabla 10.	Concentración de azúcares reductores en el cultivo - de <u>T. nudum</u> .	71

	Pág.
Tabla 11. Concentración de tiamina en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	73
Tabla 12. Concentración de riboflavina en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	74
Tabla 13. Curva patrón de nicotinamida.	75
Tabla 14. Concentración de nicotinamida en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	76
Tabla 15. Curva patrón de nicotinamida.	77
Tabla 16. Concentración de nicotinamida en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	78
Tabla 17. Curva patrón de pantotenato de calcio.	79
Tabla 18. Concentración de pantotenato de calcio en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	80
Tabla 19. Curva patrón de pantotenato de calcio.	81
Tabla 20. Concentración de pantotenato de calcio en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	82
Tabla 21. Concentración de piridoxina en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	83
Tabla 22. Curva patrón de cianocobalamina.	84
Gráfica 1. Consumo de azúcares reductores en el cultivo de <u>P. ostreatus</u> .	60
Gráfica 2. Concentración obtenida de las distintas vitaminas en el cultivo de <u>P. ostreatus</u> .	69
Gráfica 3. Cambios en la concentración de vitaminas en el cultivo de <u>P. ostreatus</u> .	70
Gráfica 4. Consumo de azúcares reductores en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	72
Gráfica 5. Concentración obtenida de las distintas vitaminas en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	85
Gráfica 6. Cambios en la concentración de vitaminas en el cultivo de <u>T. nudum</u> .	86

INTRODUCCION

En los últimos años se ha hecho patente la importancia del estudio e investigación de nuevas fuentes alimenticias que puedan subsanar y en cierta medida prevenir las carencias que se presentan y que, en mayor escala se - presentarán, debido a las limitaciones cualitativas y cuantitativas de los sistemas de producción agrícola y ganadera y a la falta de desarrollo de técnicas de aprovechamiento de los recursos marinos, tanto animales como vegetales. Es por ello, que se ha pensado en recurrir a los cultivos de microorganismos y vegetales sencillos a nivel industrial para ser usados como fuentes alimenticias ya que, debido a las ventajas que ofrecen, tanto económicas como nutritivas, podrían satisfacer la demanda existente.

Es de aquí, que nuestros intereses se hayan centrado en el estudio de las posibilidades, que como recursos alimenticios nos ofrecen los - - Basiomycetos. Este trabajo fue encaminado solamente hacia la detección de algunas de las vitaminas del complejo B en los cultivos sumergidos de dos especies de Basidiomycetos: Pleurotus ostreatus y Tricholoma nudum que se encuentran abundantemente distribuidos en nuestro país.

La importancia de trabajar con estas especies, reside principalmente, en el contenido proteico y vitamínico que puede obtenerse según las condiciones en las que se hayan cultivado, ya que como es bien conocido, la agitación, aireación, pH, temperatura, etc. son factores de vital importan-

cia para el desarrollo óptimo de cualquier microorganismo.

Así, se sabe que Pleurotus ostreatus posee desde un 17 hasta un 50% de contenido proteico (67, 76) y que, aún cuando la cantidad de proteína no es muy alta, es una proteína completa, puesto que posee 17 aminoácidos, entre los que se encuentran incluidos los aminoácidos esenciales; sin embargo, hay que hacer notar que la metionina y fenil-alanina, no se encuentran en tan alta concentración como los demás. Para la obtención de un buen rendimiento en contenido proteico, es necesaria la presencia de sales de amonio como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, ya que se ha podido observar, que en medios que carecen de dichas sales, el contenido proteico es muy bajo. Los oídios de este Basidiomyceto contienen terpenoides, escualeno, ergosterol libre y esterificado y ubiquinona; el 29% del peso seco del hongo, está constituido por un triglicérido, posee además ácidos oleico, palmítico y linoleico (75).

En lo concerniente a Tricholoma nudum se ha reportado que tiene un contenido proteico que varía de un 28 a un 55% y de un 6 hasta un 24% de grasas (45, 49).

Ahora bien, se sabe que el uso de estos hongos, como complementos de otros materiales alimenticios, ha sido muy eficaz, en cuanto a la disminución de las deficiencias de lisina, que en nuestro país, es uno de los principales problemas que se han presentado en lo que respecta a la alimentación (76). De esta manera puede proporcionarse una dieta mejor balanceada, combinando estos hongos y ciertos cereales.

En lo que respecta al sabor, que es un factor de suma importancia para la administración de cualquier substancia comestible, no presenta ningún problema, puesto que no necesita ser enmascarado, ya que tanto Pleurotus ostreatus como Tricholoma nudum poseen un sabor agradable (16, 29).

El panorama del valor nutritivo de las especies estudiadas, estará dado no solamente por el contenido de vitaminas, sino también por la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos que posean. De aquí, que el trabajo sea complemento de otros estudios que se están realizando y cuyos resultados, nos indicarán si estos nuevos complementos alimenticios, podrán substituir a otros con mejor aceptación y mayor economía.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1. - Hongos de la Clase Basidiomycetae

Los hongos Basidiomycetes (1, 2, 39, 58) pertenecen al reino Plan -
tae, división Mycota y subdivisión Eumycotina. Constituyen un grupo im -
portante de hongos que pueden encontrarse en lugares húmedos creciendo -
sobre sustancias orgánicas y que comprenden especies tanto útiles como -
dañinas. Se diferencian de los demás hongos en que producen basidiosperas,
poseen un micelio dicariótico y durante la plasmogamia existe la formación
de fíbulas.

El micelio de la mayoría de los Basidiomycetes pasa por tres fases
de desarrollo: primario, secundario y terciario. El micelio primario, se
desarrolla a partir de la germinación de la basidiospora, teniendo una fase
corta multinucleada que después se transforma en uninucleada y tabicada.
El micelio secundario se origina del primario por plasmogamia, constitu -
yendo células típicamente binucleadas que dan origen al basidio, en el cual
se lleva a cabo la cariogamia y la meiosis para formar las basidisporas. El
micelio terciario está representado por los tejidos especializados que se -
originan del micelio secundario para formar los esporóforos. El micelio -
generalmente es de color blanco, amarillo vivo ó anaranjado (2).

CLASE	SUB-CLASE	GRUPO	ORDEN	GENERO ESPECIE	
Basidiomycetae	Homobasidiomycetae	Hymenomycetes	Polyperales		
			AGARICALES	<u>P. ostreatus</u>	
				<u>T. nudum</u>	
			Hymenogasterales		
			Lycoperdiales		
		Gastromycetes	Sclerodermatales		
			Phallales		
			Nidulariales		
			Heterobasidiomycetae	Dacrymycetales	
				Septobasidiales	
	Tremellales				
	Uredinales				
		Auriculariales			
		Ustilaginales			

CUADRO No. 1.— Clasificación de P. ostreatus y T. nudum dentro de la clase Basidiomycetae

El basidio se origina como célula terminal en una hifa binucleada y se halla separado de la misma por un tabique, a cuyo lado se encuentra una fíbula. El basidio, al principio es angosto y alargado y en poco tiempo se agranda y ensancha mientras los dos núcleos del basidio se fusionan. El núcleo cigótico resultante sufre meiosis, originando cuatro núcleos haploides que emigran hacia cuatro esterigmas que se han formado en el extremo del basidio para formar los esbozos de las basidiosporas, las cuales van a completar su desarrollo como células uninucleadas haploides (fig. 1). Las basidiosporas pueden ser incoloras o bien, de diferentes formas y colores.

Dentro de la clase Basidiomycetae se encuentran dos grandes subclases: Heterobasidiomycetidae y Homobasidiomycetidae. En cada una de ellas se incluyen diversos grupos, órdenes y familias, según puede apreciarse en el cuadro número 1. Pleurotus ostreatus y Tricholoma nudum pertenecen a la subclase Homobasidiomycetidae, grupo Hymenomyces, orden Agaricales y familia Agaricaceae (2, 39, 58).

La principal característica de Homobasidiomycetidae es el basidio típicamente claviforme, no tabicado, que lleva generalmente cuatro basidiosporas sobre esterigmas (2). Hymenomyces se diferencian por llevar sus basidios en un himenio bien definido que queda al descubierto cuando las basidiosporas son todavía jóvenes y subdesarrolladas.

De los órdenes incluidos dentro de la subclase Homobasidiomycetidae, el orden Agaricales es de los más importantes, ya que en él se incluyen los hongos con cuerpos fructíferos a los cuales se les llama comunmen

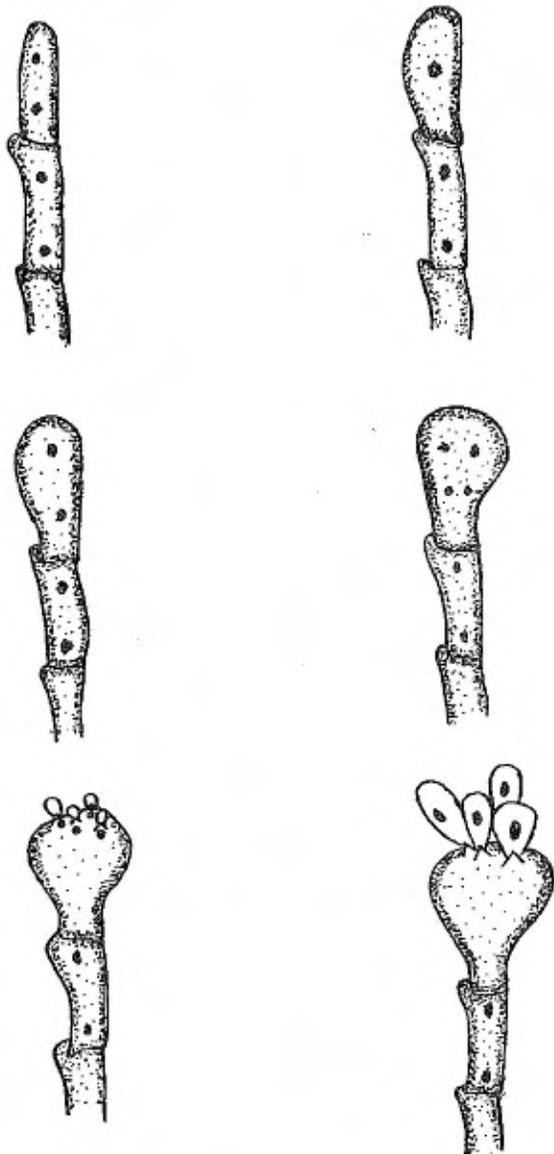


Fig. 1.- SEIS ESTADIOS SUCEIVOS DE DESARROLLO DE UN BASIDIO.

te setas u hongos en sombrilla. Puede decirse, que estos hongos son cosmopolitas y que, dependiendo de la especie, producen cuerpos fructíferos en diferentes estaciones del año (1, 2, 39).

Su estructura somática es típicamente basidiomicética. La reproducción asexual se lleva a cabo por medio de la producción de conidios y algunas especies la efectúan por medio de la producción de oídios, los cuales pueden germinar o bien comportarse como espermacios. La reproducción sexual se produce por fusión hifal (somatogamia) o bien, por oidización.

El basidiocarpio en la mayor parte de Agaricales constituye la seta (fig. 2). Cuando crece, la porción superior del primordio (cuerpo globoso u ovoide) se expande en sombrero o píleo y el velo interno se rompe dando lugar, según el tipo de desarrollo, a un anillo, una cortina, una volva o bien escamas, que son de importancia en la clasificación de los géneros de Agaricales. Las esporas varían en forma y color, teniendo una longitud de 2 a 4 μ (2, 58).

El orden Agaricales incluye varias familias, entre las cuales destaca la familia Agaricaceae, debido a que en ella se incluyen la mayor parte de las setas. Esta familia se distingue porque lleva sus basidios sobre la laminillas que no son ceráceas ni se separan fácilmente del contexto del píleo.

Por conveniencia, esta familia se ha dividido en cinco grupos según el color de sus esporas: blancas, rosadas, ocre, púrpura y negras.

Trichomoma nudum (2, 29) está incluido dentro del grupo de esporas rosadas. Es una especie poco común en México; sólo se tienen datos -

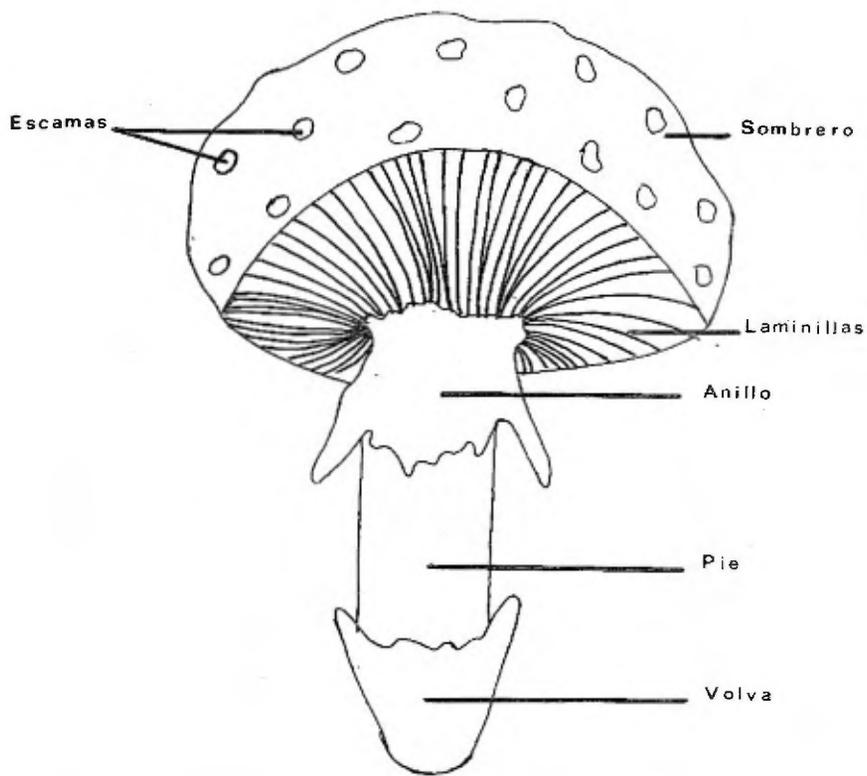


Fig. 2.- ESQUEMA DE UN BASIDIOCARIO DE AGARICACEAE (seta madura).

sobre su comestibilidad en San Cayetano, Edo. de Méx., aunque en otros países se le aprecia mucho desde el punto de vista culinario.

Se le puede encontrar en San Cayetano, Edo. de Méx. y en Huautla de Jiménez, Oax. Su hábitat son los bosques de coníferas y mesofílicos; crece al pie de los árboles entre los meses de junio y septiembre.

No se le conocen nombres vulgares, pero sí otros en latín: Rhodopaxillus nudus (Bull ex Fr.) R. Maire, Lepista nuda (Bull ex fr.) W. G. Smith.

Sus características son las siguientes: tienen un píleo (3-15 cm.) convexo a plano umbonado, liso, de color pardo achocolatado o pardo violáceo, decolorable con la edad, borde introsos cuando es inmadura y láminas sinuadas de color violáceo a violáceo pardo. Posee estípite robusto y fibroso, más ancho en la base y de color violáceo grisáceo; la base, con abundante micelio blanco o violáceo.

La carne es de olor agradable, sabor a pan y de color blanca violácea. Sus esporas (3-4 x 5.5-8 μ) son ligeramente equinuladas.

Pleurotus ostreatus (2, 29) pertenece al grupo que produce esporas blancas. Es una especie polimorfa, por lo que presenta una gran sinonimia. Aquí en México se han observado tres variedades: una de píleo color pardo oscuro violáceo y consistencia blanda, común en los bosques de coníferas (variedad típica); otra de píleo color blanco amarillento y consistencia correosa, común en las zonas áridas (variedad cornucoploide) y otra de píleo color blanco y consistencia carnosa, común en zonas tropicales húmedas (variedad de identificación pendiente).

Se le ha encontrado en Tepoztlán, Mor.; Jonacatepec, Mor.; Calacuaya, Edo. de Méx.; San Lorenzo Sacamulpa, Edo. de Méx.; Huautla de Jiménez, Oax.; San Andrés Tuxtla, Ver.; Tehuacán, Pue. y Lagunas de Zempoala, Mor.

Su habitat es cespitoso (29, 46), en conjuntos de cinco a quince individuos, sobre tocones, troncos o tallos de suculentas. Prospera en climas tropicales, xerofíticos, templados y boreales. Es un hongo que destruye la madera, se ha encontrado que posee varias enzimas: citasa, ligninasa, celulasa y hemicelulasa; la cantidad de enzima depende del sustrato, pH, temperatura, etc.

Pleurotus ostreatus recibe también otros nombres: Pleurotus cornucopiae (Paul ex Pers.) Gill., Pleurotus cornucopioides (Fr.) Gill., Pleurotus sapideus (Schl. apud Kalchbr.) Sacc., Pleurotus opuntiae (Dur. & Ler.) Sacc., Pleurotus yuccae (R. Maire), "Oreja de cazahuate" (Tepoztlán, Mor.), "Oreja blanca" (Lagunas de Zempoala, Mor.; Huautla de Jiménez, Oax.), "Hongo de cazahuate" (Tepoztlán, Mor.), "Hongo de Maguey" (Calacuaya, Edo. de Méx.; San Lorenzo Zacamulpa, Edo. de Méx.), "Hongo de encino" (Hongo de encino" (Tehuacán, Pue.), "Cazahuaté" (Tepoztlán, Mor.).

Sus características son las siguientes: tiene un píleo (2-15 cm.) en forma de media luna o de corneta, convexo o infundibular, liso o escamoso; margen introso; superficie blanca, parda, parda negruzca con tonalidades violáceas o amarillentas. Posee láminas decurrentes, de color blanco amarillento, reunidas en la base en forma de retículo. Estípite, cuando existe,

lateral, pubescente, excéntrico. Carne esponjosa, blanda o correosa, de color blanquecido; sabor farináceo agradable. Sus esporas (3.5 - 5 x 7.5-1 μ) son elipsoidales y lisas.

2. - Algunas Vitaminas del Complejo B

Las vitaminas (19, 48, 51) son compuestos orgánicos que se requieren en pequeñas cantidades para mantener el funcionamiento de muchos procesos bioquímicos. Pueden obtenerse sintéticamente o bien, dentro del organismo mediante síntesis bacteriana, en el intestino, como ocurre en muchas especies animales.

La avitaminosis se presenta cuando cantidades inadecuadas de vitamina llegan a los tejidos. Esto puede deberse a la carencia de un factor en la dieta o a diversas condiciones que puedan conducir a una deficiencia, aunque la cantidad de vitamina en la dieta sea la adecuada. Estas deficiencias inducidas pueden ser ocasionadas por una utilización escasa de las vitaminas, una absorción intestinal disminuída como el en caso de diarreas u obstrucción de conductos biliares, por un aumento de la excreción urinaria, síntesis intestinal afectada, alcoholismo crónico y mala digestión (12, 25, 48).

La historia del reconocimiento de la importancia de las vitaminas en el hombre comenzó desde hace siglos. El primer período se caracterizó por el reconocimiento de la existencia de nutrientes diferentes a los comúnmente necesitados para la formación de tejidos y proporción de energía. Este período puede decirse que duró hasta cerca del siglo XX. Durante el --

segundo período (1925-1955) se hicieron grandes progresos sobre la concentración, aislamiento, identificación química y síntesis de muchas vitaminas. Este progreso se facilitó por el uso de animales de experimentación con dietas deficientes. Después de 1940 se comenzaron a utilizar microorganismos en el descubrimiento y aislamiento de nuevas vitaminas (19).

Las investigaciones en el campo de las vitaminas desde 1948 se han concentrado en el estudio de las funciones bioquímicas de cada vitamina y la interrelación con otras vitaminas, aminoácidos, hormonas y minerales. Así, muchas de las vitaminas cuyas funciones bioquímicas se han determinado - han demostrado que su función como parte de los sistemas enzimáticos está incluida dentro del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

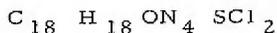
La clasificación de las vitaminas de E. V. McCollum (19) es como sigue: liposolubles e hidrosolubles. Esto no es de ninguna manera una división absoluta, ya que algunas vitaminas liposolubles se han logrado en forma hidrosoluble y viceversa. Las vitaminas liposolubles son las vitaminas A, D, E, y K. Las hidrosolubles son las vitaminas C y los miembros que forman el llamado complejo B.

TIAMINA

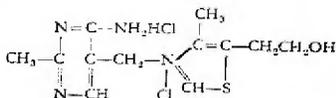
Vitamina B₁ La tiamina se le conoce con los nombres de aneurina, vitamina antiberiberi, antineurítica, orizamina, torulina, polineuramina y vitamina F; se encuentra en alimentos naturales como vegetales, granos de cereales, hígado, huevo, leches y otros materiales biológicos, bien en forma libre o bien combinada como complejo proteico o como éster del ácido piro-

fosfórico (Cocarboxilasa) (43, 58).

El clorhidrato de tiamina tiene la siguiente fórmula estructural:



P.M. 337.26



CLORHIDRATO DEL CLORURO DE TIAMINA

La tiamina interviene en forma fosforilada como grupo prostético de los sistemas enzimáticos relacionados con el metabolismo de los α -cetóácidos (descarboxilación oxidativa). Su deficiencia provoca pérdida de apetito y de peso. En estado avanzado, se producen aumento de piruvato y lactato en la sangre y puede presentarse polineuritis, que acarrea la degeneración de los nervios periféricos. Los requerimientos diarios de esta vitamina son: 1.3 - 1.6 mg. y de 10 a 100 mg en casos graves. (12, 25, 48, 67).

Propiedades físicas y químicas (6, 24, 43, 58). La tiamina pura es un polvo cristalino blanco con olor a levadura y sabor a nuez moscada. Se puede cristalizar a partir de soluciones alcohólicas-acuosas en forma de agujas monoclinicas que son higroscópicas. Su punto de fusión es de 246-250° C (con descomposición), el pH de una solución acuosa al 1% es de 3.13 y no tiene rotación óptica. Es soluble en agua, etanol de 95% y muy poco soluble en glicerina. A pH menor de 5 presenta dos bandas de absorción en la luz u. v. a 234 m μ y 267 m μ .

La tiamina se destruye rápidamente en soluciones neutras o alcalinas. Sin embargo, en soluciones ácidas resiste la esterilización a 120° C

durante media hora sin perder su actividad. La oxidación "in vitro" de la vitamina produce tiocromo, que es inactivo biológicamente. Esta facilidad de oxidación ha sido la base del método de tiocromo para cuantear la vitamina (17).

Reacciones de identificación (24, 58, 67). El clorhidrato de vitamina da un precipitado blanco con solución de cloruro de mercurio y un precipitado parado con solución de yodo. Precipita también con soluciones de yoduro mercúrico y trinitrofenol.

Oxidando la vitamina en solución alcalina de ferricianuro de potasio y extrayéndola con alcohol isobutílico, presenta una fluorescencia azul que desaparece cuando se acidifica ligeramente la mezcla.

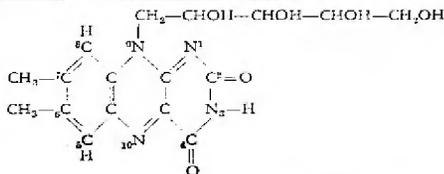
La vitamina con p-aminoacetofenoma forma un pigmento rojo el cual tiene una absorción máxima a 520 m μ .

RIBOFLAVINA

Vitamina B₂. La riboflavina se conoce también con los nombres: vitamina G, lactoflavina, ovoflavina, liocromo, uroflavina y hepatoflavina (43, 58).

Una fuente muy rica de riboflavina está constituida por las bacterias anaerobias fermentativas, la leche, el hígado, los riñones, el miocardio y muchos vegetales (25); los cereales son fuentes pobres. Su fórmula es la siguiente:

C₁₇ H₂₀ N₄ O₆
P.M. 376.4



Riboflavina o 6,7-dimetil-9 [D,1'-ribitol]-isoxalacina

La riboflavina interviene como grupo prostético en varios sistemas enzimáticos (12, 25, 48), que actúan en la oxidación de los carbohidratos y aminoácidos, dichas enzimas se conocen como flavoproteínas. Las dos flavinocenzimas son: flavina mononucleótido ó riboflavina monofosfato (FMN) y flavina-adenina-dinucleótido (FAD).

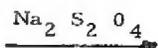
Propiedades físicas y químicas (6, 24, 48, 58). La riboflavina se presenta cristalinamente, en forma de agujas de color amarillo naranja, con punto de fusión 274-282 ° C con descomposición. Es inodora, de sabor amargo; es soluble en agua (0.012 g%), en etanol (0.0045 g%), en alcohol amílico, en acetato de amilo, es muy soluble en soluciones alcalinas, es insoluble en acetona, éter, benceno y cloroformo.

La rotación óptica de la vitamina es: $[\alpha]_D^{20} = -114$ (0.5% en NaOH 0.1N), su potencial redox es - 0.21 V a (pH 7).

La riboflavina presenta absorciones a 220, 225, 266, 371, 444 y 471 m μ ; tiene fluorescencia verde amarillenta a 565 m μ . Es de carácter anfotérico; sus constantes son: $K_a = 6.3 \times 10^{-12}$ y K_b de 0.5×10^{-5} .

Es estable frente a los ácidos, el aire y los agentes oxidantes comunes, excepto el ácido crómico, permanganato de potasio y persulfato de potasio. Es sensible a la luz u.v., inestable en solución alcalina y se reduce reversiblemente con hidrógeno activo, hidrosulfito sódico, cloruros de estaño y titanio y sulfuros alcalinos, produciendo una leucobase:

Riboflavina oxidada

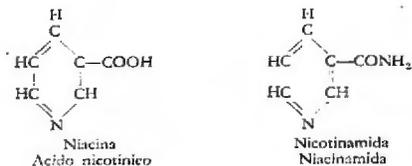
Riboflavina reducida
LEUCO-RIBOFLAVINA

La irradiación de soluciones alcalinas produce lumiflavina y en soluciones ácidas, lumicromo con fluorescencia azul (17).

Reacciones de identificación (24, 58, 67). La riboflavina reacciona con ácido sulfúrico concentrado dando una coloración rojo violeta, que al diluirse produce color amarillo; con hidróxido de sodio al 50% y calor, produce un color verde, que al diluirse pasa a rojo.

NICOTINAMIDA

Vitamina B₃. La nicotinamida (43, 58) se conoce también con los nombres de niacinamida, vitamina PP, factor PP, factor preventivo pelagramina. Se encuentra también en la forma de ácido. La fórmula condensada de la vitamina es C₆ H₆ ON₂ y su peso molecular es 122.11; su fórmula desarrollada es la siguiente:



La nicotinamida se encuentra con mayor abundancia en las levaduras; las carnes magras, el hígado, la carne de aves son buenas fuentes de la vitamina (25). Así también, la leche, el jitomate, el salmón enlatado y varios vegetales de hojas verdes, proporcionan cantidades suficientes de la vitamina, aunque no son buenas fuentes. Los requerimientos mínimos día -

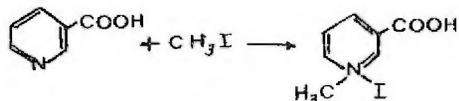
rios son de 15-20 mg (21, 67).

La vitamina interviene en el funcionamiento de dos enzimas (8, 25, 48), ya que se encuentra formando las coenzimas de nucleótidos piridínicos que son las coenzimas I y II, las cuales se conocen también como difosfopiridina nucleótido (DPN) ó nicotina-adenina dinucleótido (NAD) y trifosfopiridina nucleótido (TPN) ó nicotina-adenina dinucleótido fosfato (NADP) respectivamente.

La carencia de esta vitamina produce la pelagra en el hombre y la lengua negra en el perro. Ambas coenzimas intervienen en las reacciones de oxido-reducción catalizadas por las deshidrogenasas; las coenzimas actúan como transportadoras de hidrógeno y de electrones por su oxidación y reducción reversibles.

Propiedades físicas y químicas. (6, 17, 24, 43, 52). Debido a que esta vitamina se encuentra en forma de ácido o de amida, se describen a continuación las propiedades de ambas formas. El ácido nicotínico cristaliza en forma de agujas en alcohol, su punto de fusión es 235° C, sublima, no es higroscópico. Presenta una absorción máxima en la luz ultravioleta a 385 nm; es soluble en agua (1.67 g%), en etanol (0.73 g %) y ligeramente soluble en éter; sus constantes a 22° C \pm 2 son: $pK_a = 4.95$ y $pK_b = 10.45$; es estable frente a agentes oxidantes, dá las reacciones típicas de la piridina, con las modificaciones debidas a su grupo carboxilo. Estas reacciones son las que se utilizan para la cuantificación colorimétrica de la vitamina. El ácido nicotínico forma sales de amonio cuaternarias con los ácidos, con los álcalis for

ma las sales respectivas; con yoduros alquílicos reacciona según:

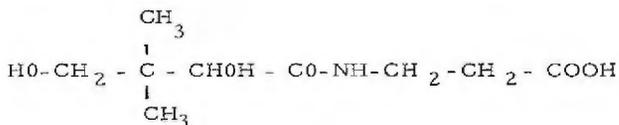


La nicotinamida cristaliza en forma de agujas en benceno, su punto de fusión es $129-131^\circ \text{C}$, su punto de ebullición es $150 - 160^\circ \text{C}$ a 5×10^{-4} mm, tiene una absorción máxima en la luz ultravioleta a $212 \text{ m}\mu$, es soluble en agua a 25°C (100 g%), en etanol (66.6 g%) en glicerina a 25°C (10 g%) muy ligeramente soluble en éter, es ligeramente higroscópica. Presenta degradación de Hoffman, reacciona con ácidos y haluros alquílicos formando sales cuaternarias.

Reacciones de identificación. (24, 58, 67). Una solución que contenga nicotinamida forma gradualmente un precipitado de color azul cuando se le añade solución de sulfato cúprico R. S.

PANTOTENATO DE CALCIO

Vitamina B₅. Esta vitamina se encuentra también en la forma de ácido libre y se conoce con los nombres de factor 2 de hígado, factor filtrado de levadura, factor antipelagra, factor A. P., factor antidermatitis (43, 58). Las fórmulas condensadas del ácido y de su sal cálcica son $\text{C}_9 \text{H}_{17} \text{O}_5 \text{N}$ y $(\text{C}_9 \text{H}_{16} \text{O}_5 \text{N})_2 \text{Ca}$ respectivamente y sus pesos moleculares son 219.2 y 276.5. La fórmula desarrollada del ácido es:



Acido Pantotenico

Las yemas de los huevos, el riñón, el hígado y la levadura son fuentes excelentes de la vitamina; los broccolis, la carne de res magra, la leche descremada, los camotes y las melazas poseen un contenido regular de la vitamina (25).

El ácido pantoténico y su sal son constituyentes de la coenzima A o coacetilasa, que es esencial para varias reacciones fundamentales del metabolismo, como son la beta oxidación, el ciclo del ácido tricarbóxico y la biosíntesis del grupo hemo; una parte importante de la vitamina se encuentra unida a proteínas, como la proteína portadora de acilos (PPA).

Propiedades físicas y químicas. (16, 43, 52, 58). El pantotenato de calcio es una sal blanca microcristalina, muy soluble en agua, su rotación óptica es: $[\alpha]_D^{25} = + 24.3$. Es sensible a los ácidos, álcalis y el calor; su constante de disociación es $K_a = 3.9 \times 10^{-5}$.

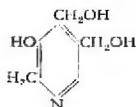
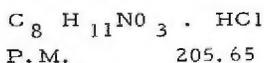
El ácido pantoténico es un aceite viscoso, incoloro, muy soluble en agua, acetato de etilo, ácido acético glacial, poco soluble en alcohol amílico, insoluble en benceno y cloroformo; su rotación óptica es: $[\alpha]_D^{25} = + 37.5^\circ$. Es

hidrofílico y fácilmente se esterifica; sus ésteres metílicos y etílicos son activos en animales, pero muy poco activos en microorganismos. Su actividad vitamínica es menor cuando los grupos hidroxilo en la parte del ácido pantoténico en la molécula están esterificados. La actividad se regenera con saponificación cuidadosa. También es sensible a ácidos, a álcalis y al calor.

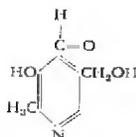
Reacciones de identificación. (24, 58, 67). En presencia de hidróxido de sodio R. S. y sulfato cúprico R. S. se produce un color azul intenso. Si se calienta con NaOH 1 N durante un minuto y se enfría, se le añaden 5 ml. de HCl 1 N y dos gotas de cloruro férrico R. S. se produce un color amarillo intenso.

PIRIDOXINA

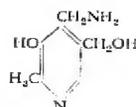
Vitamina B₆ . Se le conoce también como adermina, factor antiacrodémico o antidermatítico (43, 58) es un miembro muy extendido del complejo B. La contienen gran número de alimentos de origen animal y vegetal y se puede obtener extrayéndola de estos materiales naturales o por síntesis. La mayoría de las veces se encuentra asociada con proteínas y con el almidón y muy pocas veces en su forma libre. Se sabe que existen tres formas de la vitamina piridoxina, piridoxamina y piridoxal (6). De estas formas, la primera que se reconoció y aisló fue la piridoxina, cuya fórmula es la siguiente:



Pyridoxina (2)
(En Europa,
Adermina)



Pyridoxal



Pyridoxamina

Existe la evidencia de que la vitamina B₆ está relacionada con la utilización de los ácidos grasos no saturados y con el metabolismo de las proteínas (12, 25, 48). Su deficiencia provoca ataques convulsivos de tipo epileptiforme, debilidad muscular y acrodinia. La demanda diaria de piridoxina es de 1-5 mg.

Propiedades físicas y químicas . (6, 24, 43, 58). Es un polvo cristalino blanco, inodoro, salado, cuya base es muy soluble en agua; punto de fusión de la base 160 °C y del hidrocloreuro 204-206 °C con descomposición; presenta un máximo de absorción a 326 m μ , es sensible a la luz y estable al calor, ácidos y álcalis. Algunos ácidos, como el sulfúrico, silicotúngstico o fosfotúngstico la precipitan. Es muy dializable, se sublima fácilmente y todas las formas de la vitamina se adsorben en carbón y greda a partir de soluciones neutras o acidificadas.

Reacciones de identificación. (24, 58, 67). - Una solución de clorhidrato de piridoxina presenta un color azul cuando se le añade una solución alcohólica de 2,6 dicloroquinona clorimida.

La piridoxina en presencia de diazometano y yoduro de metileno calentada primeramente en una solución alcohólica que contiene sodio y después en cloroformo, produce un color violeta, que indica la presencia de una α -picolina.

Cuando la piridoxina reacciona con una solución al 10% de cloruro férrico produce un color rojo café que indica la presencia de grupos hidro-

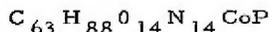
xilos fenólicos.

La piridoxina responde también a las pruebas con ácido sulfanílico diazoado, p- aminoacetofenona diazoada y p-nitroanilina diazoada.

CIANOCOBALAMINA

Vitamina B₁₂. Factor antianemia perniciosa; fué descubierta en 1948 y se le ha encontrado y aislado en hígado y algunos cultivos de Streptomyces grius y Streptomyces aureofaciens (7, 21, 25).

Su fórmula es la siguiente:



P. M. 1355.42

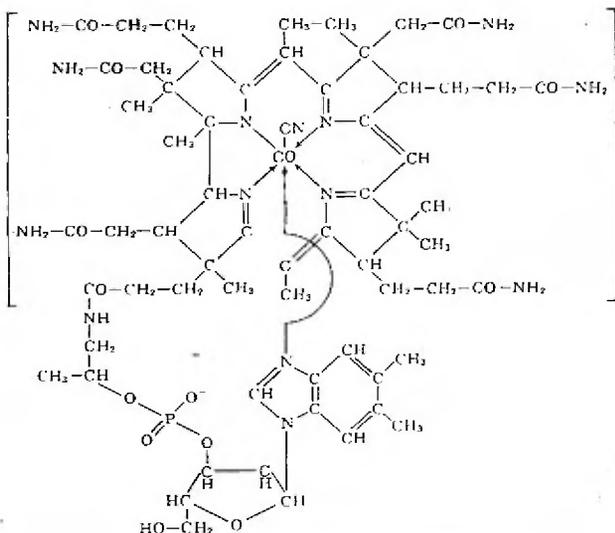


FIG. 1. Vitamina B₁₂, cianocobalamina (C₆₃H₈₈O₁₄N₁₄CoP)
Peso molecular: 1355,42

Propiedades físicas y químicas. (6, 43, 58, 67). Existe como polvo o cristales en forma de agujas de color rojo; es inodora e insípida. Es muy higroscópica en su estado anhidro, soluble en agua hasta 1.25%, relativamente soluble en alcoholes y fenoles de peso molecular bajo, pero insoluble en la mayoría de los otros disolventes orgánicos. Los cristales comienzan a oscurecerse a 210-220° C y se funden por encima de 300° C. Su absorción máxima en agua es: 550 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 64$); 361 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 204$) y 278 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 115$). Su rango de estabilidad máxima está a un pH de 4.5 - 5.0 y su rotación óptica es $[\alpha]_{656}^{23} = -59 + 9^{\circ}$.

Aunque la forma más corriente de la vitamina B₁₂ es la cianocobalamina en la que el grupo ciano está coordinado al átomo de cobalto, existen otras formas en las que este grupo está sustituido por el OH (Hidroxocobalamina B_{12a}), -NO₂ (nitritocobalamina B_{12c}) y -HSO₃ (sulfitocobalamina). La vitamina tiene actividad catalítica en la síntesis de timidina y otros compuestos nucleares, así como en la síntesis o utilización de los grupos metilos (12, 25, 48). Las necesidades del organismo de esta vitamina son de 1-5 mcg diarios (21, 43).

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

I. - CULTIVOS.

a). - CEPAS.

Para la determinación de las vitaminas del complejo B anteriormente indicadas, producidas por Basidiomycetes: Pleurotus ostreatus y Tricholoma nudum se hicieron cultivos sumergidos de ambos hongos en matraces Erlenmeyer de 300 ml. de capacidad. Estos hongos se obtuvieron de la Colección de Cepas de la Facultad de Química, UNAM.

b). - MEDIOS.

Pleurotus ostreatus se cultivó en el medio denominado IV-VI y cuya composición química es la siguiente:

Melaza	5.00 g
Agua de cocimiento de maíz	1.35 g
Sulfato de amonio	0.20 g
Cloruro de sodio	0.20 g
Carbonato de calcio	0.50 g
Harina de soya	2.00 g
Glucosa	2.00 g
Agua destilada	100 ml.

Este medio se preparó disolviendo la glucosa y las sales exceptuando el carbonato de calcio, en el agua destilada, luego se añadieron la melaza y el agua de cocimiento de maíz y finalmente la harina de soya; para facilitar la disolución de estos componentes, el medio se puso en el autoclave a 8 - 9 l b de presión, se enfrió y se ajustó el pH a 5.6, utilizando ácido fosfórico o hidróxido de amonio.

El medio así preparado se repartió en los matraces Erlenmeyer, colocando en cada uno 75 ml., se esterilizaron a 121° C durante 15 minutos y por último se añadió el carbonato de calcio individualmente, previamente esterilizado a 160-170° C durante una hora, en condiciones de esterilidad.

La cepa de Pleurotus ostreatus se resembró de un tubo con Sabouraud a uno con el medio IV-VI adicionado de 1.8 g% de agar y se cultivó a 28° C durante 8 días. Con agua destilada estéril se hizo una suspensión de esporas y se inocularon dos matraces con 7.5 ml. de la suspensión, los que sirvieron como semilla para la fermentación. Se incubaron durante siete días a 28° C \pm 2 colocándolos en agitador rotatorio a 150 r.p.m. Al término de este tiempo se mezcló el contenido de los dos matraces y se desmenuzó estérilmente en una licuadora, para inocular 18 matraces con 7.5 ml. c/u. Se incubaron a 28° C \pm 2 durante 15 días, recolectando dos matraces cada 24 horas durante cinco días y del resto, dos matraces cada 48 horas. Las muestras obtenidas, fueron homogeneizadas en baño de hielo con un homogenizador de tejidos con pistilo de teflón y aforadas a 250 ml.; se repartieron en frascos de 60 ml. de capacidad, se esterilizaron 10 minutos a

a 121° C y se congelaron.

Tricholoma nudum se cultivó en el medio I T y su composición química es la siguiente:

Melaza	5,000 g
Agua de cocimiento de maíz	2.324 g
Glucosa	2.000 g
Tartrato de amonio	0.800 g
Cloruro de sodio	0.200 g
Acetato de amonio	0.100 g
Fosfato de potasio monobásico	0.100 g
Agua destilada	100 ml.

Este medio se preparó disolviendo todas las sales y la glucosa en el agua destilada, luego se añadieron la melaza y el agua de cocimiento de maíz, se le ajustó el pH a 5.6 con ácido fosfórico o hidróxido de amonio.

El medio se repartió en los matraces Erlenmeyer, colocando en cada uno 50 ml., se esterilizaron a 121° C durante 15 minutos.

La cepa de Tricholoma nudum se resembró de un tubo con Sabouraud a uno con medio IV-VI sólido y se cultivó a 18° C durante cuatro días. Con agua destilada estéril, se hizo una suspensión de esporas y se inocularon tres matraces con 5 ml. de la suspensión semilla. Se incubaron durante tres días a 18° C \pm 2 en agitador rotatorio a 225 r.p.m. En condiciones de esterilidad, los tres matraces se mezclaron, se desmenuzaron en la licuadora y se inocularon 24 matraces con 5 ml. c/u, de esta suspensión.

Se incubaron a $18^{\circ} \text{C} \pm 2$ durante tres días, recolectando cuatro matraces cada 12 horas.

Las muestras obtenidas fueron homogeneizadas al igual que las de Pleurotus en baño de hielo; se repartieron en frascos de 60 ml. de capacidad y se esterilizaron 10 minutos a 121°C y se congelaron.

II ANALISIS.

En todas las muestras se determinaron las diferentes vitaminas del complejo B citadas y además, se determinaron azúcares reductores.

Aminoácidos	%	Sales minerales sobre base seca.	%	Vitaminas	mcg/ml.
Alanina	8	Calcio	1	Riboflavina	2.0
Arginina	8	Fósforo	2.5	Niacina	2.4
Ac. Glutámico	8	Potasio	1.5	Ac. pantoténico	1.6
Leucina	6			Biotina	---
Prolina	5			Piridoxina	8.5
Isoleucina	3.5			Tiamina	0.53
Treonina	3.5				
Valina	3.5				
-alanina	2				
Metionina	1				
Cistina	1				
Polisacáridos complejos					
Acido láctico					
Nitrógeno 4% P/V					

CUADRO No. 2. - Composición del agua de cocimiento de maíz (49).

Sólo los valores reportados de vitaminas fueron obtenidos experimentalmente.

VITAMINA	MICROORGANISMOS DE PRUEBA	PRINCIPIO DE LA PRUEBA
TIAMINA	<i>L. fermentum</i> ATCC 9833	Turbiedad del cultivo
	<i>L. mesenteroides</i>	Turbiedad del cultivo Producción de ácido.
	<i>Str. salivarius</i>	Peso del micelio Producción de CO ₂
	<i>S. cerevisiae</i>	Producción de CO ₂
RIBOFLAVINA	<i>L. casei</i> ATCC 7489	Turbiedad del cultivo Producción de ácido
NICOTINAMIDA	<i>L. mesenteroides</i>	Turbiedad del cultivo Producción de ácido
	<i>L. arabinosus</i> ATCC 8014	Turbiedad del cultivo Producción de ácido
	<i>L. caseis</i>	Producción de ácido
	<i>Proteus sp.</i>	Turbiedad del cultivo
PIRIDOXINA	<i>L. casei</i>	Producción de ácido
	<i>L. arabinosus</i>	Turbiedad del cultivo Producción de ácido
	<i>N. stpphila</i> ATCC 9276	Peso de micelio
PANTOTENATO DE CALCIO	<i>L. mesenteroides</i>	Turbiedad del cultivo
	Levadura	Turbiedad del cultivo
	<i>L. arabinosus</i> ATCC 8014	Turbiedad del cultivo
	<i>L. casei</i>	Turbiedad del cultivo Producción de ácido
	<i>P. morgani</i>	Turbiedad del cultivo Producción de ácido
CIANOCOBALAMINA	<i>L. leichmannii</i> ATCC 7830	Turbiedad del cultivo
	<i>E. coli</i>	Turbiedad del cultivo
	<i>O. melhamensis</i>	Turbiedad del cultivo
	<i>E. gracilis</i>	Turbiedad del cultivo
	<i>C. nana</i>	Turbiedad del cultivo

CUADRO No. 3. - Microorganismos utilizados para la determinación microbiológica de vitaminas (51, 54).

DETERMINACION DE REDUCTORES TOTALES POR EL METODO DE FEHLING.

El método de Fehling (9) se basa en la propiedad que poseen ciertos azúcares, debida a sus grupos aldehídicos o cetónicos de reducir una solución alcalina de cobre; la cantidad de cobre reducida, es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes.

El reactivo de Fehling consta de dos soluciones: la solución A que contiene 34.64 g de sulfato de cobre pentahidratado, disueltos y aforados a 500 ml. con agua destilada; la solución B contiene 173 g de sal de la Rochelle (tartrato doble de sodio y potasio) y 50 g de hidróxido de sodio aforados a 500 ml. Estas soluciones se guardan separadamente hasta el momento de utilizarse y están ajustadas de manera que: 5 ml. de la solución A mezclada con 5 ml. de la solución B, se reducen exactamente con 0.05 g. de glucosa.

PROCEDIMIENTO:

Cada una de las muestras se centrifugó a 300 r.p.m. durante 10 minutos y del sobrenadante se tomaron alícuotas diferentes, se precipitaron las proteínas con tungstato de sodio al 10 % y ácido clorhídrico concentrado en la proporción de 7:2, se calentaron durante 5 minutos a 60° C, se centrifugaron y el sobrenadante se neutralizó con HaOH 1 N empleando fenolftaleína como indicador, se aforaron y con esa solución se titularon 5 ml. de la solución A de Fehling y 5 ml. de la solución B, que se calentaron a ebullición; se utilizó como indicador, una solución de azul metileno al 1% hasta vire rojo ladrillo.

CALCULOS:

Anotando los ml. de problema que se utilizaron en la titulación de la solución de Fehling, se hacen los siguientes cálculos:

$$\% \text{ Reductores} = 0.05 \times \frac{100}{\text{ml.}} \times \frac{\text{aforo}}{\text{alícuota}}$$

METODOS DE CUANTIFICACION DE TIAMINA

De los métodos biológicos existentes, los bioensayos en ratas, pollos y palomas se basan en la actividad antineurítica de la tiamina (24).

Entre los métodos microbiológicos (20) existen los métodos de Williams, Mc Mahan y Eakin (71) basados en el efecto estimulativo de la tiamina en el crecimiento de levaduras como Saccharo myces cerevisiae que se mide turbidimétricamente. Se incluyen también procedimientos de fermentación recomendados por Schultz, Atkin y Frey (55) basados en medir el incremento de la fermentación alcohólica por la presencia de tiamina añadida. Para llevar a cabo un método altamente específico, las muestras se tratan con sulfito de sodio para destruir las sustancias interferentes que poseen una actividad similar a la de la tiamina.

Algunos de los métodos fisicoquímicos para la determinación de tiamina se basan en medir la concentración de sustancias producidas a partir de la vitamina, de tal manera que el porcentaje de conversión de la tiamina al producto cuantificado sea casi siempre constante dentro de una escala de concentración usada en estos métodos.

Los métodos de Kinnersley y Peters (37, 38), de Willstaedt y Barany

(73) y el de Melnick y Field (33, 35) dependen de la formación de un pigmento formado por la vitamina y una amina aromática diazotada que se mide colorimétricamente o fotométricamente. Las aminas aromáticas empleadas son: ácido sulfanílico, 2, 4 dicloroanilina y p-amino acetofenoma, respectivamente.

Dentro de los métodos fisicoquímicos, (23) el procedimiento del tiorcromo, propuesto primeramente por Jansen (34) y modificado posteriormente por Hennessy y Cerecedo (28), se basa en medir fluorométricamente el tiorcromo formado por la oxidación de la tiamina con ferricianuro de potasio en una solución alcalina y la subsecuente extracción con isobutanol. (13).

El primer problema en cualquier método fisicoquímico es la obtención de la vitamina en solución, por lo que en muchos casos se requiere primero un proceso de hidrólisis y después un proceso de extracción. En fuentes naturales, la ocurrencia de la tiamina suele ser en forma de ésteres fosfóricos, los cuales necesitan una hidrólisis enzimática previa. La taquidiasa, amilasa, clarasa y otras fosfatasas se usan con este fin, mantenidas por un amortiguador a un pH óptimo para la actividad de la enzima (27, 28, 30).

METODO FLUOROMETRICO PARA LA DETECCION DE TIAMINA

A continuación se hace la descripción del método usado (13, 28); primero se describe la preparación de los reactivos, después el procedimiento seguido y por último los cálculos realizados.

REACTIVOS:

1. - Amortiguador de acetato de sodio pH 4.5 : Mezclar 546.97 g de acetato de sodio anhidro, 736 ml. de ácido acético glacial y 2600 ml. de agua bidestilada.
2. - Solución ácida de cloruro de potasio al 25%: Añadir 8.5 ml. de ácido clorhídrico concentrado a 250 g de cloruro de potasio disueltos en 1000 ml. de agua bidestilada.
3. - Solución de ferricianuro de potasio alcalina : Pipetear 5 ml. de una solución al 8% de ferricianuro de potasio en un matraz volumétrico de 100 ml. y llevar a volúmen con hidróxido de sodio al 15%.
4. - Alcohol metílico absoluto.
5. - Alcohol isobutílico redestilado.
6. - Decalco para tiamina: Fisher Scientific Co., Pittsburg, Pa.
7. - Solución de enzima al 10% : Disolver 5 g de clarasa (Takamine Labs., Clifton, N. J.) y llevar a 50 ml. con agua bidestilada. Prepararla reciente.
8. - Solución patrón de clorhidrato de tiamina U.S.P. : 1.0 mcg/ml. en 10% de cloruro de potasio ácido. Tomar 5 ml. de una solución que contenga 50 mcg/ml. de clorhidrato de tiamina U.S.P., añadir 100 ml. de cloruro de potasio ácido al 25% y llevar a 250 ml. con agua bidestilada. Se prepara antes de usarse.

PROCEDIMIENTO:

En nuestro caso ha sido conveniente primero descongelar las mues

tras a temperatura ambiente y después tomar alícuotas representativas (10-20 ml.), colocándolas en tubos de centrifuga de 50 ml. de capacidad. Fué necesario mantener el pH entre 4 y 5 para obtener una hidrólisis enzimática óptima de cualquier cocarboxilasa presente en el extracto, con 2.5 ml. de amortiguador de acetato de sodio pH 4.5 y 2.5 ml. de solución de enzima al 10%. El contenido de cada tubo se mezcló perfectamente y se incubó en baño de agua a 50° C durante dos horas, con frecuente agitación. Después del período de incubación, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente, se aforaron a 25 ml. y se centrifugaron a 3000 r. p. m. hasta que el sobrenadante se obtuviera claro. De cada uno de los sobrenadantes se tomaron 15 ml. para pasarlos por una columna de decalco activado.

Las columnas fueron preparadas de la siguiente manera: una pequeña porción de lana de vidrio se colocó en uno de los extremos de una bureta, se llenaron con un poco de agua y se introdujo paulatinamente una suspensión en agua de "decalco" para que se sedimentara gentilmente. Una vez que las columnas hubieron alcanzado 13 cm. de longitud y sin dejar que se secan, se añadieron 15 ml. de agua caliente y enseguida las muestras. Las columnas se lavaron nuevamente con agua caliente e inmediatamente se agregaron 10 ml. de cloruro de potasio al 25% caliente (teniendo cuidado de que no hubiera hervido, ya que puede recrystalizar dentro de la columna, con la subsecuente pérdida de muestra) que se recolectaron en un matraz aforado de 25 ml. Después de la elución de la tiamina se añadieron de 5 a 10 ml. de agua fría y los eluatos se llevaron a volumen.

Alícuotas de 5 ml. de los eluatos se pipetearon a tubos de centrífuga de 30 ml. de capacidad para llevar a cabo la oxidación de la tiamina a tiocromo de la siguiente manera: se añadieron exactamente 2 ml. de alcohol metílico absoluto y 3 ml. de solución de ferricianuro de potasio alcalina, se mezclaron y se añadieron 13 ml. de alcohol isobutílico. Se agitaron vigorosamente durante 90 seg. Se centrifugaron 5 minutos, la capa acuosa se separó por medio de sifón, desechándola y se añadieron aproximadamente 2-3 g. de sulfato de sodio anhidro a la solución de alcohol. Se agitaron 30 seg. y se centrifugaron. Una parte de la solución de alcohol isobutílico se decantó a tubos de Kahn, teniendo cuidado de eliminar el sulfato de sodio.

El testigo se preparó tomando exactamente 5 ml. de la solución patrón de tiamina, se trató idénticamente a las muestras, excepto que se añadieron 3 ml. de hidróxido de sodio al 15% en lugar de 3 ml. de solución de ferricianuro de potasio alcalina. Las muestras y el testigo se prepararon simultáneamente para prevenir variaciones en los resultados.

Para las lecturas, el fluorómetro se ajustó con el selector de sensibilidad y los filtros de densidad neutra. El filtro primario utilizado fue 7-60 = $365\text{ m}\mu$, los secundarios fueron 2 A = $415\text{ m}\mu$, 47 B = $436\text{ m}\mu$ y 20% de densidad neutra y se usó rejilla. Con el testigo se estabilizó el cero de la escala. manteniendo la puerta del fluorómetro cerrada; se determinó la fluorescencia del patrón y de los problemas, teniendo cuidado de hacer las lecturas con rapidez, ya que la luz UV descompone al tiocromo.

CALCULOS:

Con las lecturas obtenidas, se hacen los siguientes cálculos:

$$\frac{\text{Lectura problema}}{\text{Lectura patrón}} \times FZ = \text{mcg. de tiamina/ml. de muestra}$$

donde:

F = Factor de dilución.

Z = Concentración del patrón.

**
METODO DE CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA.

Para la determinación de riboflavina se conocen varios métodos - (23, 30, 52, 58) : colorimétricos, fluorométricos, polarográficos, enzimáticos o bioquímicos, microbiológicos y bioensayos. De todos éstos, los que tienen más aplicación son los fluorométricos y los microbiológicos.

El método colorimétrico (30, 52) utiliza la propiedad de la vitamina de ser colorida, pero es menos sensible que el método fluorométrico y no puede aplicarse a la mayoría de los materiales biológicos.

El método polarográfico (40) se basa en que las vitaminas del complejo B son reducibles en el electrodo goteante de mercurio, siendo la riboflavina la que más fácilmente lo hace. La corriente de difusión de la vitamina es proporcional a su concentración a un pH de 7.2 en solución reguladora de fosfatos. El método tiene poca aplicación y no se usa en materiales biológicos.

Los métodos bioquímicos (58) se basan en la medición de la captación

ción de oxígeno, por un sistema bioquímico del cual forma parte la vitamina como flavina-adenina-dinucleótido.

Los bioensayos (18, 58) consisten en utilizar ratas recientemente - destetadas o bien, pollos jóvenes, que se alimentan con una dieta pobre en - riboflavina durante dos a tres semanas, tiempo después del cual el creci - miento de los animales de ensayo casi ha cesado; luego se separan los ani - males de ensayo de acuerdo a su peso, sexo, etc. Los grupos se alimentan con diferentes niveles de riboflavina patrón y de las muestras para ensayo, obteniéndose así datos que se pueden graficar para obtener la cantidad de - vitamina presente en las muestras. En este método influye la cantidad y cla - se de carbohidratos y grasas presentes.

El método microbiológico (18, 37, 52, 58, 63) está basado en que para ciertas bacterias lácticas la riboflavina es un factor de crecimiento, esto - es, que si no se encuentra en el medio, las bacterias no crecen; así la tur - biedad producida por el crecimiento del microorganismo en un medio que - contiene riboflavina, es proporcional a la cantidad de la misma. Puede tam - bién determinarse por titulación del ácido producido por el metabolismo de las bacterias, después de 72 h. de incubación. El microorganismo más uti - lizado para este fin ha sido Lactobacillus casei, (4) En el método, se traza una curva patrón utilizando riboflavina U.S.P. en diferentes cantidades, ob - teniéndose por lo tanto diferentes valores de la turbiedad.

El método fluorométrico (23, 52, 53, 57, 58), se basa en la medición de la intensa fluorescencia que posee la vitamina en solución acuosa, des -

pués de haberse extraído con ácido diluido en caliente; es necesario mantener el pH ácido por adición de solución amortiguadora.

METODO FLUOROMETRICO PARA LA DETECCION DE RIBOFLAVINA

REACTIVOS :

1. - Acido clorhídrico 5 N : Diluir el ácido clorhídrico concentrado 50:50.
2. - Solución de acetato de sodio 2 N : Disolver 82 g de acetato de sodio anhidro en suficiente agua para 500 ml. Almacenar en el refrigerador y adicionar 1 ml. por cada 10 ml. de muestra, antes de tratarla con permanganato de potasio.
3. - Solución de permanganato de potasio al 1 %: Disolver 1 g de permanganato de potasio en 100 ml. de agua destilada.
4. - Solución de peróxido de hidrógeno al 3% : Debe prepararse FRESCA DIARIAMENTE a partir de la solución al 30%.
5. - Amortiguador de acetato de sodio 2 N pH 4.5 : Disolver 544 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ó bien 328 g de acetato de sodio anhidro en 1200 ml. de agua, adicionar 440 ml. de ácido acético glacial y llevar a volumen de 2000 ml. con agua bidestilada. Usar 5 ml. de amortiguador por cada 100 ml. de solución de riboflavina en la dilución final.
6. - Solución de hidrosulfito de sodio: Disolver 0.5 g. de hidrosulfito de sodio y 0.5 g de bicarbonato de sodio en 10 ml. de agua helada. Mantenerla fría, usando baño de hielo y preparar antes de usarla.
7. - Solución patrón U. S. P. de riboflavina: Disolver 100 mg de la ri-

boflavina U.S.P., previamente secada en la obscuridad sobre pentóxido de fósforo durante 24 h., en un matraz volumétrico de 1 lt. de vidrio no actínico con 600 ml. de agua, calentar en baño de vapor y con agitación hasta disolución. Enfriar y añadir 7.4 ml. de ácido acético glacial y aforar. Refrigerar toda la noche y ajustar el volúmen a la temperatura del refrigerador. Cada ml. de esta solución representa 100 mg. de riboflavina. Guardar en la obscuridad o en frascos no actínicos de 500 ml. y adicionar 10 ml. de tolueno a cada uno. La solución es estable por un año a la temperatura del refrigerador. Tomar una alícuota de 5 ml. de esa solución en un matraz volumétrico de 100 ml. de vidrio no actínico y aforar con agua desionizada, mezclar bien. A una alícuota de 10 ml. de esta solución añadir 25 ml. de amortiguador de acetato de sodio 2 N de pH 4.5 y aforar a 500 ml. en matraz volumétrico de vidrio no actínico. Cada ml. representa 0.1 mcg. de riboflavina y debe prepararse diariamente.

PROCEDIMIENTO:

En matraces volumétricos de vidrio no actínico de 50 ml., se colocaron alícuotas de 5 ml. de cada una de las muestras previamente descongeladas y se les añadieron 5 ml. de ácido clorhídrico 5 N, se aforaron con agua destilada y se mezclaron bien. Las soluciones se pasaron a matraces Erlenmeyer de 250 ml. de vidrio no actínico, y se calentaron en el autoclave durante 50 minutos a 121° C (15 lb. de presión). Se enfriaron en corriente de agua.

De las soluciones anteriores, se tomaron alícuotas de 25 ml. y se

colocaron en matraces volumétricos de 100 ml. de capacidad de vidrio no - actínico y se les adicionaron 2.5 ml. de acetato de sodio 2 N. Se mezclaron bien, se calentaron en baño de vapor hasta que las soluciones alcanzaron una temperatura de 60° C, se les añadió 1 ml. de sol. de KMnO_4 al 1% y se agitaron vigorosamente durante 1 minuto. A continuación se les añadió 1 ml. de H_2O_2 al 3% con el fin de destruir el exceso de KMnO_4 agitando. Se enfriaron en corriente de agua. Se añadieron 5 ml. de acetato de sodio 2 N de pH 4.5 y se aforaron con agua destilada.

Las muestras reposaron durante dos o tres horas y se filtraron sin agitación, para proceder a leer la fluorescencia.

Los filtros primarios que se utilizaron fueron 47 B=436 $\text{m}\mu$, 2 A = 415 $\text{m}\mu$; el filtro secundario fue 2 A-12 =510 $\text{m}\mu$. y sin rejilla. Para proceder a hacer las lecturas de fluorescencia se colocó un tubo o cubeta de Kahn que contenía acetato de sodio 2 N pH 4.5 diluído (5:1000) como testigo en el orificio de la puerta del fluorómetro, se cerró la puerta y se estabilizó el cero de la escala. Se substituyó este tubo, por otro que contenía el patrón de riboflavina y se leyó la fluorescencia, se le adicionaron una o dos gotas de hidrosulfito de sodio con el fin de destruir la fluorescencia de la riboflavina y obtener así cualquier fluorescencia residual de sustancias interferentes. En el caso del patrón, este valor es generalmente cero. Este procedimiento se repitió con cada una de las muestras que se analizaron, anotando las dos lecturas de cada muestra.

CALCULOS:

Con los datos obtenidos se hicieron los siguientes cálculos: restar el valor del testigo o blanco (fluorescencia obtenida después de tratar el problema con hidrosulfito de sodio "fluorescencia extinguida" del valor obtenido inicialmente y dividirlo entre el valor del patrón; multiplicar por el factor apropiado y por la concentración del patrón para obtener la cantidad de riboflavina en mcg. por ml. de muestra original.

$$\frac{U - u}{S - s} \times F Z = \text{mcg. de riboflavina /ml. de muestra.}$$

donde:

U = Fluorescencia de la muestra.

u = Fluorescencia de la muestra después de la extinción.

S = Fluorescencia del patrón.

s = Fluorescencia del patrón después de la extinción.

$$F = \frac{D}{m}$$

D = Factor de dilución de cada muestra.

m = Cantidad de muestra utilizada para el análisis.

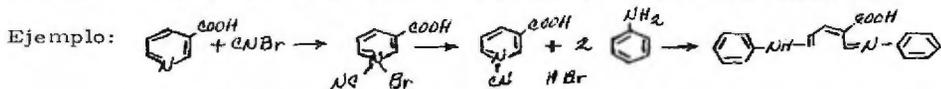
Z = Concentración del patrón 0.1 mcg/ml.

METODOS DE CUANTIFICACION DE NICOTINAMIDA

Los métodos que se conocen para la determinación de nicotinamida (52, 53) se dividen en químicos, biológicos y microbiológicos.

En los métodos químicos (5, 30, 52, 69), se aprovecha la gran reactividad que proporciona el nitrógeno al anillo de piridina, para producir -

compuestos coloridos y que consisten en la ruptura del núcleo de piridina, la liberación del nitrógeno y la conjugación de la cadena resultante con una amina aromática. Dependiendo del agente que se utilice para la ruptura del anillo piridínico y de la amina empleada en la conjugación, se han descrito varios métodos. Así, los hay que utilizan bromuro de cianógeno, 2,4-dinitroclorobenceno, tricloruro de fósforo, etc., los que al unirse al nitrógeno de la piridina, hacen a la molécula de la vitamina susceptible de descomposición, el anillo se rompe fácilmente y el nitrógeno se libera en forma de amina terciaria. Al añadir una amina al esqueleto carbonado formado, se obtiene un compuesto colorido estable, susceptible de medición. Las aminas que se han utilizado más frecuentemente son: anilina, p-metilaminofenol, p-aminoacetofenona, beta-naftilamina, ácido sulfanílico, p-fenetidina, etc.



Estos métodos no son específicos para nicotinamida, ya que muchos derivados de la piridina (trigonelina) y otros compuestos de naturaleza desconocida (61) dan también esa reacción. En materiales biológicos, la presencia de sustancias coloridas, interfieren con la apreciación del color desarrollado (69).

Los métodos biológicos o bioensayos (52, 58, 61) utilizan perros y pollos principalmente, pero no se recomiendan para determinaciones precisas de la vitamina pues se requieren muestras libres de proteínas y aminoácidos, ya que falsean los resultados; tienen el inconveniente adicional de ser largas y costosas.

Los métodos microbiológicos (3, 8, 35, 52, 58, 61, 72) consisten en utilizar a ciertos microorganismos que requieren la presencia de la vitamina para poder crecer.

El método que mejores resultados ha proporcionado y más se ha aplicado, ha sido el descrito por Snell y Wright (61) y es el que básicamente se empleó en la presente tesis y utiliza a Lactobacillus plantarum como microorganismo prueba; Johnson (35) describe un método utilizando a Leuconostoc mesenteroides, Williams (72) utiliza a la levadura Torula cremoris y Berkman (8) emplea a Pasteurella suisseptica.

Estos métodos se ven influidos por el tipo de extracción (3, 11) que se practica sobre la muestra. La extracción más recomendada ha sido por hidrólisis ácida más que la alcalina y la digestión enzimática.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETECCION DE NICOTINA MIDA.

El método utilizado emplea a Lactobacillus plantarum cepa 17-5 (ATCC 8014), cuyo crecimiento depende de la cantidad de vitamina presente en la muestra (3, 26, 36, 58, 61). Se requiere un medio de cultivo que posea todos los elementos necesarios para el crecimiento del microorganismo, a excepción de la nicotinamida, que proporcionará la muestra de ensayo.

REACTIVOS:

1.- Acido sulfúrico 1 N: En suficiente agua destilada, agregar lentamente 27.2 ml. de ácido sulfúrico concentrado, dejar enfriar y aforar a 1 lt.

2. - Medio de ensayo BACTO-NIACINA : Suspender 7.5 g del medio en 100 ml. de agua destilada y calentar a ebullición durante dos a tres minutos. El ligero precipitado que se forma, se distribuye por agitación, enfriar en corriente de agua. Preparar diariamente.

3. - Solución patrón de nicotinamida U. S. P.: Pesar 50 mg. de la vitamina y aforar a 100 ml. con alcohol absoluto y guardarlo en el refrigerador. La solución es estable tres meses.

4. - Solución patrón de trabajo: Preparar una solución mensual a partir de la solución anterior, diluyendo 5 ml. a 200 ml. con agua bidestilada y añadirle unas gotas de cloroformo como conservador y guardarla en el refrigerador. De la solución mensual, tomar una alícuota de 4 ml. y aforar a 100 ml.; tomar 8 ml. de esta dilución y aforar a 100 ml. La concentración final es de 0.04 mcg/ml. de nicotinamida U. S. P.

PROCEDIMIENTO:

En un matraz volumétrico de 200 ml. se colocó una alícuota de 2 ml. de la muestra para ensayo y se le añadieron 100 ml. de ácido sulfúrico 1 N, se calentó en el autoclave durante 30 minutos a 121^o C, se enfrió y se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido de sodio T. S. y se llevó a volumen con agua destilada.

En tubos de ensayo de 16 X 150 mm., por duplicado, se colocaron 1.0, 1.5 y 2.0 ml. de cada una de las muestras y se les añadió la suficiente cantidad de agua destilada para tener un volumen de 5 ml. (4.0, 3.5 y 3.0 ml., respectivamente).

En otros tubos del mismo tamaño, también por duplicado, se colocaron 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 y 5.0 ml. del patrón de trabajo (0.04 mcg/ml.) y con agua destilada se completaron los tubos a un volumen de 5 ml.

A cada uno de los tubos, se les añadieron 5 ml. del medio de ensayo; en un tubo se pusieron 10ml. del medio, en los que se hizo la suspensión del microorganismo para la inoculación. Todos los tubos se cubrieron con una franela y se esterilizaron en el autoclave durante 10 minutos a 121° C. Se enfriaron en agua corriente y se procedió a la inoculación.

PREPARACION DEL INOCULO:

La suspensión de Lactobacillus plantarum venía en pequeñas ampollitas, congeladas en nitrógeno líquido; una vez descongeladas las ampollitas que se necesitaban, se tomó 1.0 ml. de dicha suspensión con una jeringa estéril de 2.5 ml. y se mezcló muy bien en el tubo con los 10 ml. de medio.

Con esta suspensión homogénea, se inocularon los tubos, añadiendo a cada uno, una gota de la suspensión, utilizando una pipeta volumétrica de 10 ml.

Los tubos una vez inoculados, se mezclaron, se cubrieron con una franela y se incubaron en baño de agua a 35-37° C durante 18 a 24 h.

Es esencial que la curva patrón se haga para cada ensayo por separado, ya que las condiciones de esterilización, temperatura de incubación, etc., influyen en las lecturas de la curva y no pueden duplicarse exactamente de una a otra vez.

Las lecturas por turbidimetría, se hacen después del período de -

incubación, utilizando un colorímetro fotoeléctrico con un filtro a 650 *mμ* ajustando el 100% de transmisión con agua destilada.

CALCULOS:

Trazar una curva patrón, graficando el porcentaje de transmisión de los tubos con nicotinamida U.S.P. contra mcg/tubo de vitamina. Por interpolación se obtuvo el contenido vitamínico de las muestras.

METODOS DE CUANTIFICACION DE PANTOTENATO DE CALCIO

Los diferentes métodos que existen para la detección de ácido pantoténico o de su sal cálcica, se utilizan solamente para muestras relativamente puras (58).

Wollish y Schamll (74) describen un método que se basa en la formación de pantoil lactona y beta-alanina por hidrólisis ácida, la lactona reacciona en medio alcalino con hidroxilamina y el ácido hidroxámico formado, reacciona con cloruro férrico en medio ácido, dando un complejo írpura que presenta un máximo de absorción a 500 nm. Otro método utiliza a la beta-alanina formada en la hidrólisis, que reacciona con 1,2-naftoquinona 4 sulfonato de sodio o con 2,4-dinitrofenilhidrazina, determinando colorimétricamente la hidrazona formada. Szalkowski y David son (66), hacen reaccionar la lactona con 2,4-naftalendiol dando un complejo amarillo-verdoso estimable espectrofotométricamente a 465 nm.

Frost (22) mide la rotación óptica de la vitamina. Lingane y Davis (41) describen un método polarográfico para las vitaminas del complejo B y cuyo fundamento ya se describió anteriormente.

Se conocen también métodos biológicos (52, 58) que utilizan pollos y miden la prevención o cura de la dermatitis producida por falta de esta vitamina; otros usan ratas y miden el incremento en peso durante un período de cinco semanas.

El método microbiológico (10, 31, 58) utilizado para la cuantificación de la vitamina, emplea como microorganismo de prueba a Lactobacillus plantarum. Este microorganismo es el que se utilizó también en la cuantificación de nicotinamida, ya que requiere ambas vitaminas para crecer. Existen otros métodos microbiológicos que utilizan a Lactobacillus casei (64, 70), a Proteus morgani y al estreptococo hemolítico (32).

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETECCION DE PANTOTENATO DE CALCIO.

REACTIVOS:

1. - Solución patrón de pantotenato de calcio U.S.P. : Dissolver 100 mg. de d-pantotenato de calcio en 1000 ml. de alcohol etílico al 15% y guardar en el refrigerador. La solución es estable un año.
2. - Solución patrón de trabajo: Tomar una alícuota de 5 ml. de la solución anterior y diluir a 500 ml. con agua destilada; tomar de ésta, una alícuota de 5 ml. y aforarla a 250 ml. La solución final contiene 0.02 mcg/ml. del patrón U.S.P.
3. - Medio de ensayo BACTO-PANTOTENATO : Dissolver 7.3 g del medio basal en 100 ml. de agua destilada y llevar a ebullición durante dos a tres minutos, distribuir el precipitado residual por agitación y enfriar en agua corriente.

PROCEDIMIENTO:

De cada una de las muestras se tomó una alícuota, se diluyó a un determinado volúmen, y se filtraron.

En los tubos preparados para el análisis, también por duplicado, se colocaron alícuotas respectivas de los filtrados y del patrón de trabajo, igual que en el análisis de nicotinamida y se completaron con agua destilada a 5 ml. A cada uno de los tubos se les añadieron 5 ml. del medio de ensayo. Los tubos se cubrieron con una franela y se esterilizaron en el autoclave a 121° C durante 10 minutos, se enfriaron en corriente de agua y quedaron listos para la inoculación.

PREPARACION DEL INOCULO:

Con una jeringa estéril de 2.5 ml. se tomaron 1.2 ml. de la suspensión de Lactobacillus plantarum ATCC 8014 y se mezcló con 10 ml. del medio de ensayo para pantotenato de calcio. A cada tubo se le añadió una gota de inóculo con una pipeta volumétrica de 10 ml.

Los tubos inoculados se mezclaron muy bien, se cubrieron con una franela y se incubaron en baño de agua a 35-37° C durante 18 a 24 h.

La turbiedad producida por el microorganismo, se leyó en un colorímetro fotoeléctrico con filtro a 650 nm, ajustando el 100% de transmisión con agua destilada. Al igual que en el caso de nicotinamida, debe hacerse una curva patrón para cada ensayo.

CALCULOS:

Trazar una curva patrón, graficando el porcentaje de transmisión

de los tubos con pantotenato de calcio U.S.P. contra mcg/ tubo de vitamina. Por interpolación de la turbiedad, se obtuvo el contenido vitamínico de las muestras.

METODOS DE CUANTIFICACION DE PIRIDOXINA

Existen métodos generales que han sido empleados para los bioensayos de vitamina B₆ (58); uno está basado en la curación o prevención de la acrodinia en ratas, producida por una dieta deficiente de vitamina y otro, en el incremento de peso cuando se adicionan gradualmente dosis de vitamina B₆ en una dieta deficiente. Este último se ha llevado a cabo en ratas, gallinas y con la larva del arroz, Corcyra cephalonica st.

Existen probablemente, más métodos de análisis microbiológicos que de todos los otros tipos juntos. Estos métodos utilizan microorganismos que incluyen bacterias lácticas (48), levaduras (6, 7, 58) y una mutante de hongo (24).

Los métodos espectrofotométricos y polarográficos (30, 58) se utilizan con frecuencia cuando se trata de soluciones puras o que no contengan materiales interferentes.

La naturaleza fenólica de la Piridoxina ha sido aprovechada para la determinación química por medio de reacciones colorimétricas. Estos métodos fueron creados con la creencia de que la piridoxina era el único miembro activo del grupo B₆. Naturalmente, estos métodos se han revisado y en el caso del análisis de productos naturales, se tiene especial cuidado en la interpretación de los resultados.

Dichos métodos colorimétricos (33, 42, 58) se basan en reacciones de copulación entre el grupo fenólico de la piridoxina y cloruro férrico, ácido sulfanílico, p-aminoacetofenona, p-nitroanilina y 2,6 dicloroquinona - clorimida entre otros.

El método basado en el uso de 2,6 dicloroquinonaclorimida fué usado primeramente por Scudi (57) y más tarde fué modificado por Hochberg y colaboradores (32). Ellos idearon un método, el cual se basa en la copulación de la vitamina con tal reactivo, en una solución fuertemente amortiguada, (65) dando como resultado un color azul, el cual se estima fotométricamente.

METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA DETECCION DE PIRIDOXINA. "

REACTIVOS:

1. - Isopropanol: grado reactivo.
2. - Amortiguador de cloruro de amonio amoniacal : Disolver 16 g de cloruro de amonio en 70 ml. de agua, añadir 16 ml. de hidróxido de amonio, diluir con agua a 100 ml. y mezclar, Filtrar si es necesario.
3. - Amortiguador de acetato de sodio: Disolver 20 g de acetato de sodio en agua y aforar a 100 ml.
4. - Solución de clorimida: Disolver 40 mg. de 2,6 dicloroquinonaclorimida en 100 ml. de isopropanol. Se prepara recientemente y no debe usarse si presenta color rosado. Debe refrigerarse.
5. - Solución de ácido bórico: Disolver 5 g de ácido bórico en 90 ml.

de agua caliente, enfriar, diluir a 100 ml. y mezclar.

6. - Solución patrón de piridoxina U.S.P. : Pesar 25 mg. de clorhidrato de piridoxina U.S.P. previamente secado sobre gel de sílice durante cuatro horas y disolverlos en ácido clorhídrico 0.1 N. Aforar a 250 ml. con el mismo ácido y guardar en el refrigerador. Diluir exactamente 10 ml. de esta solución a 100 ml. con agua destilada. Esta solución se prepara en el momento.

7. - Hidróxido de sodio 1 N.

PROCEDIMIENTO:

Teniendo todas las muestras descongeladas y homogeneizadas, se tomaron alícuotas de 15 ml. de cada una, se les añadieron 35 ml. de ácido clorhídrico al 1% y se pusieron en el autoclave a 121°C durante 30 minutos. Al término de este tiempo se filtraron en caliente a través de papel filtro, se dejaron enfriar para llevarlas a un volumen de 50 ml., con ácido clorhídrico al 1% y, de estas soluciones, se transfirieron 10 ml. a tubos de centrifuga de 50 ml. de capacidad. Se añadieron 25 ml. de alcohol isopropílico, se agitaron durante varios minutos y se centrifugaron.

A partir de este momento, se trabajó lo más rápidamente posible para evitar la destrucción de la vitamina por la luz.

De cada una de las muestras tratadas, se transfirieron 5 ml. del sobrenadante a tres probetas graduadas de 25 ml. con tapón esmerilado, que se marcaron como A, B. y C. A todas las probetas se les añadió 1 ml. del amortiguador de cloruro de amonio amoniacal y 1 ml. del amortiguador de acetato de sodio. A las probetas marcadas como A se les añadió 1 ml. de agua destilada, a las marcadas como B, 1 ml. de ácido bórico y a las marcadas co-

mo C, un patrón interno de 10 mcg de piridoxina.

Usando el espectrofotómetro Beckman B y habiendo ajustado el 100% de transmitancia a 650 nm con blanco de agua, se añadió exactamente 1 ml. de la solución de clorimida a las probetas marcadas como A y C, se agitaron vigorosamente, se transfirieron a una celda del espectrofotómetro y se leyeron exactamente a los 60 segundos. Se añadió también exactamente 1 ml. de la solución de clorimida a las probetas marcadas como B, se mezclaron vigorosamente y exactamente 5 minutos después de la adición de la solución de clorimida se leyeron las transmitancias.

CALCULOS:

Restar a cada problema (A) la lectura del blanco (B) y obtener el incremento por 10 gammas de piridoxina, restando el valor obtenido en el problema (A) al valor del problema que contiene patrón interno (C) :

$$\frac{A}{B} \times Z F = \text{mcg de piridoxina /ml. de muestra.}$$

donde:

A = Densidad óptica del problema menos la del blanco.

B = Densidad óptica de 10 mcg. de piridoxina.

Z = Concentración del patrón 10 mcg.

F = Factor de dilución.

METODOS DE CUANTIFICACION DE CIANOCOBALAMINA

Los métodos de análisis disponibles, pueden agruparse en tres: biológicos, microbiológicos y fisicoquímicos. (6, 30, 36, 58, 62).

Los métodos biológicos son lentos y difíciles de realizar, ya que utilizan ratas recién nacidas y destetadas y pollos, donde la respuesta directa del crecimiento se usa para medir la vitamina (52, 58).

Entre los métodos microbiológicos que pueden ser empleados para la determinación de la vitamina B₁₂ (6, 14, 15, 36, 59, 62) están las pruebas con: Ochromonas melhamesis, Euglena gracilis, Lactobacillus leichmanii, Escherichia coli y la diatomea Cyclotella nana.

Existen considerables diferencias entre la especificidad y la duración de estos métodos: al primero le afecta la presencia de grandes cantidades de metionina, la cual puede estimular la actividad de la vitamina B₁₂ en este organismo y su tiempo de incubación es de cuatro días; por otra parte, la prueba con Euglena gracilis requiere un tiempo de incubación de 4-7 días, la prueba con Lactobacillus leichmanii responde adicionalmente a desoxirribósidos, aunque su tiempo de incubación sea de 18 a 24 h. al igual que E. coli. En el último caso, la diatomea responde a ciano y a hidroxocobalamina y es relativamente insensible a análogos clínicamente inactivos de la vitamina y los resultados se obtienen después de cuatro días. Puesto que pequeñas cantidades de desoxirribósidos pueden interferir, destruyendo la suficiente vitamina B₁₂ como para invalidar el análisis, esta interferencia se puede eliminar diluyendo el ribósido a menos de 1 mcg/ml. de solución de análisis. También se pueden eliminar las sustancias interferentes extrayendo y purificando antes de analizar, utilizando un análisis diferencial para medir las o distinguirlas por medio de técnicas que utilizan dos tipos de

microorganismos.

Los primeros métodos para analizar químicamente la vitamina B₁₂ se basaron en la degradación química y física, seguida de la determinación de uno o más productos de la reacción. Posteriormente, se han usado: la absorción infrarroja para diferenciar las distintas cobalaminas, métodos espectrofluorométricos y espectrofotométricos, aprovechando la diferencia de absorciones entre la cianocobalamina y su complejo dicianuro. Como se ha encontrado que los pigmentos seudo B₁₂ también forman el complejo de dicianuro produciendo interferencia, se demostró que el uso de resinas de intercambio iónico eliminaban dichas interferencias. Así, se ideó un método basado en medir el color del dicianuro formado después de pasar las muestras a través de una columna de resinas.

En los últimos años se ha demostrado que el método de la dilución isotópica utilizando cobalto radioactivo, es el único método químico que tiene aplicación general para la determinación de cianocobalamina, por lo que fué reconocido oficialmente como análisis patrón de cobalamina. (6).

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETECCION DE CIANOCOBALAMINA

Se empleó como microorganismo prueba a *Lactobacillus leichmanii* (313) ATCC 7830 cuyo crecimiento depende en gran parte, de la cantidad de cianocobalamina presente en la muestra (15, 59).

La cantidad de vitamina presente en una muestra puede obtenerse trazando una curva patrón de concentración contra turbiedad, usando canti

dades conocidas de cianocobalamina U.S.P.

REACTIVOS:

1. - Solución de metabisulfito de sodio : 12.9 g de fosfato disódico, 1.1 g de ácido cítrico anhidro y 1.0 g de metabisulfito de sodio, se mezclan y diluyen a 100 ml. con agua.

2. - Medio de cultivo para ensayo; Difco No. 0457.

3. - Solución patrón de cianocobalamina U.S.P.; Pesar la cantidad necesaria de un patrón de referencia U.S.P. previamente secado sobre gel de sílice durante cuatro horas y diluir con suficiente alcohol etílico al 25% para hacer una solución que contenga 1 mcg/ml. Dura varios meses en refrigeración y al abrigo de la luz.

4. - Solución patrón de trabajo : Tomar 1 ml. de la solución anterior y agregar 50 ml. de solución de metabisulfito de sodio. Calentar al autoclave por diez minutos, dejar enfriar y aforar a 200 ml. con agua. Hacer la dilución apropiada para tener una concentración final de 0.00002 mcg/ml.

PROCEDIMIENTO:

Se trabajó con diferentes factores de dilución de las muestras, desde 10 hasta 10,000. En cada caso se hizo una extracción con solución de metabisulfito de sodio calentando al autoclave durante 10 minutos a 121° C. La concentración final de metabisulfito de sodio no debe exceder de 0.3 mg/ml. , debido a la inhibición del crecimiento que produce (59,67).

Habiendo ya tenido las muestras extraídas, se filtraron y se colocaron por triplicado 1.0, 1.5 y 2.0 ml. de cada una, en tubos de 20 X 150 mm.

meticulosamente lavados. Se les añadió suficiente cantidad de agua para tener un volumen de 5.0 ml. y enseguida 5 ml. del medio de cultivo de ensayo para hacer un volumen final de 10 ml.

De la misma manera se preparó la curva patrón añadiendo 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 y 5.0 ml. de la solución patrón de trabajo incluyendo dos tubos con 15 ml. de medio, exclusivamente para la preparación del inóculo.

Todos los tubos se cubrieron con una franela y se esterizaron en el autoclave durante 5 minutos a 121° C. Se enfriaron en agua corriente y se procedió a la inoculación.

PREPARACION DEL INOCULO:

La suspensión de Lactobacillus leichamanii venía en pequeñas ampollitas congeladas en nitrógeno líquido. Cada ampollita contenía 3.8×10^8 células/ml. y una vez descongeladas, se diluía 1 ml. de dicha suspensión con 15 ml. de medio de cultivo para el ensayo estéril. La inoculación se efectuó colocando una gota del inóculo preparado con una pipeta volumétrica de 10 ml.

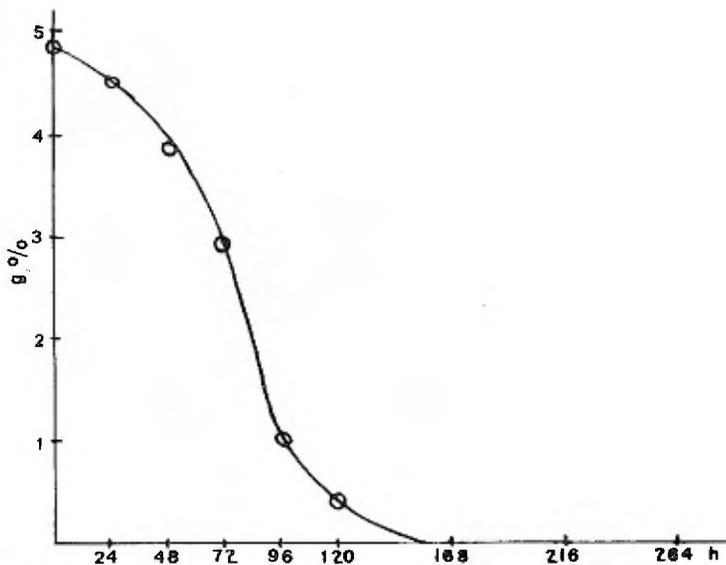
Una vez inoculados los tubos, se cubrieron con franela y se incubaron a 34 - 36° C durante 18 - 24 h. en baño de agua. Después del período de incubación se determinó el porcentaje de transmisión de los tubos, mezclando perfectamente el contenido de cada uno durante 30 segundos y leyendo el % de transmitancia exactamente 60 segundos después en un colorímetro fotoeléctrico con filtro a 650nm, habiendo ajustado el 100% con agua destilada.

CALCULOS:

Se trazó una curva patrón graficando el porcentaje de transmitancia contra los microgramos de vitamina por tubo. Por interpolación se obtuvo el contenido de vitamina.

Muestra de Cultivo. Horas de incubación.	AZUCARES REDUCTORES g %
24	4.56
48	3.80
72	2.95
96	1.03
120	0.38
168	--
216	--
264	--
Medio de incubación. (Sin inóculo).	4.80

TABLA No. 1. - Concentración de azúcares reductores en el cultivo de Pleurotus ostreatus.



GRAFICA No. 1.- Consumo de azúcares reductores, conforme al tiempo de incubación, en el cultivo sumergido de Pleurotus ostreatus.

Muestra de cultivo. Horas de incubación.	Fluorescencia.	TIAMINA. mcg/ml
24	16	0.5165
48	8.75	0.4480
72	12	0.6040
96	13	0.6535
120	13.75	0.6915
168	15.2	0.7635
216	10	0.5035
264	4	0.4020
Patrón Tiamina 0.1 mcg/ml	69	
Medio de Incubación (sin inóculo)	18.5	0.5585

TABLA No. 2.- Concentración de tiamina obtenida en el cultivo de Pleurotus ostreatus.

Todos los resultados son el promedio de dos determinaciones.

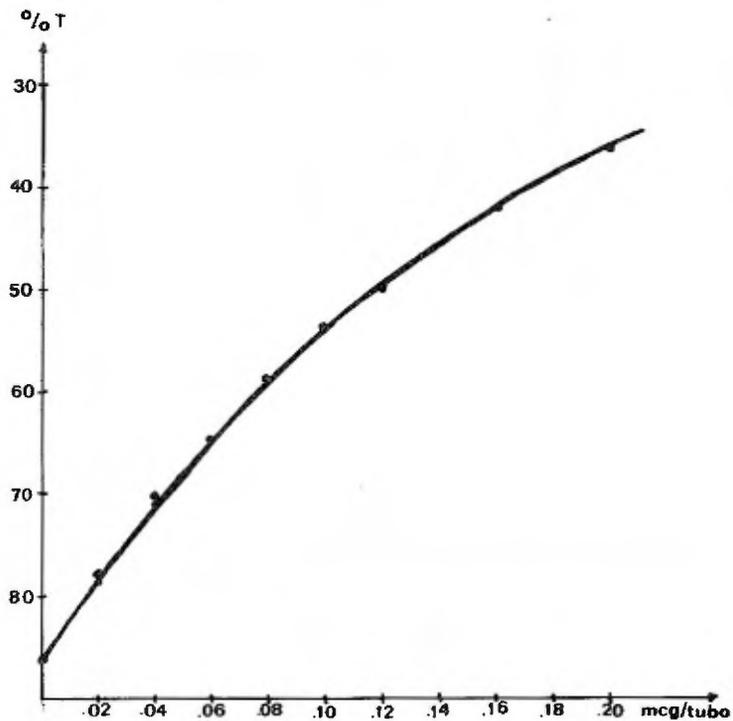
Muestra de cultivo. Horas de incubación.	Fluorescencia.	RIBOFLAVINA mcg/ml
24	14.75	1.97
48	11.5	1.92
72	14	2.33
96	15	2.49
120	14.25	2.87
168	20	3.33
216	12	1.91
264	4.75	0.83
Patrón Riboflavina 0.1 mcg/ml	40	
Medio de Incubación (sin inóculo)	26	2.60

TABLA No. 3.- Concentración de riboflavina - obtenida en el cultivo de P. ostreatus.

Todos los resultados son el promedio de dos - determinaciones.

TABLA No. 4

0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solu - ción patrón.
86.0	78.0	70.5	64.5	59.0	53.5	50.0	41.5	36.0	TURBIEDAD: % T
86.0	77.5	70.0	65.0	58.5	53.5	49.0	42.0	36.0	
0.0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.16	0.20	mcg/Tubo



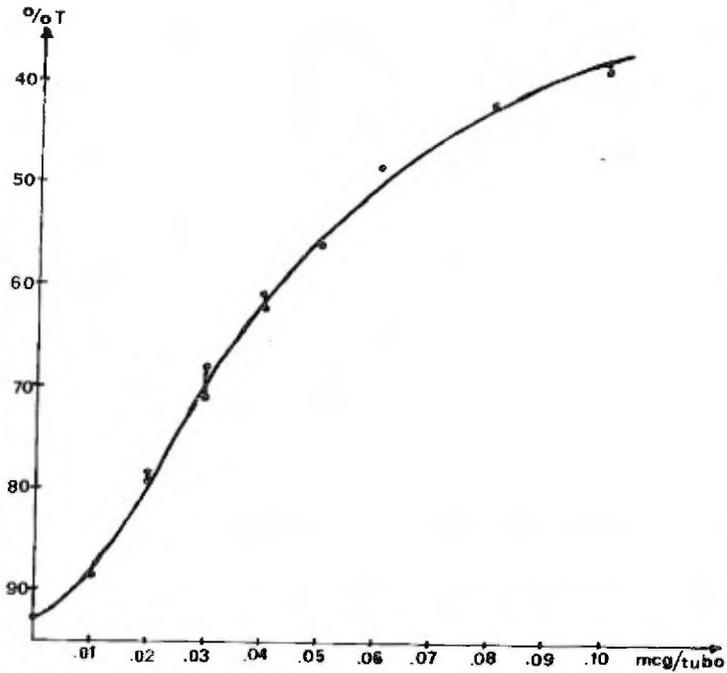
Curva patrón de nicotinamida

Muestra de cultivo. Horas de incubación.	ml. de solución problema.	TURBIEDAD 650 nm	NICOTINAMIDA mcg / ml
24	1.0	75.0 75.0	1.83
	1.5	71.0 70.5	
	2.0	66.0 66.0	
48	1.0	69.0 69.5	3.61
	1.5	63.0 63.0	
	2.0	57.5 58.0	
72	1.0	64.0 63.5	5.14
	1.5	56.5 56.5	
	2.0	47.5 48.5	
96	1.0	63.5 64.0	5.17
	1.5	56.5 56.0	
	2.0	47.5 47.5	
120	1.0	58.0 58.0	6.91
	1.5	48.0 48.5	
	2.0	40.5 41.0	
168	1.0	55.5 56.5	7.66
	1.5	46.5 45.0	
	2.0	37.5 37.5	
216	1.0	60.5 59.0	6.34
	1.5	50.5 51.5	
	2.0	42.0 43.5	
264	1.0	66.0 66.5	4.45
	1.5	58.5 59.0	
	2.0	52.0 52.5	
Medio de incubación (Sin inóculo)	1.0	70.0 71.0	2.04
	1.5	64.0 63.5	
	2.0	58.0 58.0	

TABLA No. 5. - Concentración de nicotinamida obtenida en el cultivo de Pleurotus ostreatus.

TABLA No. 6

0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solu - ción patrón.
92.5	88.5	78.5	68.0	62.0	56.0	48.5	42.0	38.5	TURBIEDAD: % T
93.5	88.5	79.0	71.0	61.0	56.0	48.0	42.0	37.5	
0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10	mcg/Tubo



Curva patrón de pantotenato de calcio

Muestra de cultivo. Horas de incubación.	ml. de solución problema.	TURBIEDAD 650 nm	PANTOTENATO DE CALCIO mcg/ml.
24		73.5	1.61
	1.0	74.5	
	1.5	63.5	
	2.0	56.5	
48		84.0	3.64
	1.0	84.0	
	1.5	71.5	
	2.0	62.5	
72		71.0	6.27
	1.0	71.0	
	1.5	58.5	
	2.0	48.5	
96		65.0	7.08
	1.0	65.5	
	1.5	54.0	
	2.0	47.5	
120		57.0	9.29
	1.0	58.5	
	1.5	46.0	
	2.0	40.5	
168		47.0	12.91
	1.0	46.5	
	1.5	39.5	
	2.0	35.5	
216		60.0	8.48
	1.0	61.0	
	1.5	49.0	
	2.0	42.0	
264		75.0	4.91
	1.0	76.5	
	1.5	63.5	
	2.0	57.0	
Medio de incubación. (Sin inóculo)		77.0	1.33
	1.0	77.5	
	1.5	70.5	
	2.0	64.0	

TABLA No. 7.- Concentración de pantotenato de calcio obtenida en el cultivo de Pleurotus ostreatus.

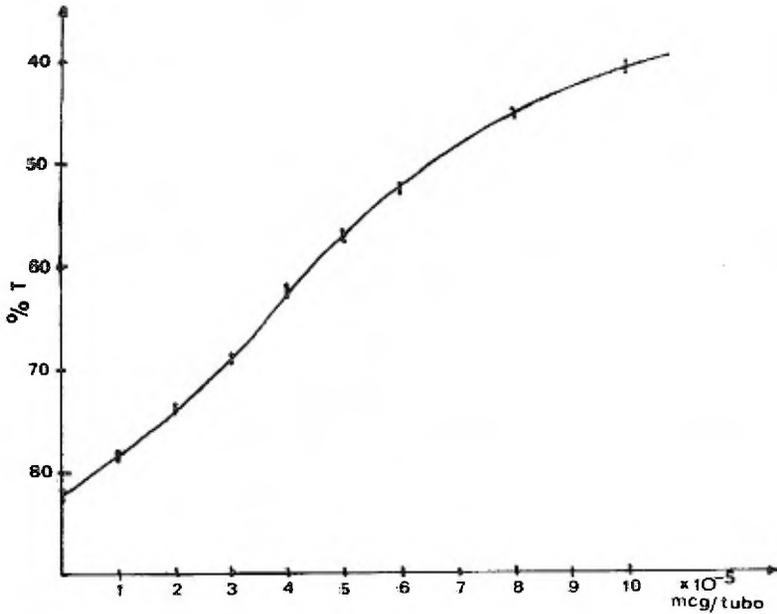
Muestra de cultivo. Hrs. de incubación.	Absorbancia 650 nm.	Absorbancia 650 nm. enmascarando piridoxina	contribución de piridoxina	contribución del patrón interno	PIRIDOXINA mcg/ml
24	0.165	0.134	0.031		
24 + S	0.417	0.134	0.283	0.252	5.425
48	0.191	0.149	0.042		
48 + S	0.441	0.149	0.292	0.250	9.15
72	0.198	0.146	0.052		
72 + S	0.450	0.146	0.304	0.252	11.45
96	0.147	0.089	0.058		
96 + S	0.396	0.089	0.307	0.249	12.95
120	0.201	0.117	0.084		
120 + S	0.450	0.117	0.333	0.249	18.85
168	0.189	0.101	0.088		
168 + S	0.437	0.101	0.336	0.248	19.65
216	0.118	0.081	0.037		
216 + S	0.367	0.081	0.286	0.249	8.275
264	0.081	0.066	0.015		
264 + S	0.328	0.066	0.262	0.247	3.37
Patrón piridoxina. 10 mcg/ml	0.272	0.021	0.251		
Medio de Incubación (sin inóculo)	0.437	0.369	0.068		
Medio de Incubación (sin inóculo) + S	0.682	0.369	0.313	0.247	9.1

TABLA No. 8.- Concentración de piridoxina obtenida en el cultivo de P. ostreatus.

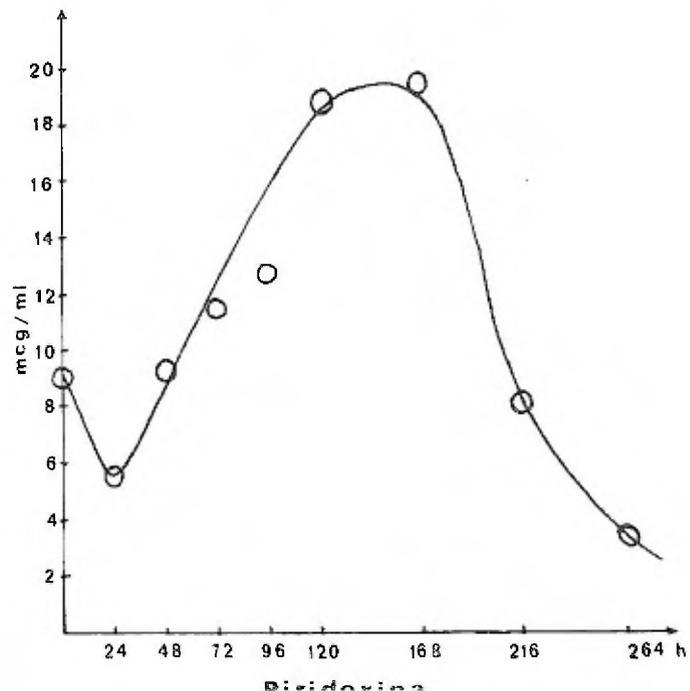
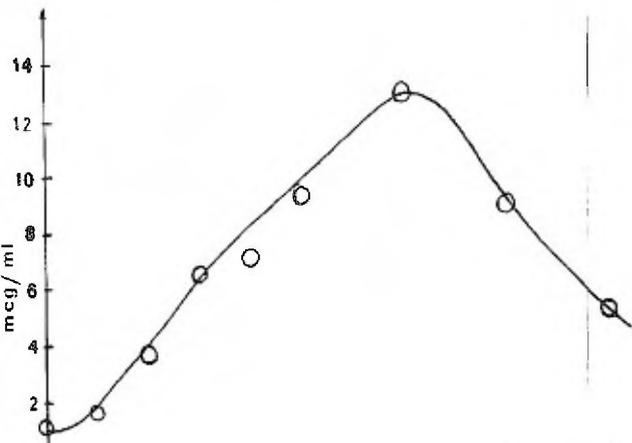
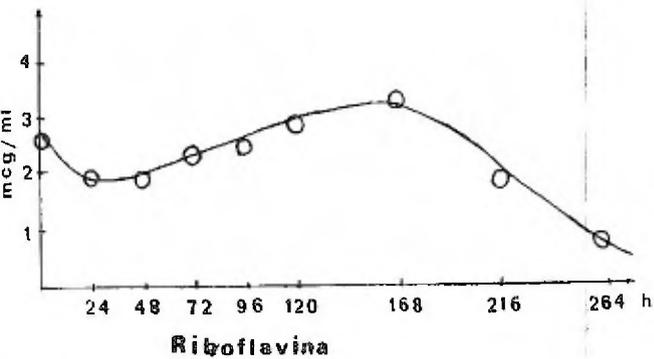
Todos los resultados son el promedio de dos determinaciones. En la primera columna la letra S indica la adición de un patrón interno de 10 mcg/ml. de piridoxina. La concentración de piridoxina se calculó en cada caso en base al valor de la contribución del patrón interno.

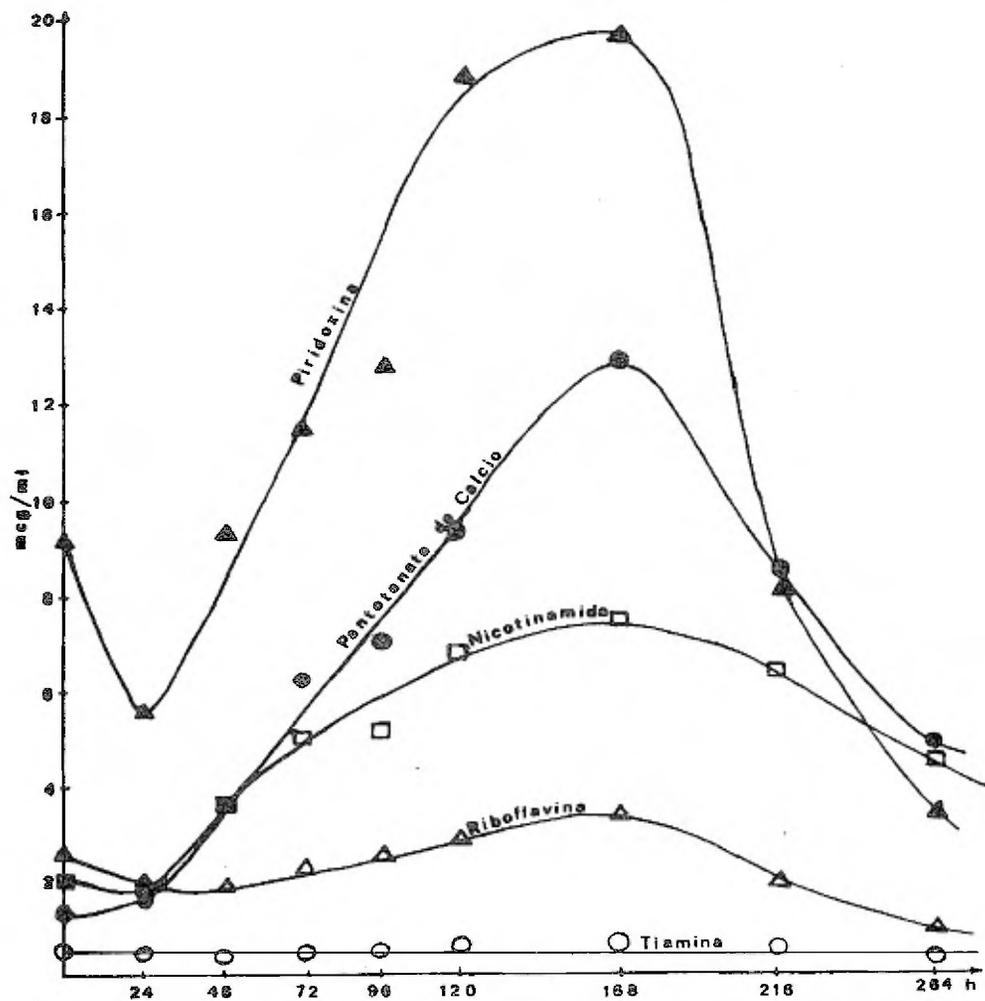
TABLA No. 9

0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solución patrón.
82.5	78.5	74.5	68.5	62.0	57.5	52.0	45.5	40.0	TURBIEDAD: % T
81.5	78.0	73.0	69.5	62.0	57.5	53.0	44.5	40.0	
82.0	78.5	73.0	69.5	63.0	56.5	52.0	45.0	41.5	mcg/tubo X 10 ⁻⁵
0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0	



CURVA PATRON DE CIANOCOBALAMINA

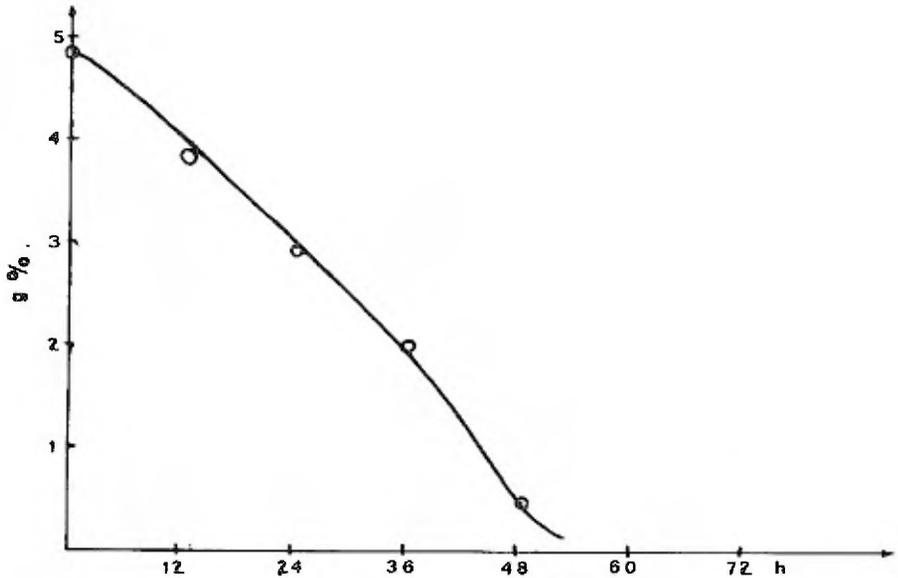




GRAFICA No. 3 - Cambios en la concentración de vitaminas en el cultivo sumergido de Pleurotus ostreatus

Muestra de cultivo. Horas de incubación.	AZUCARES REDUCTORES g %
12	3.82
24	2.93
36	2.03
48	0.50
60	---
72	...
Medio de incubación. (Sin inóculo)	4.58

TABLA No. 10.- Concentración de azúcares reductores en el cultivo de Tricholoma nudum.



GRAFICA No. 4.- Consumo de azúcares reductores, conforme al tiempo de incubación, en el cultivo - sumergido de Tricholoma nudum.

Muestra de cultivo. Horas de incubación.	Fluorescencia	TIAMINA. mcg/ml
12	13	0.77
24	12.5	0.74
36	13	0.77
48	13.5	0.81
60	13.5	0.81
72	14.5	0.86
Patrón Tiamina 1 mcg/ml	70	
Medio de Incubación (sin inóculo)	11	0.65

TABLA No. 11.- Concentración de Tiamina obtenida en el cultivo de Tricholoma nudum.

NOTA: Todos los resultados son el promedio de seis determinaciones efectuadas en dos lotes iguales.

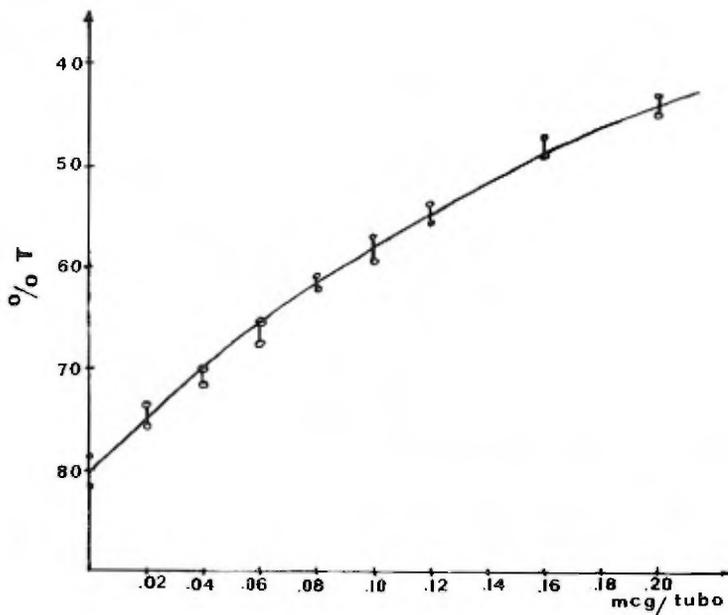
Muestra de cultivo. Horas de incubación.	Fluorescencia	RIBOFLAVINA mcg/ml
12	20.4	2.04
24	21.9	2.19
36	25.4	2.54
48	28.9	2.89
60	30.8	3.08
72	32	3.2
Patrón Riboflavina 0.1 mcg/ml	40	
Medio de Incubación (sin inóculo)	19	1.9

TABLA No. 12.- Concentración de riboflavina - obtenida en el cultivo de Tricholoma nudum.

NOTA: todos los resultados son el promedio de seis determinaciones efectuadas en dos lotes iguales.

TABLA No. 13

0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solución - patrón
78.5	75.5	70.0	65.5	62.0	57.0	55.5	48.5	45.0	
81.5	73.5	71.5	67.5	61.0	59.5	54.0	47.0	43.0	TURBIEDAD : % T
0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.16	0.20	mcg/tubo



Curva patrón de nicotinamida

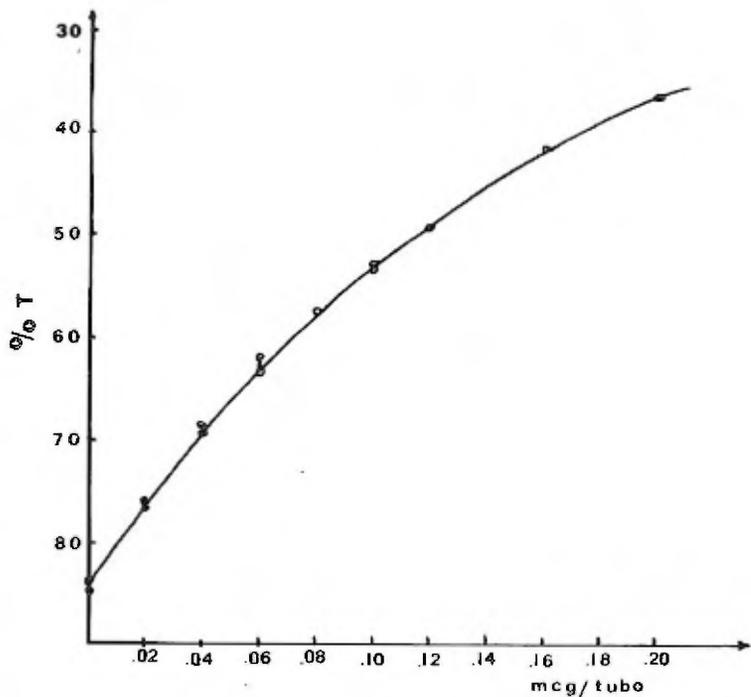
Muestra de cultivo. Horas de incubación.	ml. de solución problema.	TURBIEDAD 650 nm	NICOTINAMIDA mcg/ml	
12	1.0	66.0	3.04	
		65.0		
	1.5	62.0		
24	1.5	60.5		2.59
		53.0		
	2.0	52.5		
36	1.0	66.5	2.99	
		68.0		
	1.5	62.0		
	2.0	61.5		
57.0				
48	1.0	57.0		3.81
		66.0		
	1.5	66.0		
	2.0	59.5		
60.5				
60	1.5	54.0	4.85	
		53.5		
	2.0	62.0		
	1.0	62.0		
56.5				
72	1.5	55.5		4.21
		53.5		
	2.0	47.0		
	1.0	47.0		
66.0				
Medio de incubación. (Sin inóculo).	1.5	68.0	2.75	
		62.0		
	2.0	61.0		
	1.0	56.5		
55.5				

TABLA No. 14. - Concentración de nicotinamida obtenida en el cultivo de - Tricholoma nudum.

NOTA: Todos los resultados son el promedio de dos determinaciones.

TABLA No. 15

0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solución patrón
84.5	76.0	68.5	62.0	57.5	53.0	49.5	41.5	36.5	TURBIEDAD: % T
84.0	76.5	69.5	63.5	57.5	53.5	49.5	41.5	36.5	
0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.16	0.16	0.20	mcg/ tubo



Curva patrón de nicotinamida

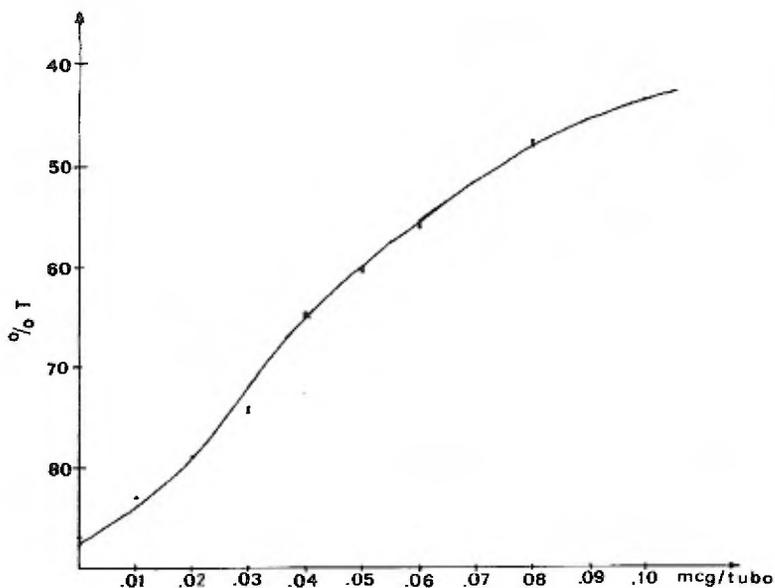
Muestra de cultivo. Horas de incubación.	ml. de solución problema.	TURBIEDAD 650 nm	NICOTINAMIDA mcg/ml
12		63.5	3.03
	1.0	62.5	
		55.0	
	1.5	55.0	
		48.5	
24		48.0	2.94
	1.0	63.0	
		56.0	
	1.5	56.0	
		49.0	
36		49.5	3.28
	1.0	61.5	
		61.5	
	1.5	53.5	
		53.5	
48		46.0	4.12
	1.0	64.0	
		64.5	
	1.5	57.0	
		57.0	
60		50.0	4.59
	1.0	63.5	
		62.0	
	1.5	54.0	
		54.5	
72		48.5	4.26
	1.0	48.5	
		63.5	
	1.5	63.5	
		56.5	
Medio de incubación. (Sin inóculo).		56.5	2.80
	1.0	64.0	
		64.5	
	1.5	57.0	
		50.5	
		50.5	

TABLA No. 16. - Concentración de nicotinamida obtenida en el cultivo de Tricholoma nudum.

NOTA: Todos los resultados son el promedio de dos determinaciones.

TABLA No. 17

0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solución patrón
87.5	83.0	79.0	74.0	64.5	60.5	56.3	47.5	43.5	
87.0	83.0	79.0	74.5	65.0	60.0	55.5	48.0	43.5	TURBIEDAD: % T
0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10	mcg/tubo



Curva patrón de pantotenato de calcio

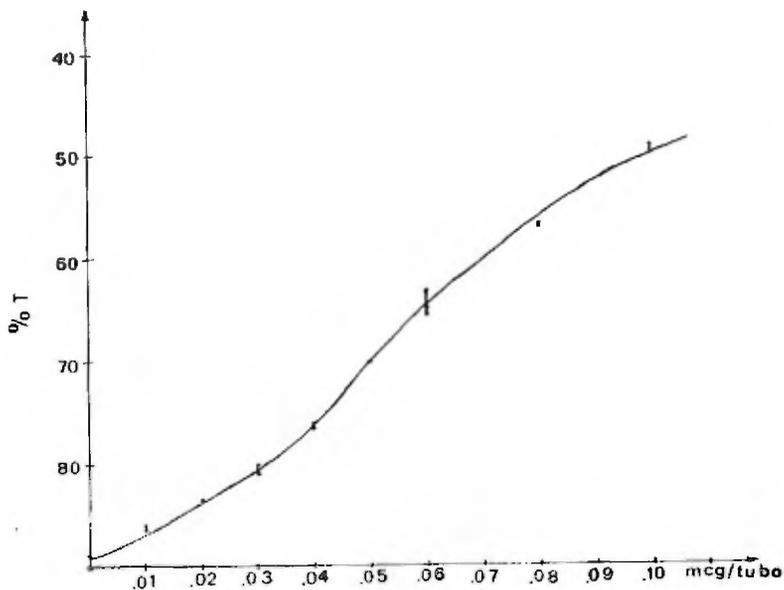
Muestra de cultivo, Horas de incubación.	ml. de solución problema .	TURBIEDAD 650 nm	PANTOTENATO DE CALCIO mcg/ml
12	1.0	66.0 66.5	1.95
	1.5	56.0 56.5	
	2.0	47.5 47.5	
		64.0	
24	1.0	65.0 54.5	2.13
	1.5	54.5 45.0	
	2.0	45.0 74.5	
		75.0	
36	1.0	64.0 64.0	3.38
	1.5	58.5 58.0	
	2.0	81.5 81.0	
		77.5	
48	1.0	77.0 77.0	3.85
	1.5	72.0 72.0	
	2.0	77.5 77.0	
		69.5	
60	1.0	69.5 69.5	5.67
	1.5	62.0 61.5	
	2.0	73.0 72.5	
		62.5	
72	1.0	61.5 57.0	7.37
	1.5	56.5 79.5	
	2.0	79.0 71.0	
		71.5	
Medio de incuba - ción, (Sin inóculo).	1.0	65.5 66.0	2.00
	1.5		
	2.0		

TABLA No. 18. - Concentración de pantotenato de calcio obtenida en el cultivo de Tricholoma nudum.

NOTA: Todos los resultados son el promedio de dos determinaciones.

TABLA No. 19

0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solución patrón
90.0	86.0	83.5	81.0	76.5	70.0	63.0	56.5	49.0	
89.0	86.5	83.5	80.0	76.0	70.0	65.5	57.0	50.0	TURBIEDAD: % T
0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10	mcg/tubo



Curva patrón de pantotenato de calcio

Muestra de cultivo Horas de incubación	ml. de solución. problema.	TURBIE DAD 650 nm	PANTOTENATO DE CALCIO mcg/ml
12	1.0	77.0	1.85
		77.0	
	1.5	67.5	
		68.0	
2.0	58.0		
	58.0		
24	1.0	77.0	1.83
		78.0	
	1.5	68.0	
		67.5	
2.0	58.0		
	58.0		
36	1.0	82.0	3.07
		82.5	
	1.5	78.0	
		77.5	
2.0	71.0		
	70.5		
48	1.0	86.0	3.14
		86.0	
	1.5	84.0	
		84.0	
2.0	81.0		
	81.0		
60	1.0	82.5	5.81
		83.0	
	1.5	78.5	
		78.0	
2.0	73.0		
	72.5		
72	1.0	80.0	7.40
		80.5	
	1.5	73.0	
		73.0	
2.0	66.5		
	66.0		
Medio de incuba - ción. (Sin inóculo).	1.0	78.0	1.80
		77.0	
	1.5	67.0	
		68.0	
2.0	60.0		
	59.5		

TABLA No. 20. - Concentración de pantotenato de calcio obtenida en el cultivo de Tricholoma nudum.

NOTA: Todos los resultados son el promedio de dos determinaciones.

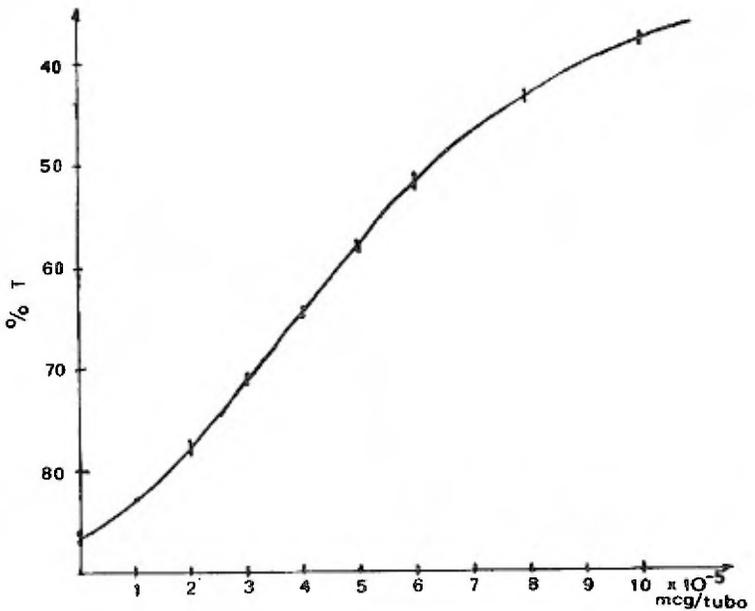
Muestra de cultivo. Hrs. de incubación.	Absorbancia 650 nm.	Absorbancia 650 nm. enmascarando piridoxina	contribución de piridoxina	contribución del patrón interno	PIRIDOXINA mcg/ml
12	0.155	0.139	0.016		
12 + S	0.369	0.139	0.230	0.214	7.71
24	0.169	0.138	0.031		
24 + S	0.385	0.138	0.247	0.216	14.57
36	0.157	0.133	0.024		
36 + S	0.370	0.133	0.237	0.213	11.10
48	0.120	0.109	0.011		
48 + S	0.335	0.109	0.226	0.215	5.43
60	0.109	0.103	0.006		
60 + S	0.321	0.103	0.218	0.212	2.82
72	0.099	0.099	0.000		
72 + S	0.317	0.099	0.218	0.218	----
Patrón piridoxina. 10 mcg/ml	0.239	0.021	0.218	0.218	
Medio de Incubación (sin inóculo)	0.132	0.114	0.018		
Medio de Incubación (sin inóculo) + S	0.347	0.114	0.233	0.215	8.32

TABLA No. 21.- Concentración de piridoxina obtenida del cultivo de T. nudum.

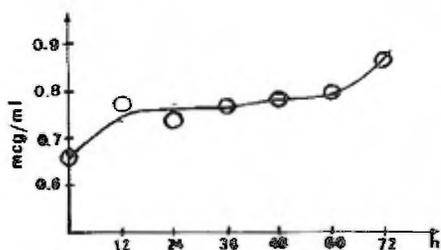
Todos los resultados son el promedio de seis determinaciones efectuadas en dos lotes iguales. En la primera columna la letra S indica la adición de un patrón interno de 10 mcg/ml de piridoxina. La concentración de piridoxina se calculó en cada caso en base al valor de la contribución del patrón interno.

TABLA No. 22

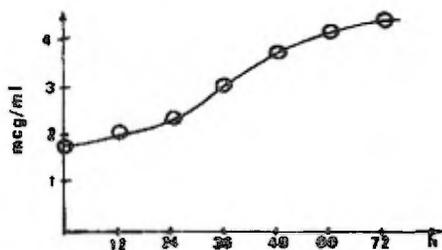
0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	ml. de solución patrón
86.0	83.0	77.5	70.0	65.0	58.5	51.0	44.0	37.5	
86.0	83.0	78.5	71.5	64.0	57.5	51.0	43.0	37.5	TURBIEDAD :% T
87.0	83.0	78.5	71.0	65.0	57.5	52.5	44.0	38.5	
0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0	mcg/tubo X 10 ⁻⁵



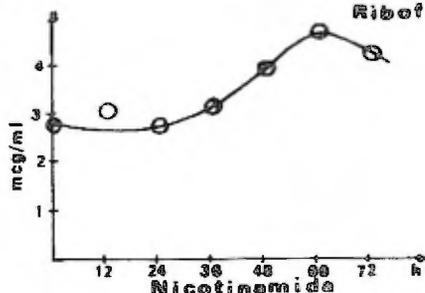
CURVA PATRÓN DE CIANOCOBALAMINA



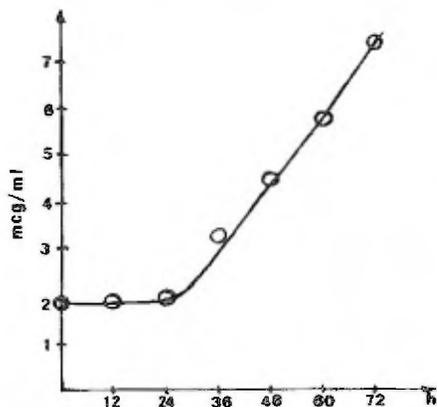
Tiamina



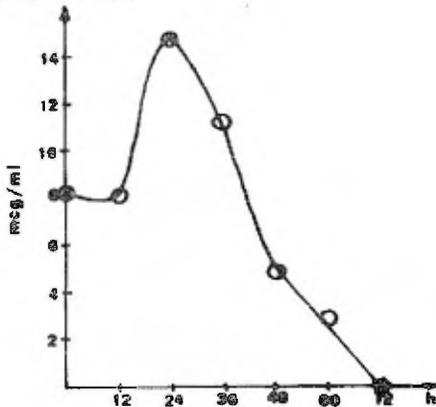
Riboflavina



Nicotinamida

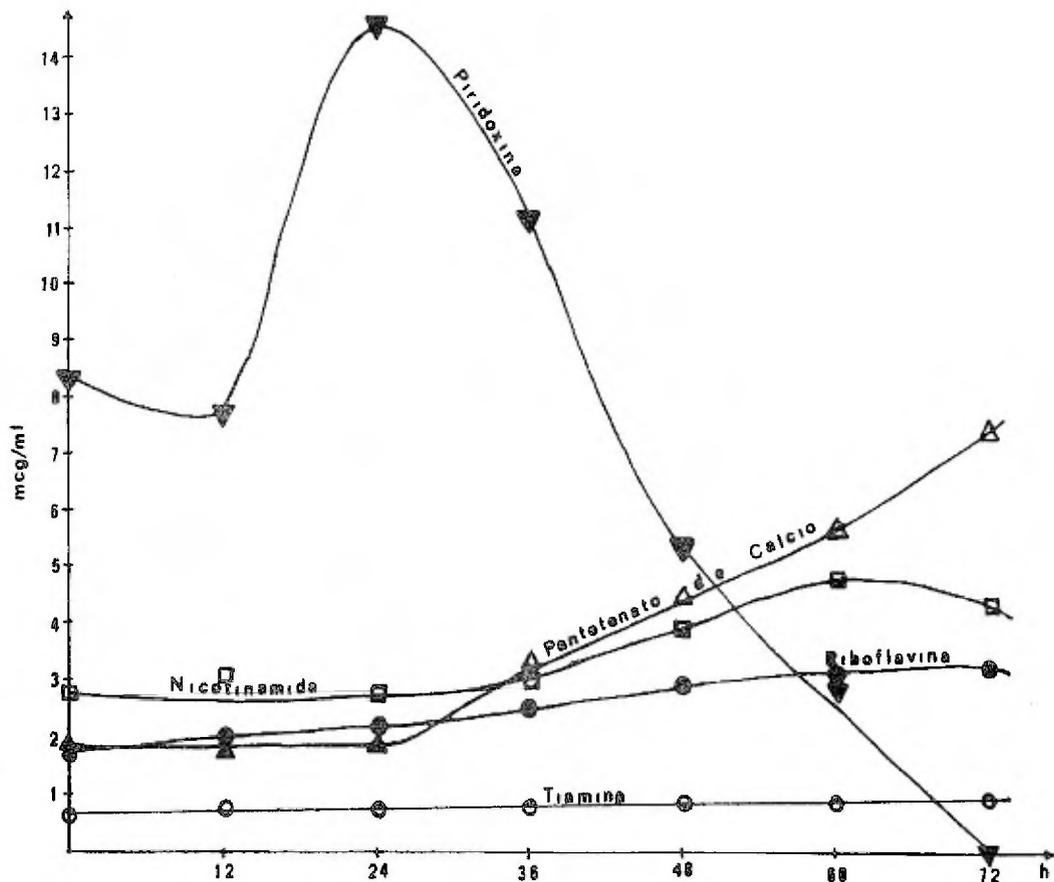


Pantotenato de Calcio



Piridoxina

GRAFICA No. 5.- Concentración de las distintas vitaminas, con respecto al tiempo de incubación, en el cultivo sumergido de Tricholoma nudum.



GRAFICA No. 8.- Cambios en la concentración de vitaminas en el cultivo sumergido de Tricholema sudum

DISCUSION

La importancia de métodos de análisis rápidos y precisos para la determinación de vitaminas no necesita ser enfatizado, por lo que en este trabajo se escogieron aquellos que cumplieran con dichos requisitos y que, además, forman parte de técnicas rutinarias utilizadas con este fin. Por comodidad se ha escogido discutir primero, los métodos fisicoquímicos y segundo, los microbiológicos usados en el análisis de las vitaminas estudiadas.

Los métodos fluorométricos que usamos para la determinación de tiamina y riboflavina son procesos sumamente sensibles y específicos (11, 13, 15, 21, 43). Debido a que la presencia de tiamina en materiales biológicos ocurre con frecuencia en forma de pirofosfato de tiamina -cocarboxilasa- (39, 21) y éste, al ser oxidado a pirofosfato de tiocromo, no puede ser extraído con isobutanol, hemos debido efectuar una hidrólisis enzimática previa a la extracción y detección de la vitamina (11, 20).

Es importante hacer notar que la presencia de materiales interferentes de las muestras obtenidas fueron eliminados al adsorber la vitamina en una resina activada (21), de la cual fue posteriormente eluída y oxidada. Las concentraciones de hidróxido de sodio y ferricianuro de potasio que se utilizaron, dan una oxidación máxima de la tiamina a tiocromo y la cantidad de isobutanol usada fue suficiente para extraerlo (11).

En el caso de riboflavina, como ésta se encuentra en forma de grupo prostético de las flavoproteínas, fué necesario realizar una hidrólisis - ácida que permitiera su liberación y determinación (58).

Debido a que la riboflavina se estable al calor en soluciones neutras o ácidas, es necesario el uso de acetato de sodio 2N pH 4.5 para mantener - dichas condiciones durante el calentamiento y la oxidación con permanganato de potasio de la riboflavina a su forma fluorescente; esto hace posible además, la eliminación de pigmentos e impurezas presentes en las muestras - que floculan durante el tiempo de reposo. Es sumamente importante trabajar en ausencia de luz hasta donde sea posible, ya que la riboflavina es inestable tanto a la luz visible como a la ultravioleta (18, 52, 56, 58).

La especificidad de este método reside en que, cada lectura fluorométrica perteneciente a la riboflavina, se comprueba mediante la adición de unas gotas de hidrosulfito de sodio que la reduce a su forma leuco no fluorescente; así, cualquier lectura que se registre después de este momento es debida a otros materiales fluorescentes que no son eliminados mediante la - oxidación (18, 53).

El método espectrofotométrico para piridoxina resulta ser muy específico, ya que las contribuciones debidas a otros compuestos copulantes - que también reaccionan con la 2-6 dicloroquinonaclorimida son mensurables al introducir un testigo en presencia de un exceso de boroato. La función de este reactivo es formar un complejo exclusivamente con la piridoxina (57) sin afectar a la reacción de los otros compuestos copulantes, de tal manera

que el color producido al agregar dicho reactivo no sea debido a la piridoxina. El uso del amortiguador de cloruro de amonio amoniacal elimina completamente las interferencias debidas a las diferentes clases de sales y bases en las soluciones problemas. El tiempo óptimo en el cual el color de la reacción alcanza un máximo de intensidad varía entre los 45-120 seg., dependiendo de la temperatura de la reacción. Sweeny y Hall (65) recomiendan una mezcla de 1 ml. de amortiguador de cloruro de amonio amoniacal y 1 ml. de amortiguador al 20% de acetato de sodio. Esto proporciona un incremento en la sensibilidad y una desviación de la absorción de 620-650 nm. Por dicha modificación, es posible determinar el contenido de piridoxina en soluciones de muestras diluidas. La dilución minimiza el efecto de cualquier material reductor que pueda destruir el color producido en la reacción. Este método puede usarse para determinar piridoxina, piridoxal y piridoxamina con las modificaciones pertinentes. Es de importancia trabajar en ausencia de luz, para evitar la destrucción de la vitamina frente a la luz visible y ultravioleta (58).

Los métodos microbiológicos conocidos para la cuantificación de vitaminas, presentan varios problemas:

- A) La elección del microorganismo de ensayo más adecuado; esto depende principalmente de las muestras (el uso poco recomendable de microorganismos patógenos en nuestro caso no fue necesario, ya que se utilizaron Lactobacillus plantarum y Lactobacillus leichmannii que son inofensivos).
- B) El efecto de interferencias puede ser usualmente eliminado por una sim-

ple dilución, hasta alcanzar una concentración inactiva o bien, incluir dos tipos de microorganismos, en donde uno responda a las impurezas y el otro responda a su vez a la vitamina; dado que no se contó con dos tipos de microorganismos, se usaron diluciones grandes para tratar de eliminar el efecto de las impurezas (62, 67).

C) Estos métodos son más bien prolongados (aproximadamente 24 horas), en comparación con la rapidez de los físicoquímicos.

Debido a que éstos análisis se hacen turbidimétricamente (31, 35, 59, 61, 69, 70), se pueden encontrar ciertas limitaciones cuando se tienen muestras coloridas o extractos turbios; como las muestras analizadas eran prácticamente incoloras debido a las diluciones realizadas y las partículas finas que pudieran interferir con las lecturas turbidimétricas se eliminaron mediante filtración, dichas limitaciones no se presentaron.

D) Existe el inconveniente adicional de que estos procedimientos no son totalmente específicos. Así, en el caso de la nicotinamida, se ha visto que L. plantarum responde igualmente a la presencia de ácido nicotínico que a la nicotinamida, pero como ambas formas son biológicamente activas, no es un problema esencial (61).

En el caso de pantotenato de calcio, se han descrito estudios (31), en los que se ha demostrado que L. plantarum, responde más rápidamente a la presencia de esta vitamina, que L. casei y que además no es estimulado por la presencia de almidón y ácidos grasos.

La presencia de desoxirribósidos (59), en el caso de cianocobala -

mina, estimulan el crecimiento bacteriano, falseando los resultados. Para llevar a cabo esta prueba, se tomaron en cuenta varios factores, que son muy importantes para evitar problemas. El material usado, debe de estar meticulosamente lavado y esterilizado, porque la presencia de cualquier producto orgánico, (así como la concentración de metabisulfito de sodio) modifica el crecimiento de L. Leichmannii (67)

E) Problemas técnicos generales. El tiempo de esterilización y el enfriado de los tubos es crítico, porque el sobrecalentamiento del medio trae como consecuencia un incremento del color, que interfiere en la lectura de los tubos. El intervalo entre la agitación y la determinación de las lecturas es importante, ya que la turbiedad de los tubos va cambiando con el tiempo debido a la sedimentación de las células.

El problema principal fue buscar mediante diferentes diluciones, la escala adecuada de concentración de la vitamina presente en las muestras y poder detectarlas e identificarlas de esta manera. Con este método no fué posible detectar la presencia de vitamina B dado que las muestras no fueron analizadas inmediatamente después de recolectarlas y posiblemente se degradó, en caso de encontrarse libremente; otro factor que pudo haber influido es que, a pesar de haber usado distintas diluciones de muestra de cultivo, persistiera suficiente cantidad de un supuesto inhibidor del crecimiento para L. Leichmannii, además de que no se realizó una digestión enzimática de las muestras para separar la vitamina de la apoenzima.

Los métodos microbiológicos son superiores en algunos aspectos a

los métodos fisicoquímicos existentes, ya que no requieren procesos de - decoloración, que acarrearían pérdida de las vitaminas, además de que permiten cuantificar a la vitamina biológicamente activa en concentraciones más bajas.

DISCUSION DE RESULTADOS

Ya que este trabajo fue realizado con el fin de detectar algunas de las vitaminas del complejo B, no hemos intentado relacionar nuestros resultados con el contenido proteico o con el recuento celular de los organismos usados, sino con el volumen total de cultivo (micelio junto con medio nutritivo). De aquí que cada resultado esté dado en mcg de vitamina por ml de cultivo homogeneizado.

Tampoco es posible realizar un estudio francamente comparativo de los resultados obtenidos con los dos organismos usados, debido a la gran diferencia de condiciones físicas de cultivo en que se realizaron, ya que Pleurotus ostreatus fue cultivado a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}$ C y con una agitación de 150 rpm, y Tricholoma nudum a una temperatura de $18 \pm 2^{\circ}$ C y con una agitación de 225 rpm, aunque el pH y la concentración de azúcares reductores fueron los mismos.

La concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo fue crítica para el crecimiento y metabolismo de estos hongos, ya que cuando éstos faltan parece presentarse una autólisis celular. Es por esto que sólo se ha seguido el curso temporal de los cambios en concentración de vitaminas mientras éstos azúcares se hallaron presentes. Así, en el caso de P. ostreatus, después de las 264 horas (11 días) de cultivo se suspendió el muestreo, ya que la cantidad de azúcares reductores en el medio de cultivo no era observable (gráfica 1); en el caso de T. nudum esta situación se pre-

sentó a partir de las 48 horas de cultivo (gráfica 4).

Como se puede observar (gráfica 2) en el caso de P. ostreatus, todas las vitaminas presentes en el medio, exceptuando pantotenato de calcio, sufren un decremento inicial, quizá debido a que sean usadas de alguna manera por el organismo para su crecimiento, o bien a que resulte más difícil recobrarlas en su forma libre y detectarlas una vez que interaccionen con el material celular (conviene redundar en que la concentración inicial de vitaminas en el medio se midió en ausencia de inóculo, de aquí que si se considera la contribución que debe dar al total éste último, el decremento inicial podría ser aún mayor del encontrado). Después de que se ha alcanzado un máximo de concentración vitamínica - en todos los casos estudiados a las 168 horas de cultivo - se registra otra nueva disminución de las mismas, quizá debido a la destrucción por muerte celular. El período de más intensa biosíntesis de vitaminas está relacionado con el metabolismo de los azúcares reductores, ya que a este mismo intervalo corresponde el período de consumo más activo de éstos últimos.

De las gráficas 2 y 3 se puede calcular que los aumentos en concentración relativa de las distintas vitaminas a las 168 horas, tomando como 100% el valor a tiempo cero, son de alrededor de 36% para tiamina, 28% para riboflavina, 275% para nicotinamida, 870% para pantotenato de calcio y de 115% para piridoxina. Los aumentos en concentración absoluta son, respectivamente, de: 0.21, 0.7, 5.6, 11.4 y 10.8 mcg/ml. Es interesante anotar que aumentos moderados en la concentración relativa pueden aparecer como incrementos notables en concentración absoluta, por ejemplo: la elevación

en 892% en pantotenato de calcio corresponde a 11.4 mcg/ml. mientras que aumentos de sólo 119% en piridoxina lo hacen con valores de 10.8 mcg/ml sobre la concentración inicial.

Si se considera la posibilidad de utilizar estos organismos en la producción industrial de vitaminas probablemente sea necesario tomar en cuenta tanto el criterio porcentual como el absoluto en el estudio de rendimientos, así como, por otro lado, relacionarlos con la economía que gobierne la producción a gran escala.

En el estudio con Tricholoma nudum (gráfica 5) no se detectaron los decrementos iniciales en concentración vitamínica que aparece en el caso de P. ostreatus, hecho que pudiera deberse además de las diferencias de especie, a las distintas condiciones de cultivo ya mencionadas. Solo fué posible detectar con claridad un máximo de concentración para piridoxina y nicotinamida (a las 24 y 60 horas respectivamente), encontrándose que en las demás vitaminas la cantidad acumulada no llega a un período de decremento, quizá debido a que la temperatura de incubación no fué óptima aunque recibió una agitación más intensa, provocando ello un retraso en la producción vitamínica con respecto al rápido crecimiento del micelio.

Por otra parte, en este caso se observó que los intervalos de mayor actividad biosintética variaban considerablemente entre las distintas vitaminas. Con todo, se puede decir que este intervalo se encuentra en todos los casos alrededor de las 24 y 48 horas (excepto para piridoxina, en la que se registra entre las 12 y 24 horas) coincidiendo con el máximo consumo de

azúcares reductores (gráfica 4).

Según aparece en las gráficas 5 y 6, los máximos aumentos en concentración porcentual y absoluta que pueden calcularse de las distintas vitaminas con respecto al valor inicial, varían temporalmente para cada una de ellas. La tiamina mostró su máxima concentración a las 72 horas de cultivo, siendo el aumento de 32% en términos relativos y 0.2 mcg/ml. en términos absolutos. La riboflavina presentó un máximo a las 72 horas y aumentos de 68% y 1.6 mcg/ml. respectivamente. Los parámetros obtenidos para nico - tinamida fueron de 60 horas, 70% y 2.0 mcg/ml. , para pantotenato de calcio de 72 horas, 288% y 5.5 mcg/ml. y para piridoxina de 24 horas, 75% y 6.3 mcg/ml. Aquí posiblemente se puedan emplear las mismas consideraciones indicadas en el caso de P. ostreatus, en la interpretación de estos datos para la aplicación industrial.

CONCLUSIONES

De acuerdo con lo observado durante la realización de este trabajo se puede deducir que:

1. - Se detectó un aumento considerable y de importancia en las cantidades de nicotinamida, pantotenato de calcio y pirodoxina en los hongos cultivados.
2. - La tiamina y riboflavina en el caso de Pleurotus ostreatus, se conservaron prácticamente constantes durante todo el período de incubación. En el caso de Tricholoma nudum, la riboflavina presenta un ligero aumento.
3. - Tricholoma nudum crece mucho más rápidamente que Pleurotus ostreatus; por lo tanto, si pueden lograrse mejores condiciones de cultivo, posiblemente habría una mayor producción de vitaminas.
4. - Se entiende que los resultados obtenidos sólo son válidos para las condiciones y medios de cultivo aquí utilizados para dichos organismos. Cualquier variación que se presente es probable que tenga como consecuencia la obtención de resultados diferentes de los señalados en esta tesis.

BIBLIOGRAFIA

1. - Ainsworth, G. G. & Sussman, A. S.
The Fungi.
Vol. I.
pp. 307
Academic Press.
N. Y. (1966).
2. - Alexopoulos, C. J.
Introducción a la Micología.
pp. 433-447, 501-527.
EUDEBA.
Buenos Aires (1966).
3. - Andrews, J. S., Boyd, H. M. & Gortner, W. A. - Nicotinic acid content of cereals and cereals products. - Microbiological method of assay. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 663 - 666 (1942).
4. - Andrews, J. S., Boyd, H. M. & Terry, D. E. - Riboflavin analysis of cereals. Application of the microbiological method. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 271 - 274 (1942).
5. - Arnold, A., Schreffler, C. B. & Lipsius, S. T. - Chemical determination of nicotinic acid. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13, 62 - 63 (1941).
6. - Association of Vitamins Chemists, The U. S. A.
Métodos de Análisis de Vitaminas.
pp. 115 - 263
Editorial Academia.
León, España (1969).
7. - Atkin, L., Schultz, A. S., Williams, W. L. & Frey, C. N. - Microbial methods for the determination of vitamins. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15, 141 - 150 (1943).
8. - Berkman, S., Koser, S. A. & Dorfman, A. - Comparative activity of nicotinic acid and nicotinamida as growth factors for microorganism. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 47, 504 507 (1941).

9. - Browne, C.A. & Zerban, F.W.
Physical and Chemicals Methods of Sugar Analysis.
3rd. Ed.
pp. 646 - 648, 744 - 745
J. Wiley & Sons, Inc.
N. Y. (1955).
10. - Buskirk, H.H. & Delor, S.A. - The use of mylase P in the preparation of natural materials for microbiological pantothenic acid assay. - J. Biol. Chem. 145, 707-708 (1942).
11. - Cheldelin, V.H. & Williams, R.R. - Extraction and assay of nicotinic acid from animal and plant tissues. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 671-675 (1942).
12. - Conn, E.E. y Stumpf, P.K.
Bioquímica Fundamental.
2a. Ed.
pp. 167 -176, 179 - 183, 187 - 192.
Editorial Limusa-Wiley, S.A.
México (1969).
13. - Conner, R. T. & Straub, G.S. Determination of thiamine by the -
thiochrome reaction. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13 , 380-385 (1941).
14. -Cook, E.A. & Ellis, L.N. - Variations in the growth of four different -
vitamin B₁₂ assay microorganisms to the same tissue and standard pre-
paration. Appl. Microbiol. 16, 1829 1840 (1968).
15. - Davis, L.E. & Nicol, D.J. - The microbiological assay of vitamin B₁₂
using the diatom Cyclotella nana. - Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 145,
613-628 (1967).
16. - Dulbeco, D. et al.
Microbiology.
pp. 56, 81.
Harper & Row Ed.
N.Y. (1969).
17. - Dyke, S.F.
The Chemistry of the Vitamins.
Interscience Publishers.
London (1965).

18. -Emmett, A. D., Bird, O. D., Brow, R.A., Peacock, G. & Vandenbelt, J.M. - Determination of vitamin B₂ (riboflavin). Ind. Eng. Chem. - Anal. Ed. 13, 219 -221 (1941).
19. - Encyclopedia Americana, The American Corporation
Vol. 28
pp. 181
N. Y. (1963).
20. -Eppright, M. A. & Williams, R. J. - Thiamine determination. Comparative study of yeast-growth, yeast fermentation and thiochrome methods. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 16, 576-579 (1944).
21. -Farmacia Práctica de Remington.
2a. Ed.
pp. 1047, 1052, 1053, 1059, 1060.
UTEHA.
México (1965).
22. -Frost, D. V. - Pantothenic acid. Optical rotation as a measure of stability. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15, 306-310 (1943).
23. - Gstirner, F.
Métodos Fisicoquímicos para la Determinación de Vitaminas.
Manuel Marín Ed.
Barcelona (1944).
- 24. -György, P.
Vitamin Methods.
Vol. II.
pp. 45, 179, 448.
Academic Press.
N. Y. (1951).
25. -Harper, H. A.
Manual de Química Fisiológica
3a. Ed.
pp. 108-119, 130-135.
El Manual Moderno, S.A.
México (1969).
26. -Harris, R.S. & Thiman K.V.
Vitamins and Hormones.
pp. 144
Academic Press, Inc. Publishers.
N. Y. (1943).

27. -Hennessy, D.J. - Chemicals methods for the determination of vitamin B₁ .- Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13, 216 - 219 (1941).
28. -Hennessy, D.J. & Cerecedo, L.R. - The determination of free and phosphorylated thiamine by a modified thiochrome assay. J. Am. Chem. Soc. 61, 179-183 (1939).
29. -Herrera, T. y Guzmán, G.
Taxonomía y Ecología de los Principales Hongos Comestibles de
Diversos Lugares de México,
pp. 74-76
An. Inst. Biol. Mex. XXXII.
México (1961).
30. - Higuchi, T. & Brochmann, H. E.
Pharmaceutical Analysis.
pp. 656-688.
Interscience Publishers.
N. Y. (1961).
31. -Hoag, E.H., Sarett, H.P. & Cheldelin, V.H. - Use of Lactobacillus arabinosus 17-5 for microassay of pantothenic acid. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 60-62 (1945).
32. -Hochberg, M., Melnick, D. & Oser, B. - Chemical determination of pyridoxine. Reactions in pure systems. J. Biol. Chem. 155, 109-119 (1944).
33. -Hochberg, M. Melnick, D. & Oser, B. - Chemical determination of - pyridoxine in biological materials and pharmaceutical products. The multiple nature of vitamin B₆ .- J. Biol. Chem. 155, 119-128 (1944)
34. -Jansen, B.C.P. - A Chemical determination of aneurin by the thiochrome reaction. Rec. trav. Chim. 55, 1046 - 1052 (1936).
35. -Johnson, B. C. - The microbiological determination of nicotinic acid, - nicotinamide and nicotinuric acid. J. Biol. Chem. 159, 227-230 (1945).
36. -Kavanagh, F.
Analytical Microbiology.
Academic Press.
N. Y. (1963).

37. -Kinnersley, H. W. & Peters, R. A. - The formaldehyde-azo-test for - vitamin B₁ . Biochem. J. 28 667-670 (1934)
38. -Kinnersley, H. W. & Peters, S. A. - Improvements in the use of the - formaldehyde azo reaction for vitamin B₁ . Biochem. J. 32, 1516-1520 (1938)
39. -Langeron, M.
Outline of Micology.
pp. 36-40.
Sir Issac Pitmen & Sons, Ltd.
London (1965).
40. -Lingane, J. J. & Davis, O. L. - Polarographic determination of ribofla - vin and other vitamin B factors. - J. Biol. Chem. 137, 567-574 (1941)
41. -Melnick, D. & Field, H. Chemical determination of vitamin B₁ J. Biol. Chem. 127, 505-510 (1939).
42. -Melnick, D., Hochberg, M. & Himes, H. - The multiple nature of vita - min B₆ . Critique of methods for the determination of the complex and its components. J. Biol. Chem. 160, 1-14 (1945).
43. -Merck Index, The.
An Encyclopedia of Chemicals and Drugs.
8th. Ed.
pp. 729, 781, 892, 918, 1036, 1112.
Merck & Co., Inc.
Rahway, N. J. (1968).
44. -Mukherji, A. - The estimation of aneurin by thiochrome reaction with Pulfrich photometer. J. Indian. Chem. Soc. 16, 273-280 (1939).
45. -Peppler, H. J.
Microbial Technology
pp. 130-131
Reinhold Publishing Corp.
N. Y. (1967).
46. -Prescott, S. C. y Punn, C. G.
Microbiología Industrial.
2a. Ed.
pp. 864-870.
Aguilar, S. A. de Ediciones.
Madrid (1952).

47. -Rabinowitz, J. C. & Snell, E. E. - An improved procedure for the determination of pyridoxal with Lactobacillus casei. J. Biol. Chem. 175, 147-160 (1948).
48. -Rafelson, B. & Hayashi.
Basic Biochemistry.
3rd. Ed.
pp. 73-77
Mc. Millan, Co.
N. Y. (1971).
49. -Reusser, F., Spencer, J.F.T. & Sallans, H.R. - Tricholoma nudum as a source of microbiological protein. Appl. Microbiol. 6, 5-8 (1958).
50. -Rhodes, A. & Fletcher, D. L.
Principles of Industrial Microbiology.
pp. 64-65.
Pergamon Press.
London (1966).
51. -Rodríguez, C. J. y Cuenca, E. C. L.
Métodos Microbiológicos de Valoración de Vitaminas del Complejo B.
pp. 141-152.
Instituto de Investigaciones Veterinarias.
Madrid (1968).
52. -Rosenberg, H. R.
Chemistry and Physiology of the Vitamins.
pp. 182-184, 240-242, 265-266.
Interscience Publishers.
N. Y. (1945).
53. -Rubin, S. H. , De Ritter, E., Schuman, R. L. & Bauerfeind, J. C.
Determination of riboflavin in low-potency foods and feeds. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 136-140 (1945).
54. -Sánchez, M. A.
Introducción a la Microbiología Química.
pp. 73.
Editorial de la Sociedad Científica de la E. N. C. Q.
México (1950).

55. -Schultz, A.S., Atkin, L. & Frey, C.N. - Determination of vitamin B₁ by yeast fermentation method. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 35-39 (1942).
56. -Scott, M.L., Hill, F.W., Norris, L.C. & Hausser, G.F. Chemical - determination of riboflavin. J. Biol. Chem. 165, 65-71 (1946).
57. -Scudi, J., Bastedo, W & Webb, T. The formation of a vitamin B₆ borate complex. J. Biol. Chem. 136, 399 - 406 (1940).
58. -Sebrell, W.H. & Harris, R.S.
The Vitamins. Chemistry, Physiology and Pathology.
Vol. I.
pp. 400-505.
Vol. III.
pp. 240-260, 360-373, 430-380, 534-541, 628-633.
Academic Press, Inc. Publishers.
N. Y. (1954).
59. -Skeggs, H.R. Nepple, H.M., Valentik, K.A. et al. Observations of the use of Lactobacillus Leichmannii 4997 in the microbiological assay of - vitamin B₁₂. J. Biol. Chem. 184, 211-221 (1950).
60. -Smith, G.M.
Cryptogamic Botany.
Vol. I.
Algae and Fungi.
2nd. Ed.
61. -Snell, E.E. & Wright, L.D. A microbiological method for the determination of nicotinic acid. J. Biol. Chem. 139, 675-685 (1941).
62. -Strobecker, R. & Heinz, M.H.
Vitamin Assay.
pp. 151-172.
Verlop Chemic- GMBH - Weinheimf.
Bergstr. (1966).
63. -Strong, F.M. & Carpenter, L.E. Preparation of samples for microbiological determination of riboflavin. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 909-913 (1942).

- 64.- Strong, F. M., Feeney, R. E. & Earle, A. - Microbiological assay for pantothenic acid. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13, 566-570 (1941).
- 65.- Sweeney, J. P. & Hall, W. L. - The effect of sodium acetate on the reaction of 2,6 dichloroquininchlorimide with the vitamin B₆ group. *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 38, 697-707 (1955).
- 66.- Szalkowski, C. R. & Davidson, J. H. - Colorimetric determination of calcium pantothenate. *Anal. Chem.* 25, 1192, 1195 (1953).
- 67.- United States Pharmacopeia, The.
XVIII.
pp. 95, 446, 570, 591, 729, 887-890.
Mack Printing Company.
Easton (1970).
- 68.- Vessey, E. & Toth, E. Protein - enriched fodder and a mushroom - like product useful for human consumption. *Hung.* 155, 630-632.
- 69.- Waisman, H. A. & Elvehjem, C. A. Chemical estimation of nicotinic acid and vitamin B₆. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13, 221-225 (1941).
- 70.- Willerton, E. & Cromwell, H. W. Microbiological assay of natural pantothenic acid in yeast and liver. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 14, 603-604 (1942).
- 71.- Williams, R. J., Mc. Mahan, J. R. & Eakin, R. E. Assay method for thiamine. *Univ. Texas Pub.* 4137, 31-35 (1941).
- 72.- Williams, W. L. Yeast microbiological method for determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 166, 397-406 (1946).
- 73.- Willstaedt, H. & Barany, F. Colorimetric method for the determination of vitamin B₁ (aneurin). *Enzimologíá*, 2 316-320 (1938).
- 74.- Wollish, E. F. & Schmall, M. Colorimetric determination of panthenol and pantothenates. *Anal. Chem.* 22, 1033-1037 (1950).
- 75.- Yusef, H. M., Thereful, D. R. & Goodwin, T. W. - Some Lipids of the oidia of Pleurotus ostreatus. *Phytochem.* 4, 559-562 (1965).
- 76.- Zakia, B., Srinivasan, K. S. & Srivastava, H. C. Aminoacid composition of the protein from a mushroom (Pleurotus). *Appl. Microbiol.* 11, 184-187 (1963).